

TARCÍSIO JORGE LEITÃO DE OLIVEIRA

ESTUDO DA CINÉTICA DE LIGAÇÃO DE CÁLCIO E FLUORETO À
SUPERFÍCIE DE ESTREPTOCOCOS E SUA IMPORTÂNCIA COMO
RESERVATÓRIOS DE ÍONS NO BIOFILME DENTAL

PIRACICABA

2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

TARCÍSIO JORGE LEITÃO DE OLIVEIRA

ESTUDO DA CINÉTICA DE LIGAÇÃO DE CÁLCIO E FLUORETO À
SUPERFÍCIE DE ESTREPTOCOCOS E SUA IMPORTÂNCIA COMO
RESERVATÓRIOS DE ÍONS NO BIOFILME DENTAL

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Livia M. Andaló Tenuta

TESE DE DOUTORADO APRESENTADA À
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE
PIRACICABA DA UNICAMP PARA
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM
ODONTOLOGIA NA ÁREA DE CARIOLOGIA.

Este exemplar corresponde à versão final da
Tese defendida pelo aluno, e orientado pela
Prof^a. Dr^a. Livia Maria Andaló Tenuta

PIRACICABA
2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARILENE GIRELLO – CRB8/6159 - BIBLIOTECA DA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNICAMP

L535e Leitão, Tarcísio Jorge, 1986-
Estudo da cinética de ligação de cálcio e fluoreto à superfície de
estreptococos e sua importância como reservatórios de íons no biofilme
dental / Tarcísio Jorge Leitão de Oliveira. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2012.

Orientador: Livia Maria Andaló Tenuta.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade
de Odontologia de Piracicaba.

1. Placa dentária. 2. *Streptococcus mutans*. 3. Flúor. 4. Cárie
dentária. I. Tenuta, Livia Maria Andaló, 1976- II. Universidade Estadual
de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para a Biblioteca Digital

Título em Inglês: Kinetics of calcium and fluoride binding to the surface of
streptococci and the importance of these ions as mineral reservoirs in dental biofilm

Palavras-chave em Inglês:

Dental plaque

Streptococcus mutans

Fluoride

Dental caries

Área de concentração: Cariologia

Titulação: Doutor em Odontologia

Banca examinadora:

Livia Maria Andaló Tenuta [Orientador]

Cecilia Pedroso Turssi

Fernanda Faot

Carolina Patrícia Aires

Rafael Nobrega Stipp

Data da defesa: 25-06-2012

Programa de Pós-Graduação: Odontologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 25 de Junho de 2012, considerou o candidato TARCÍSIO JORGE LEITÃO DE OLIVEIRA aprovado.

Livia M. A. Tenuta

Profa. Dra. LÍVIA MARIA ANDALÓ TENUTA

Cecilia Pedroso Turssi

Profa. Dra. CECILIA PEDROSO TURSSI

Fernanda Faot

Profa. Dra. FERNANDA FAOT

Carolina Patrícia Aires

Profa. Dra. CAROLINA PATRÍCIA AIRES

Rafael Nobrega Stipp

Prof. Dr. RAFAEL NOBREGA STIPP

*Dedico este trabalho aos meus pais,
Jeová e Rosa, e à minha noiva
Kleydejany, pelo amor e apoio
incondicional.*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos meus irmãos **David, Vicente e Layssa**, pelo amor, amizade e união que temos, pela força que sempre me deram durante esta jornada.

Aos meus avós, paternos (**Vicente *in memoriam* e Maria**) e maternos (**Raimundo e Rosa**) pelas orações – um elo muito estreito entre Deus e seus netos.

À minha orientadora, **Prof.^a Livia Tenuta**, por todos os ensinamentos e oportunidades que me concedeu. Por ser exemplo de dedicação, competência e princípios. Pelo apoio e sensibilidade que teve em cada etapa desse processo de formação científica.

Ao **Prof.^o Jaime Cury e Prof.^a Altair Del Bel Cury**, por serem exemplos de pesquisadores e professores. Um espelho sempre a seguir em toda minha jornada acadêmica e profissional.

AGRADECIMENTOS

Ao Magnífico Reitor da UNICAMP, **Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa**.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, na pessoa do Diretor **Prof. Dr. Jacks Jorge Júnior**.

À **Prof.^a Dr.^a Renata Cunha Matheus Rodrigues Garcia**, Coordenadora Geral da Pós-Graduação da FOP-UNICAMP.

À **Prof.^a Dr.^a Cíntia Pereira Machado Tabchoury**, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, **FAPESP** pela bolsa de mestrado (nº 2009/12907-5) e doutorado direto (nº 2011/23677-0).

À **Prof.^a Dr.^a Cíntia Pereira Machado Tabchoury**, pelos ensinamentos ao longo da jornada acadêmica. Pelas sugestões dadas ao trabalho.

Aos **Professores do Programa de Pós-Graduação em Odontologia**, em especial ao **Prof^o Dr. Pedro Luiz Rosalen**.

Às Profs.^a **Dr.^a Cecília Cláudia Costa Ribeiro** e **Cláudia Maria Coelho Alves** da UFMA, pela oportunidade, incentivo e confiança depositada. Pelo exemplo de compromisso com a docência.

Às colegas e amigas de pós-graduação: **Amanda, Juliana, Althea, Nádia, Naiara, Karla e Constanza**. Pelo companheirismo, discussões científicas e aprendizado.

Aos amigos ludovicenses **José Sabino** e **Letícia Machado**, pelo apoio e companheirismo constante.

Aos meus amigos **Renzo Vasquez** e **Karla Oliveira**, pela amizade e apoio que me deram nos primeiros anos em Piracicaba.

Ao Jerônimo **Júnior**, pela amizade e pela imprescindível ajuda nas análises laboratoriais.

Aos técnicos **Waldomiro Vieira Filho** e **José Alfredo da Silva** pela ajuda no laboratório

Aos amigos de pós-graduação pela sincera amizade.

À todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

RESUMO

O estudo das formas de retenção de íons no biofilme dental e dos mecanismos de disponibilização destes para o fluido do biofilme é importante para o entendimento do papel destes reservatórios em interferir na dinâmica do processo de formação da cárie dental. Sabe-se que o fluoreto (F) está ligado ao biofilme por interação com íons cálcio (Ca). Um dos reservatórios que estes dois íons podem formar é o F ligado ao Ca na superfície de bactérias e proteínas da matriz extracelular. Quando o pH do biofilme diminui após a exposição à carboidratos fermentáveis, a liberação destes íons poderia diminuir o potencial de perda mineral, mas isto não está claro na literatura. Além disso, há evidências de que um pré-bochecho com Ca aumente a retenção de F no biofilme e entender a cinética de ligação e liberação destes íons pode ser uma estratégia importante para o desenvolvimento de métodos que os mantenham por mais tempo no biofilme dental. Assim, o objetivo deste trabalho de tese foi estudar a cinética de ligação de Ca e F na superfície bacteriana e sua liberação em função do tempo e do pH do meio. A bactéria *Streptococcus mutans* cepa IB 1600 foi utilizada em todos os experimentos. Foram realizados experimentos sequenciais *in vitro* para avaliar a cinética de ligação e liberação de Ca à superfície de *S. mutans* utilizando soluções contendo 0 (controle), 1 ou 10 mM de Ca. A capacidade de liberação deste reservatório também foi avaliada em situação que simula a queda do pH. Além disso, foi avaliada a capacidade e cinética de ligação de F, na concentração de 52,6 μM F (1 ppm F), mediada por Ca, às bactérias. A quantidade de Ca e F ligada às bactérias foi estimada após extração desses íons da superfície bacteriana com ácido forte, utilizando dosagem colorimétrica e eletrodo íon-específico, respectivamente. Curvas e parâmetros de cinética de ligação e liberação foram calculados e avaliados como fenômenos bioquímicos. Os resultados mostraram que a ligação de Ca à *S. mutans* é função da concentração do meio e mostrou ser um fenômeno rápido, onde a máxima saturação é alcançada nos primeiros minutos. Por outro lado, a cinética de liberação mostrou ser um fenômeno mais lento, onde significativa quantidade de íons é encontrada ligada às bactérias mesmo após 60 min de tratamento com solução livre de Ca. Ademais, a liberação parece ser função direta do pH do meio e não influenciada pela quantidade de Ca previamente

ligada. A ligação de F às bactérias também mostrou ser um fenômeno rápido, mas não dependente da concentração de Ca ligado às bactérias. A ligação deste último também não foi afetada pela presença de F no meio. De forma geral, os resultados sugerem que a ligação de Ca na superfície bacteriana pode funcionar como um importante reservatório capaz de perdurar por um significativo período de tempo e ser prontamente liberado para o fluido do biofilme durante uma queda de pH. Além disso, a ligação de F às bactérias parece não ser influenciada pela presença de Ca.

Palavras-chave: placa dentária, *Streptococcus mutans*, cálcio, flúor, cárie dentária.

ABSTRACT

The study of the retention of mineral ions in dental biofilm and their release to the biofilm fluid is important to understand the role of these reservoirs to interfere with the dental caries process. It is known that fluoride (F) is bound to the biofilm by interaction with calcium (Ca) ions. One type of reservoir formed is Ca-F bridging in bacteria surface and in proteins of the extracellular matrix. When pH drops in dental biofilm after a sugar exposure and a subsaturation state is established, favoring dental demineralization, the ions released from these reservoirs could reduce the potential for mineral loss, but this is unclear in the literature. Furthermore, there is evidence that a Ca pre-rinse increases F retention in biofilm and to evaluate the kinetics of binding and release these ions could be an important strategy to the development of methods that keep them for longer periods in the dental biofilm. Thus, this study aimed to evaluate the kinetics of Ca and F binding and release from bacteria surface as a function of time and pH. *Streptococcus mutans* IB 1600 was used in all experiments. In vitro studies were conducted to evaluate the kinetics of Ca binding and release using treatments solutions containing 0, 1 or 10 mM Ca. The release capacity also was evaluated after a pH drop. Furthermore, the binding capacity and kinetics of fluoride at 52.6 μM F (1 ppm F) to bacteria was evaluated. The amount of Ca and F bound to bacteria after equilibrium with treatment solutions was determined in the bacterial pellet after treatment with strong acid, using a colorimetric method and F electrode, respectively. Curves and parameters of binding and release were calculated and treated as biochemical phenomena. Results showed that Ca binding to *S. mutans* is concentration-dependent and rapid, with maximum saturation achieved in the first minutes. On the other hand, Ca release was shown to be a slower phenomenon, since a significant amount of ions was still bound after 60 min of treatment with Ca-free solution. Moreover, the Ca release seems to be a direct function of media pH and not influenced by the amount of Ca previously bound. F binding to bacteria also shown to be a rapid phenomenon, but independent of Ca concentration in bacteria. Also, Ca binding was not affected by F presence in the treatment solution. In summary, the results suggest that ions bound to bacterial surface could be an important reservoir able to persist for a significant period of time and be released into the

biofilm fluid during a pH drop. Furthermore, F binding to bacteria seems not to be influenced by Ca previously bound.

Key words: dental plaque, *Streptococcus mutans*, calcium, fluoride, dental caries.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISTA DA LITERATURA	3
2.1 Biofilme dental – Considerações Gerais	3
2.2 Componentes Inorgânicos (Ca, Pi e F) do Biofilme e Cárie Dental	4
2.3 Concentração de Íons no Fluido do Biofilme e Cárie Dental	10
2.4 Mecanismo de Retenção de Íons no Biofilme Dental	14
3 PROPOSIÇÃO	19
4 MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.1 Cultivo bacteriano e obtenção do <i>pellet</i> experimental	20
4.2 Estudo da viabilidade bacteriana e controle do pH da solução tratamento	22
4.3 Validação do protocolo experimental	22
4.4 Estudos para avaliar a ligação e liberação de Ca a <i>S. mutans</i> em função do tempo e do pH	24
4.5 Estudo da cinética e capacidade de ligação de F a <i>S. mutans</i>	28
4.6 Análises da concentração de Ca e F	28
4.7 Análise dos Dados	29
5 RESULTADOS	32
5.1 Estudo da viabilidade bacteriana e controle do pH da solução tratamento	32
5.2 Validação do protocolo experimental	32
5.3 Cinética e capacidade de ligação de Ca à <i>S. mutans</i>	35
5.3 Cinética de liberação de Ca ligado a <i>S. mutans</i>	36
5.5 Liberação de Ca ligado a <i>S. mutans</i> em função do pH	37
5.6 Cinética e capacidade de ligação de F a <i>S. mutans</i>	39

6 DISCUSSÃO	40
6.1 Cinética ligação e liberação de Ca à <i>S. mutans</i>	42
6.2 Liberação de Ca ligado a <i>S. mutans</i> em função do pH	45
6.3 Cinética e capacidade de ligação de F a <i>S. mutans</i>	48
7 CONCLUSÕES	51
REFERÊNCIAS	52
ANEXO	58

1 INTRODUÇÃO

A cárie dental é uma doença biofilme-açúcar dependente, que se caracteriza pela progressiva perda de minerais do dente decorrente das constantes queda de pH induzidas pelo metabolismo bacteriano quando o biofilme é exposto à carboidratos fermentáveis (Fejerskov, 1997). Físico-quimicamente a queda do pH acarreta um desequilíbrio no estado de saturação do fluido do biofilme em relação ao mineral do dente e este tende a se dissolver.

Tem sido sugerido que a capacidade de retenção de íons Ca e F no biofilme dental na forma de depósitos minerais (Kaufman & Kleinberg, 1976) e/ou ligados a grupamentos aniônicos das paredes das bactérias (Rose *et al.* 1993; 1996) e proteínas da matriz do biofilme (Gao *et al.* 2001), pode funcionar como reservatórios de íons a serem liberados para o fluido do biofilme durante a queda do pH e interferir no grau de saturação deste, reduzindo a perda mineral da estrutura dental. De fato, tem sido observado um aumento significativo na concentração de Ca no fluido do biofilme após desafio cariogênico (Margolis & Moreno, 1992; Rankine *et al.* 1996; Tanaka & Margolis, 1999; Tenuta *et al.* 2006), o que tem sido atribuído à liberação destes reservatórios. No entanto, estudos que avaliaram a dinâmica dessa ligação e sua importância são escassos e particularmente em relação aos íons ligados às bactérias, existem poucos trabalhos na literatura que se ocuparam em investigar a dinâmica desta ligação (Rose *et al.* 1993; 1996).

A retenção de F no biofilme dental é mediada por Ca seja na forma de minerais precipitados (tipo CaF_2), ou ligado à superfície bacteriana e proteínas da matriz do biofilme (Rose *et al.* 1996). A formação do “ CaF_2 ” prevê que se atinja no meio uma concentração de íons Ca e F que supere o produto de solubilidade desse mineral, o que aconteceria preferencialmente após exposição a agentes fluoretados contendo alta concentração de F, como produtos para uso profissional.

Por outro lado, a retenção de F ligado ao Ca na superfície de bactérias ou proteínas no biofilme seria a forma mais comum e duradoura de manutenção do íon no biofilme. Rose *et al.* (1993; 1996) mostraram que a quantidade de íons Ca e F ligados às bactérias é menor em pH 5,0 quando comparado ao pH 7,0, e isto tem suportado a hipótese

que durante a queda do pH haveria disponibilização destes íons para o fluido do biofilme, mas isto nunca foi estudado em detalhes.

Além disso, nos últimos anos tem havido uma preocupação em potencializar o efeito do F como estratégia para aqueles indivíduos severamente acometidos pela doença cárie (Vogel *et al.* 2008). Medidas que visam enriquecer estes reservatórios devem estar fundamentadas em estudos que avaliam a capacidade destes íons em permanecer por um longo período de tempo no biofilme dental. Assim, estudar as formas de retenção de íons Ca e F no biofilme dental e dos mecanismos de disponibilização destes para o fluido do biofilme é fundamental para entendê-los com um reservatório lábil de íons capaz de interferir no processo da cárie dental.

2 REVISTA DA LITERATURA

2.1 Biofilme dental – Considerações Gerais

O biofilme dental consiste de uma comunidade de microrganismos aderida à superfície do dente, imersa em um material amorfo denominado matriz extracelular. Cerca de 70% do volume total do biofilme é constituído por células bacterianas – dentre elas, o gênero estreptococos é dominante (Macpherson *et al.* 1991); o restante é ocupado pela matriz extracelular que envolve e confere integridade estrutural à massa bacteriana (Marsh, 2004). A matriz é constituída de polímeros sintetizados pelas bactérias, macromoléculas e outros elementos derivados da saliva e fluido gengival. Permeando e constituindo o biofilme dental há a porção líquida denominada fluido do biofilme que desempenha papel central na dinâmica de manutenção da integridade do mineral do dente (Margolis & Moreno, 1994).

Os principais componentes orgânicos do biofilme são as proteínas bacterianas e salivares que compreendem aproximadamente metade do peso seco do biofilme. Além disso, macromoléculas como carboidratos e lipídios também têm destaque no meio extracelular do biofilme dental. Muitos carboidratos da matriz consistem de polímeros de glucanos, que compreende 10-20% do peso seco do biofilme, e frutanos, 1-2% do peso seco, e são sintetizados pelas próprias bactérias a partir de açúcares da dieta, principalmente a sacarose (Gibbons, 1968; Wood, 1969; Hotz *et al.* 1972).

Os componentes inorgânicos contribuem com aproximadamente 5% a 10% do peso seco do biofilme e contêm basicamente íons minerais de cálcio (Ca), fósforo inorgânico (Pi) e fluoreto (F). Dentre estes, o fluoreto tem destaque, pois em baixas concentrações nos fluidos orais é capaz de interferir significativamente no processo de formação da cárie dental (ten Cate, 1997). Estes componentes inorgânicos podem estar dissolvidos na porção líquida da matriz extracelular (fluido do biofilme), ou presentes de forma insolúvel, na porção sólida da matriz extracelular (Pearce, 1998).

A cariogenicidade do biofilme está fortemente relacionada à sua composição orgânica e inorgânica. Assim a presença de polissacarídeos na matriz do biofilme

determina, quando da ingestão de carboidratos fermentáveis, uma queda mais acentuada do pH na interface dente-placa (Fu *et al.* 1991; Zero *et al.* 1992; Zero, 1995). Por outro lado, a integridade da estrutura mineral dos dentes no meio bucal é determinada pela saturação da porção aquosa do biofilme com relação aos íons que a compõem. Assim, a concentração de íons cálcio, fosfato inorgânico e hidrogênio determina o grau de saturação do fluido do biofilme em relação ao produto de solubilidade do esmalte (Margolis *et al.*, 1988; Moreno & Margolis, 1988; Margolis & Moreno, 1992), definindo se haverá ou não desmineralização quando das quedas de pH.

2.2 Componentes Inorgânicos (Ca, Pi e F) do Biofilme e Cárie Dental

Ao longo de décadas a composição inorgânica do biofilme dental vem sendo pesquisada. Por algum tempo a maioria destes estudos tiveram como objetivo estabelecer a correlação entre as concentrações inorgânicas do biofilme dental e a experiência de cárie.

Neste sentido, Ashley em 1971, realizou um estudo cujo objetivo foi relacionar a prevalência de cárie com as concentrações de cálcio e fósforo no biofilme dental de estudantes, e associar à frequência de ingestão de açúcar das últimas 48 horas. Todos voluntários receberam profilaxia e polimento, a fim de padronizar as condições iniciais de presença de biofilme, e foram orientados a não escovarem seus dentes por 48 horas. Após coleta dos dados de ingestão de açúcar nas últimas 48 horas, todos voluntários mastigaram uma bala açucarada para padronizar a última exposição e 30 min após o biofilme foi coletado. Os autores concluíram que indivíduos com baixo índice de cárie tinham significativamente maior nível de cálcio ($p < 0,05$), fósforo inorgânico (Pi) ($p < 0,001$) e fósforo total ($p < 0,01$) e uma significativamente menor ingestão de açúcar no período de 48 horas ($p < 0,05$), quando comparados à indivíduos com atividade de cárie.

Ashley (1977), na tentativa de relacionar o efeito da saliva da parótida, a exposição à açúcar, as concentrações de Ca, Pi no biofilme e a prevalência de cárie em distintas regiões da cavidade oral, recrutaram 99 voluntários jovens para participarem do estudo que envolveu a coleta de saliva, profilaxia e 48 horas de abstenção de escovação dental antes da coleta do biofilme dental. Os resultados deste estudo mostraram que a

concentração de Ca e Pi no biofilme está relacionada às concentrações destes íons presente na saliva da parótida. Além disso, observaram uma correlação negativa entre a frequência de exposição à açúcar, quando comparada à concentração destes íons no biofilme dental. A mesma correlação foi observada também para o índice CPOS dos voluntários.

Prosseguindo seus estudos, Ashley, em 1975, realizou uma pesquisa sobre a relação entre os níveis de Ca e Pi no biofilme e o CPOS em meninos de 11 a 14 anos que, durante esse estudo fizeram uso de dentifrício sem fluoreto. Ao longo de 2 anos, três visitas foram programadas para coleta de biofilme e dados clínico/radiográfico; a primeira 6 meses após o início do estudo, 12 e 24 meses. Os resultados deste estudo mostram que na visita dos primeiros 6 meses não houve correlação significativa entre o índice de cárie e a concentração de Ca e Pi. Explicaram os autores que possivelmente o curto período entre o primeiro exame e a coleta dos primeiros dados, não tenha sido suficiente para o desenvolvimento de lesões nestes indivíduos. Nas outras duas, significativa correlação foi observada entre a menor concentração de Ca e Pi, e o maior índice CPOS dos voluntários.

Agus *et al.* (1976) realizaram um estudo observacional comparando a experiência de cárie e a concentração de fluoreto no biofilme de 72 escolares com idade de 9 a 13 anos residentes em Katoomba, Sydney e Yass, na Austrália, que continham na água de consumo: menos de 0,1 ppm F; 1,0 ppm F quatro anos antes do estudo; e 1,0 ppm F dezesseis anos antes do estudo, respectivamente. A média das concentrações de fluoreto no biofilme dos escolares de Katoomba foi de 13,5 ppm, enquanto em Sidney foi de 22,6 ppm e em Yass 25,6 ppm (peso seco). Foi observada uma associação inversa significativa da concentração de fluoreto no biofilme daqueles indivíduos com experiência de cárie da cidade de Sydney e também quando analisada toda a amostra.

Em estudo longitudinal, Ashley & Wilson (1977) acompanharam por 3 anos a incidência de cárie de 51 escolares e a composição do biofilme dental coletado aos 12, 24 e 36 meses após o exame inicial. Os resultados deste estudo corroboraram com seu estudo anterior onde significativa correlação foi observada entre a menor concentração de Ca, Pi e fósforo orgânico e o aparecimento de novas lesões de cárie. Além disso, observaram uma correlação direta entre o surgimento de lesões de cárie e a concentração de carboidratos intracelulares do biofilme dental.

Schamschula *et al.* em 1977, estudaram as concentrações de Ca e Pi, e de elementos traços (encontrados em menor concentração) em amostras de biofilme de 72 escolares residentes em cidades com diferentes concentrações de F na água de abastecimento (mesmas cidades do estudo de Agus *et al.* 1976). Pelos resultados obtidos, os autores não observaram diferenças significativas das concentrações de Ca e Pi para as três cidades. Elementos traços com Zn, K e Mg mostraram-se diferentes entre as populações das diferentes cidades, porém sem associação significativa com a presença de F na água de abastecimento.

Gaugler & Bruton (1982) avaliaram a concentração de F no biofilme de jovens recrutas com ou sem experiência de cárie. O estudo consistiu em coleta da coleta de biofilme destes voluntários e em laboratórios, os autores realizaram extrações seriadas de fluoreto no biofilme de modo a estimar a porcentagem liberada em cada condição: água, HCl 0,5 M 7 °C e em HCl 0,5 M à 60 °C. Cerca de 50% do total de F foi encontrado já na extração em água, aproximadamente 45% no tratamento com ácido gelado e o restante, que os autores chamaram de fortemente ligados, no extrato quente com HCl 0,5 M. Houve significativa diferença da concentração de F no biofilme de indivíduos livres de cárie, quando comparado àquele cárie-ativo; mas as parcelas de F encontradas nos diferentes extratos foram similares quanto à experiência de cárie dental.

A relação entre a concentração de F na água de abastecimento e a concentração inorgânica (Ca, Pi, F e H⁺) do biofilme dental também foi avaliada por Grobler *et al.* (1982) em 149 crianças de cidades da África do Sul. Os resultados mostraram que a concentração de F e Pi estavam diretamente correlacionados à maiores concentração de F na água de abastecimento. Já a concentração de Ca e o pH do biofilme, mostrou uma correlação inversa à concentração de F. A hipótese levantada por estes autores para explicar estes achados está baseada no esgotamento do reservatório de Ca que pode estar ocorrendo pela reversão da desmineralização na presença de baixos valores de pH.

Estudando a associação entre as concentrações de Ca e Pi do biofilme e sua relação com a cárie dental, Shaw *et al.* (1983) coletaram amostras de biofilme e saliva de 55 crianças entre 13 e 15 anos: 23 destas eram livres de cárie, enquanto as outras 32 apresentavam evidências de alta atividade de cárie com um CPOS médio de 25,9. A

concentração média de Ca no biofilme das crianças no grupo livre de cárie foi 3,57 µg/mg (peso seco), comparando com 1,63 µg/mg no grupo cárie-ativo. Diferenças significantes similares foram encontradas entre os níveis de Pi no biofilme. Na saliva, apenas a concentração de Pi mostrou-se significantemente maior nas crianças livre de cárie.

Nobre dos Santos & Cury em 1988, reportaram as mudanças na concentração de F no biofilme dental de crianças durante a paralisação da fluoretação da água de abastecimento público em Piracicaba, SP. Observaram antes da descontinuidade, a concentração de F no biofilme era 21,7 ng/mg; depois da paralisação, os níveis de F caíram para 1,7 ng/mg; mostrando a profunda diminuição da concentração deste íon na ausência desta medida preventiva. Os autores observaram ainda que após a refluoretação da água de abastecimento, os níveis de fluoreto no biofilme aumentaram para 17,3 ng/mg e que Ca e Pi não alteraram durante a interrupção da fluoretação da água de abastecimento (dados referenciados em Ellwood *et al.* 2008)

Tatevossian (1990a) em um estudo de revisão, descreveu que a concentração de fluoreto total no biofilme varia de 5 a 10 ppm (peso úmido). O autor relata que existem dois “pools” de flúor no biofilme: menos de 5% do flúor total está no fluido do biofilme como íon livre, e a grande porção restante do flúor total é designado como F ligado (cerca de 95%, que pode ser extraído por ácido perclórico 0,5 M). O autor discutiu que há evidências que o flúor não iônico pode ser liberado pela queda do pH produzida pela fermentação bacteriana de carboidratos, mas isto provavelmente não alcança uma concentração iônica suficiente para exercer uma significativa inibição da acidogênese do biofilme.

Wilson & Ashley (1990) avaliaram a relação entre a composição inorgânica do biofilme e o breve histórico de exposição à carboidratos em indivíduos jovens. Neste estudo foram recrutados 45 adolescentes do sexo masculino e 75 do sexo feminino e acompanhado seu histórico de ingestão de carboidratos quanto ao tempo da última exposição, a frequência e o total de açúcar ingerido nas últimas 24 horas. Os autores estabeleceram correlações entre estas variáveis, o sexo e o local de coleta da placa (proximais ou vestibulares/liguais). Correlação mais importante encontrada foi entre a composição do biofilme quanto à concentração de Ca, Pi e carboidratos solúveis e o tempo da última exposição à carboidratos.

A frequência de exposição à sacarose e sua influência na composição orgânica e inorgânica do biofilme foi avaliada por Cury *et al.* (1997), em um estudo *in situ*, cruzado, composto de quatro fase de 28 dias cada, no qual 12 voluntários utilizaram dispositivos intra-orais contendo blocos de esmalte que foram submetidos à exposições a sacarose 0, 2, 4 e 8 vezes ao dia. Os resultados mostraram que a frequência de exposição à sacarose reduz significativamente a concentração de F (7x), Ca (3x) e Pi (10x) no biofilme dental e leva a um aumento (3x) de polissacarídeos extracelular insolúveis (PECI) quando comparado ao biofilme formado na ausência de exposição. Os autores discutem ainda que, matematicamente em termos de peso, o aumento da massa do biofilme pela presença de polissacarídeos não explica proporcionalmente a redução da concentração iônica encontrada.

Dando continuidade a estes estudos, Cury *et al.* (2000) demonstraram que a menor concentração de Ca, Pi e F no biofilme formado na presença de sacarose não parece estar relacionada unicamente pela alta quantidade de polissacarídeos insolúveis, uma vez que os monossacarídeos constituintes da sacarose, glicose e frutose, também promovem diminuição da concentração inorgânica do biofilme, embora não sejam substrato para a produção de polissacarídeos insolúveis. Os autores reforçam que a cariogenicidade do biofilme formado na presença de sacarose não deve ser atribuída somente ao aumento da porosidade, mas também deve ser função importante da diminuição da concentração destes íons.

Com o objetivo de avaliar a influência da concentração da sacarose na composição do biofilme e na desmineralização dental, Aires *et al.* (2006) realizaram estudo *in situ*, cruzado, boca dividida, com 3 fases de 14 dias. Doze voluntários participaram do estudo utilizando dispositivos palatinos contendo 4 blocos de esmalte humano. A cada fase experimental dois tratamentos eram avaliados, considerando que cada dois blocos colocados de um lado do dispositivo recebiam tratamento diferente, que foi aleatoriamente determinado: água dd e sacarose 1%, sacarose 10% e 20%, sacarose 5% e 40%. Durante o período experimental, os voluntários utilizaram dentifrício não fluoretado e consumiam água otimamente fluoretada (0,6-0,8 mgF/L). Acidogenicidade, composição inorgânica e conteúdo de polissacarídeos no biofilme formado sobre os blocos, e mudanças na

microdureza (de superfície e em secção transversal) do esmalte foram analisados. Os achados sugeriram que 5% é o limiar de concentração de sacarose para a formação de um biofilme com propriedades acidogênicas e menores concentrações inorgânicas, capaz de promover o desenvolvimento de cárie dental.

Ccahuana-Vásquez *et al.* (2007) mostraram que, quando a frequência de exposição ao desafio cariogênico está associado ao uso de dentifício fluoretado, a perda mineral é significativa em frequências acima de 6 vezes ao dia, contudo, alterações bioquímicas e microbiológicas do biofilme estão presentes em frequências menores.

Vale *et al.* (2007), avaliaram a composição microbiológica e bioquímica do biofilme dental formado *in situ* na presença de sacarose ou glicose + frutose por 3, 7 e 14 dias e sua relação com a desmineralização do esmalte dental. Como conclusão, os autores entenderam que o biofilme formado por três dias na presença de alta exposição à sacarose já apresenta mudanças profundas na sua composição inorgânica e orgânica, enquanto a perda mineral se mostrou significativa com sete dias.

Paes Leme *et al.* (2006), em revisão, discutem o papel da sacarose como o carboidrato mais cariogênico dentre os açúcares da dieta e seu papel no aumento da cariogenicidade do biofilme. Este carboidrato além de ser fermentável à ácidos, é substrato para formação de polissacarídeos no biofilme o que acarreta em mudanças significativas na matriz do biofilme. Os autores exploram também o papel dos componentes inorgânicos do biofilme dental e diante das claras evidências que o biofilme formado sob alta frequência de exposição à sacarose tem menor concentração inorgânica, os autores lançaram mão de hipóteses para tentar explicar este fenômeno. Uma das hipóteses levantadas estar relacionada às frequentes queda do pH induzida pela metabolização da sacarose, promover a liberação dos reservatórios minerais destes íons no biofilme dental e sua difusão para a saliva. Entretanto os autores lembram que o biofilme com menores concentrações inorgânicas são coletados 10-12 h após a última exposição à sacarose e que haveria tempo suficiente para o restabelecimento das concentrações destes íons pela ação da saliva. Outra hipótese levantada por estes autores explicar apenas a menor concentração do F pela precipitação do mineral menos solúvel de fluorapatita no mineral do dente, mas não a de Ca e Pi. A menor concentração de Ca e F poderia ser explicada também pelo esgotamento do

reservatório de íons ligados à parede de bactérias ou ainda pela redução da densidade bacteriana devida a alta concentração de polissacarídeos extracelular insolúvel presente no biofilme formado na presença de sacarose. Entretanto, os autores concluem que os dados presentes na literatura não suportam totalmente as hipóteses levantadas e afirmam que pesquisas sobre o perfil protéico da matriz extracelular poderia indicar o caminho para explicar a menor concentração inorgânica encontrada no biofilme dental cariogênico.

Leitão *et al.* (2012), em um estudo *in vitro*, avaliaram o efeito da matriz extracelular rica em polissacarídeos extracelular insolúvel (PECI) em diminuir a densidade bacteriana e conseqüentemente reduzir o número de sítios de ligação de Ca no biofilme, hipótese esta que poderia explicar a menor concentração de Ca no biofilme formado sob alta frequência de exposição à sacarose. Neste estudo, a bactéria *S. mutans* foi crescida em caldo contendo 1% de sacarose (para permitir a formação de Peci) ou em caldo contendo 0,5% glicose + 0,5% frutose (não substrato para formação de Peci) e tratadas com solução contendo 1 ou 10 mM Ca. O *pellet* bacteriano sem tratamento foi analisado quanto a concentração de Peci, proteínas bacterianas (indicador de biomassa) e concentração inicial de Ca. Os autores mostraram que o biofilme formado na presença de sacarose tem concentração 10 vezes maior de Peci quando comparada àquele crescido na sua ausência; menor concentração de proteínas bacteriana (biomassa) e menor concentração de Ca inicialmente ligado. Entretanto a capacidade de ligação de íons nestas bactérias depois do tratamento com soluções de Ca foi similar para ambas as condições de cultivo mostrando que a presença de Peci não parece influenciar a capacidade de formação deste reservatório de íons ligado às bactérias.

2.3 Concentração de Íons no Fluido do Biofilme e Cárie Dental

Com o objetivo de avaliar a cinética do fosfato inorgânico (Pi), Na e K no fluido do biofilme, Tatevossian & Gould (1979) conduziram um experimento no qual o biofilme dental formado em 24 horas, foi estudado após bochecho com água, sacarose a 20% e fosfato 0,12 e 0,5 M. O biofilme foi coletado nos tempos 0, 5, 10 e 15 minutos após cada bochecho. Seus resultados mostraram que houve um aumento na concentração de Pi

no fluido do biofilme, o que poderia exercer um efeito local de curta duração, por ação de massas, sobre a dissolução e remineralização do esmalte.

Moreno & Margolis (1988) fizeram um estudo no qual a composição do fluido do biofilme foi determinado em 50 estudantes (18 a 22 anos de idade), que se abstiveram de higiene bucal por 36 horas e não comeram ou beberam por pelo menos 1 hora antes da coleta do biofilme. Os resultados mostraram que a composição inorgânica do fluido do biofilme foi similar àquele já encontrado por outros autores. Observaram que quando o pH inicial no fluido excedeu 6,5, o fosfato contribuiu significativamente para a capacidade tampão, e que, o produtos de atividade iônica calculados sugerem que o fluido do biofilme é saturado em relação aos minerais do esmalte.

Margolis *et al.* (1988) analisaram a composição do fluido do biofilme de indivíduos agrupados de acordo com a idade (8 a 11, 14, 17, 18 a 25 anos) e índice de cáries (livres de cárie – CF, CPOS = 0; e susceptíveis a cárie – CS, CPOS > 10). Os voluntários receberam profilaxia dental uma semana antes da coleta do biofilme e foram orientados a não realizar higiene oral por 48 horas, e não comeram ou beberam pelo menos uma hora anterior à coleta. Avaliações indicaram que o fluido do biofilme é supersaturado em relação ao esmalte e ao fosfato dicálcio diidratado ($\text{Ca.HPO}_4.2\text{H}_2\text{O}$), com um significante maior grau de saturação para aquele indivíduos livres de cárie. Os resultados sugeriram que o fluido do biofilme de indivíduos CF tem um maior potencial de remineralização em relação aos indivíduos CS.

De acordo com Tatevossian (1990b), de aproximadamente 82% de água no biofilme, apenas 30 a 35% é extracelular e permea toda a estrutura tridimensional da matriz do biofilme, os microrganismos e a superfície do dente. Esta porção pode ser obtida por centrifugação e é denominado fluido do biofilme. O fluido do biofilme tem aproximadamente duas vezes a capacidade tampão da saliva em repouso e contribui por volta de $\frac{1}{4}$ com a capacidade tampão total da placa. Este autor cita Carey *et al.* (1986); e Moreno & Margolis (1988), que afirmam que a capacidade tampão do fluido do biofilme é de interesse primário durante flutuações no pH, justamente porque esta é uma importante variável na determinação do grau de saturação no fluido do biofilme. Mais ainda, o autor afirma que o Ca e Pi são íons comuns na determinação das forças que conduzem o grau de

saturação, e este irá estabelecer o ponto no qual o esmalte sob o biofilme sofrerá desmineralização.

Margolis (1990), durante o simpósio sobre “Fluido da placa e propriedades da interface placa/esmalte”, apresentou as seguintes considerações: as mudanças químicas induzidas pela fermentação dos carboidratos da dieta por microrganismos específicos no biofilme são refletidas em mudanças na composição do fluido do biofilme dental. A magnitude de algumas dessas mudanças – por exemplo, mudanças na atividade de espécies de ácidos e no grau de saturação em relação aos minerais do esmalte – deve, em princípio, estar diretamente relacionada à intensidade do desafio cariogênico. Assim, a importância do fluido do biofilme no contexto da cárie dental estar relacionada às mudanças químicas induzidas pela atividade microbiana são refletidos no meio, o qual está em íntimo contato com a superfície do esmalte, e que este meio é acessível a análises químicas e bioquímicas.

Margolis & Moreno, em 1992, realizaram um estudo com o objetivo de estudar a composição do fluido do biofilme de indivíduos livres de cáries (CF) e cáries-positivos (CP) após exposição à sacarose. Em tempos selecionados (7, 15, 30 e 60 minutos) e após bochecho com sacarose a 10%, o biofilme foi coletado de superfícies com manchas brancas e superfícies íntegras dos dois grupos para cada indivíduo. O fluido foi isolado por centrifugação e analisados quanto a concentração de ácidos orgânicos, íons inorgânicos e pH. Antes da exposição à sacarose, o fluido do biofilme do grupo CF e de superfícies íntegras dos voluntários CP apresentaram maior valor de pH do que as amostras do grupo CP e de superfícies com mancha branca, respectivamente; por outro lado, a composição inorgânica foi similar. O fluido do biofilme dos voluntários em jejum mostrou ser supersaturado em relação ao esmalte e ter um grau significativamente maior nas amostras CF, sugerindo que o fluido no biofilme CF tem um maior potencial de remineralização que de indivíduos acometidos pela doença cárie. Para todos os tempos examinados, as médias de pH e grau de saturação do esmalte foram baixas e a concentração de ácido láctico foi maior nas amostras CP do que nas amostras CF. A concentração de Ca também aumentou no fluido do biofilme após exposição à sacarose em níveis similares nas amostras de indivíduos CF e CP, apesar da significativa menor produção de ácido nas amostras CF. Estes últimos resultados parecem estar associados com achados adicionais de que o

biofilme do grupo CF contém significativamente mais Ca do que as amostras dos indivíduos CP. A disponibilidade de íons minerais, como o Ca no biofilme, pode, portanto, ter um importante papel no controle da desmineralização do esmalte.

Em 1994, Carey *et al.* avaliaram a concentração de Ca no fluido do biofilme dental após um desafio cariogênico. Para isso, sete voluntários acumularam biofilme antes da coleta. Amostras do biofilme supragengival foram coletadas antes e cinco minutos após um bochecho de sacarose 10%. Os resultados obtidos mostraram que as concentrações de cálcio total e fosfato não alteraram significativamente.

Tenuta *et al.* (2006) realizaram um estudo com o objetivo de avaliar a concentração de Ca, Pi and F no fluido do biofilme dental formado *in situ*, bem como a cinética após a ingestão de carboidratos ou após a interrupção dos desafios cariogênicos. Dezesesseis voluntários utilizaram em 3 fases cruzadas de 15 dias, um dispositivo palatino contendo 8 blocos de esmalte humano, que foram expostos 8 vezes ao dia a água destilada deionizada (ADD), solução de glicose a 10% + frutose a 10% (GF) ou solução de sacarose a 20% (S). Após 14 dias de exposição à ADD ou aos carboidratos, os tratamentos foram invertidos no intuito de entender a relação entre os componentes inorgânicos do biofilme e o processo de desmineralização dental. Os resultados mostraram que as concentrações de Ca, Pi e F no biofilme total foram menores para os grupos GF e S do que para o grupo ADD ($p < 0,05$), mas esse efeito não foi observado no fluido. Após o desafio cariogênico, Ca aumentou e Pi diminuiu significativamente no fluido ($p < 0,05$), mas o F não se alterou ($p > 0,05$). Ca, Pi e F no biofilme total aumentaram significativamente 24 h após a suspensão do tratamento com GF ($p < 0,05$), e o mesmo efeito foi observado para o Ca após a suspensão do tratamento S, mas essas alterações não foram observadas no fluido ($p > 0,05$). Os autores concluíram que as diferenças na concentração de Ca, Pi e F no biofilme formado na presença ou ausência de sacarose não se refletem no seu fluido, onde ocorrem as trocas iônicas com o esmalte. Sugeriram que o alto conteúdo de reservas minerais do biofilme formado na ausência de sacarose poderia ser importante para uma menor cariogenicidade desse biofilme, porém ele seria esgotado por frequentes quedas de pH quando da exposição à carboidratos fermentáveis.

A dificuldade de entender o papel dos componentes inorgânicos do biofilme no processo de cárie dental está no fato que, durante a queda do pH, tanto os íons minerais presentes no biofilme, quanto àqueles da estrutura mineral do dente, serão mobilizados para o fluido do biofilme. Neste contexto, Correia *et al.* (2012) avaliaram a composição do fluido de biofilmes formados em substratos com diferentes graus de solubilidade após 5 min de exposição à carboidratos. Para isto, os autores conduziram um estudo *in situ*, cruzado, onde 10 voluntários utilizaram dispositivo palatino contendo blocos de esmalte, dentina e acrílico (controle) que foram expostos 8 vezes ao dia à solução de glicose 20% durante 4 dias. No 5º dia, o biofilme formado sob os diferentes substratos foram tratados com solução de glicose 20% ou água destilada, e coletados após 5 min para determinação da concentração de Ca, Pi e F na porção sólida e fluido do biofilme. O tratamento com água destilada foi considerado controle da exposição ao carboidrato. Os resultados mostraram que a composição inorgânica da porção sólida do biofilme não alterou significativamente em relação ao substrato no qual ele foi crescido (esmalte, dentina ou acrílico). Observaram ainda que houve um aumento significativo da concentração de Ca no fluido do biofilme após exposição à glicose quando comparado aos valores de baseline (água destilada), no entanto, não houve diferença estatisticamente significativa da quantidade destes íons disponibilizados em função do substrato. Os valores de Pi e F não mostraram um padrão específico quanto aos substratos ou aos tratamentos. Discutindo seus resultados, os autores destacaram a semelhante mobilização de íons Ca do biofilme formado sob o acrílico quando comparado ao esmalte e dentina. Estes resultados demonstram o potencial destes reservatórios em interferir na desmineralização dental.

2.4 Mecanismo de Retenção de Íons no Biofilme Dental

Em 1977, Rølla & Bowen sugeriram uma hipótese do mecanismo de retenção de íons no biofilme dental, em que íons Ca da saliva são ligados a grupos ácidos nas bactérias e os íons F são atraídos para o Ca ligado, como contra íons através de forças eletrostáticas.

Nesse sentido, Tatevossian (1981) talvez tenha sido o primeiro autor a avaliar a ligação de Ca em biofilmes dentais. Seu ensaio consistiu em calibrar um eletrodo íon seletivo com soluções de concentração conhecida de Ca e equilibrá-lo no padrão contendo 1 mM Ca, pH 7,0. Em seguida imergiu “pools” de biofilme dental coletado de voluntários e acompanhou a variação de milivoltagem em função do tempo, como indicador da diminuição da concentração de Ca na solução. Os resultados deste estudo mostraram que houve redução em 30% da concentração de Ca na solução (indicativo de ligação às bactérias) e a saturação foi alcançada nos primeiros 10 min.

O efeito do Ca na coesão do biofilme foi estudado por Edgar, em 1979, pela observação do índice de sedimentação de bactérias em solução tampão quanto a presença de Ca. Os autores observaram que a adição de Ca na suspensão de biofilme favoreceu a sedimentação, presumivelmente pela formação de partículas de maiores dimensões. Estes resultados suportam a hipótese de que cátions divalentes, particularmente o Ca, têm uma parcela na manutenção da estrutura do biofilme por favorecer a coesão entre elementos estruturais adjacentes. Os mecanismos físico-químicos envolvidos neste efeito podem incluir a neutralização de cargas negativas sobre a superfície das partículas adjacentes (macromoléculas aniônicas salivares ou bacterianas), reduzindo assim as forças eletrostáticas repulsivas e favorecendo a floculação, a formação de pontes iônicas divalentes entre as macromoléculas carregadas negativamente ou efeitos de solvatação.

São escassos na literatura os trabalhos que se ocuparam em avaliar a capacidade do biofilme de ligar Ca a grupamentos aniônicos presentes na superfície de bactérias e proteínas da matriz. Rose *et al.* (1993) estudaram a capacidade de ligação e afinidade de Ca à bactérias presentes na cavidade oral. Em uma câmara de diálise, separadas por uma membrana de celulose, bactérias do gênero estreptococos foram equilibradas com solução de CaCl₂ a 5 mmol/L por 2 horas. Íons Ca, por difusão, atravessavam a membrana e ligavam-se às bactérias no outro lado da câmara até que o equilíbrio fosse atingido. Os autores quantificaram a capacidade das bactérias de se ligar a Ca e determinaram a afinidade dos grupos bacterianos em adsorver e liberar estes íons em função do pH do meio. As espécies *S. sanguis* e *S. downei* (antigamente denominada de *S. mutans* sorotipo h) apresentaram capacidade de ligação, em pH 7,0, de $34,7 \pm 3,7$ e $41,5 \pm 5,4$ μmol de Ca/g

de *pellet* bacteriano, respectivamente. Em pH 5,0, apenas a capacidade de ligação da espécie *S. downei* foi determinada e os valores obtidos foram de $21,4 \pm 0,8$ μmol de Ca/g de *pellet*. Com essa redução de cerca de 50% na capacidade de ligação em função do pH, os autores concluíram que, no momento do desafio cariogênico, haveria liberação de Ca dos sítios de ligação da bactéria para o fluido do biofilme aumentando o grau de saturação do fluido em relação ao tecido mineral do dente, reduzindo a desmineralização. Adicionalmente, utilizando-se de artifícios matemáticos (equação de Hill), os autores perceberam que, na faixa de pH 6,5-7,0, a presença de Ca determinaria um cooperativismo positivo entre as bactérias e propuseram um modelo onde o Ca, por ser um íon divalente, se liga a dois grupamentos aniônicos, ou na mesma bactéria ou entre bactérias adjacentes. Estes autores ainda simularam uma condição de liberação de Ca em função da concentração presente no meio. Para isto, reequilibraram bactérias que haviam sido previamente tratadas com soluções contendo Ca, respectivamente com metade, um quarto, um oitavo da concentração inicialmente equilibrada. Observaram que a curva de liberação mostrou-se diferente da curva de ligação. Na tentativa de explicar este fenômeno, os autores propuseram que a presença de polímeros inespecíficos da parede bacteriana promovem uma interação célula-célula e isto pode interferir na liberação dos íons Ca ligados às bactérias.

Rose *et al.* (1997) avaliaram a capacidade de ligação de Ca dos grupamentos carboxílicos e fosfatos de diversas bactérias do biofilme dental. Seu estudo consistiu em isolar paredes celulares de *S. mutans*, *S. oralis*, *S. gordonii*, *S. downei*, *Actinomyces naeslundii* e *Lactobacillus casei*; manipulá-las de forma a remover os grupamentos fosfatos presentes ou mascarar grupamentos carboxílicos; e comparar a capacidade de ligação de Ca destes isolados com a de *pellets* de bactérias intactas. Os autores observaram que para os estreptococos, aproximadamente 75% da capacidade de ligação de Ca esteve relacionada aos grupamentos fosfatos. *Actinomyces* e *Lactobacillus* apresentam menor capacidade de ligar Ca quando comparado aos estreptococos, e os sítios de ligação predominantes nestas espécies foram os grupamentos carboxílicos.

Pouco se sabe sobre o mecanismo pelo qual íons fluoreto podem ficar retidos na porção orgânica do biofilme dental. Rose *et al.* (1996) propuseram um modelo no qual o F se liga a íon Ca que previamente estariam ligados à grupamentos aniônicos presentes na

parede bacteriana e proteínas da matriz. Através de equilíbrio de diálise, os autores observaram que os *S. mutans* na ausência de F, apresentavam capacidade de ligação de Ca em torno de $27,7 \pm 2,8 \mu\text{mol/g}$ de pellet bacteriano. Na presença de 5 mmol/l de F, a capacidade da bactéria em ligar Ca foi de aproximadamente o dobro ($55,0 \pm 8,6 \mu\text{mol/g}$ de pellet bacteriano) em pH 7,0. Em pH 5,0, houve uma redução na capacidade de ligação, porém manteve-se a proporção observada em pH 7,0 de aproximadamente o dobro da capacidade da bactéria de ligar Ca quando da presença de 5 mmol/l de F ($16,5 \pm 0,3 \mu\text{mol/g}$ na ausência de F; e $29,9 \pm 1,2 \mu\text{mol/g}$ na presença de F). Desta forma, os autores concluíram que o F seria capaz de quebrar a ligação divalente do Ca (Rose *et al.*, 1993), expondo uma carga positiva para sua posterior ligação. Além disso, com a queda do pH, como produto da exposição do biofilme a carboidratos fermentáveis, os grupamentos aniônicos seriam protonados, liberando Ca e F para o fluido do biofilme para participar da dinâmica de des-remineralização. O modelo proposto por estes autores de retenção de íons Ca e F no biofilme dental é amplamente aceito na comunidade científica. Ainda assim, não há um consenso na literatura se o biofilme pode ser considerado um bom reservatório de íons, disponibilizando-os para o fluido do biofilme no momento do desafio cariogênico, pois pouco se sabe sobre suas cinéticas de ligação em condições próximas às encontradas *in vivo*.

Vogel *et al.* (2008) reconhecendo as baixas concentrações de Ca no biofilme dental e a importância de conduzir estratégias para potencializar a formação de reservatórios no biofilme dental principalmente em relação ao fluoreto, avaliaram o efeito de um pré-bochecho com 150 mM de lactato de cálcio, no aumento da concentração de F na parte sólida e fluida do biofilme. Para isto, 13 voluntários abstiveram-se da escovação para acúmulo de biofilme por 48 horas e foram aleatorizados em um delineamento cruzado de 4 grupos de tratamento: (1) nenhum bochecho (controle); (2) bochecho por 1 min com 10 mL de solução de lactato de cálcio; (3) bochecho com solução NaF 228 ppm; e (4) bochechos com as soluções do grupo 2 e 3, nesta ordem. O biofilme foi então coletado 1 hora após a exposição ao tratamento e processado de forma a separar a parte sólida do fluido do biofilme. Os resultados mostraram que o pré-bochecho com Ca seguido de uma exposição ao bochecho fluoretado determinou a um aumento na concentração de íons

fluoreto de 12 vezes no biofilme total e de 5 vezes no fluido do biofilme. Ainda que diante de resultados tão satisfatórios, os autores lembram que a importância destes reservatórios estará na sua capacidade de perdurar por um significativo período de tempo.

Diante do que foi exposto, esta revista da literatura mostra o interesse dos pesquisadores em estudar a relação entre a composição inorgânica do biofilme dental e a sua cariogenicidade. Ademais, não há um consenso na literatura se o biofilme pode ser considerado um bom reservatório de íons, disponibilizando-os para o fluido do biofilme no momento do desafio cariogênico. Desta forma, visando um maior entendimento do processo de retenção de Ca e F em biofilmes bacterianos, faz-se necessário avaliar a cinética de ligação e liberação de Ca e F na superfície de bactérias dominantes no biofilme dental.

3 PROPOSIÇÃO

O presente estudo teve como objetivo:

1. validar uma metodologia *in vitro* para estudar a cinética de ligação e liberação de íons da superfície de bactérias do biofilme dental;
2. estudar a ligação e liberação de Ca a *Streptococcus mutans* em função da concentração e do tempo;
3. estimar o potencial de liberação destes íons da superfície bacteriana em uma condição que simula a queda do pH induzida por um desafio cariogênico;
4. avaliar a cinética de ligação de F a *Streptococcus mutans* mediada por Ca.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

No presente trabalho, foram realizados estudos sequenciais *in vitro* para validar a metodologia de ligação dos íons Ca e F à bactéria *Streptococcus mutans* e avaliar a capacidade de ligação e liberação destes íons da superfície bacteriana. Por se tratarem de estudos interdependentes, alguns resultados obtidos serão referenciados antecipadamente para facilitar o entendimento do estudo subsequente. Antes disto, será descrito o modo de obtenção dos *pellets* (precipitados) bacterianos que foram utilizados nos experimentos.

4.1 Cultivo bacteriano e obtenção do *pellet* experimental

A espécie *Streptococcus mutans* foi escolhida para realização deste estudo, pois o gênero estreptococos é dominante no biofilme dental e apresenta alta capacidade de ligar íons divalentes em grupamentos aniônicos presentes na parede bacteriana, principalmente pela presença do ácido teicóico/lipoteicóico (Rose *et al.* 1993; 1997). Em acréscimo, a espécie *S. mutans* é aquela mais fortemente relacionada ao processo de formação da cárie dental.

Assim, uma cultura de estoque de *S. mutans* cepa Ingbritt 1600 foi reativada em caldo BHI por 18 h, a 37 °C em atmosfera de 10% CO₂. A cultura foi semeada em placas de ágar sangue, incubada a 37 °C em atmosfera de 10% CO₂ por 24 h, com o objetivo de obter colônias isoladas e certificar a pureza da cultura. Cinco a seis colônias foram transferidas para 100 mL do caldo de cultura tioglicolato (tioglicolato 2,4%; extrato de carne 1,2%; carbonato de cálcio 1,5%; e glicose 0,5%), que foi mantido por 18 h a 37 °C em atmosfera de 10% CO₂. Este caldo foi considerado cultura de estoque para todos os experimentos, tendo sido mantida, por no máximo 7 dias, a 4 °C até o momento do preparo da cultura final para o experimento. Para isso, uma alíquota de 8 mL da cultura em tioglicolato foi transferida para 500 mL do caldo Tryptona + Extrato de Levedura (TYB), suplementado com 0,25% de glicose. De acordo com Zero *et al.* (1986), essa é a concentração basal de glicose necessária para crescimento desta cepa sem a formação de reservas internas de carboidratos fermentáveis (polissacarídeos intracelulares), evitando assim metabolização

destas durante os ensaios *in vitro*. Após o crescimento no caldo TYB por 18 h a 37 °C, 10% de CO₂, a cultura foi centrifugada a 10.000 g, 4 °C, 10 minutos; lavada e sonicada (7 W, 1 min) com tampão PIPES 0,05 M (piperazina-1, 4-bis [ácido 2-etanosulfônico], Sigma Aldrich), pH 7,0, para eliminar restos do meio de cultura. Em seguida foi novamente centrifugada, o sobrenadante foi descartado, e ao precipitado bacteriano foi adicionado solução de EDTA 0,01 M para complexação de íons Ca remanescentes, sendo repetidos os passos de sonicação, centrifugação e descarte do sobrenadante. Por fim, ao precipitado bacteriano foi novamente adicionado tampão PIPES 0,05 M, pH 7,0, para garantir a completa eliminação da solução de EDTA, que foi em seguida centrifugado e descartado o sobrenadante.

Para obtenção de *pellets* experimentais com homogeneidade em relação ao peso (usado para expressar a concentração de Ca e F ligados às bactérias), a massa bacteriana foi ressuspendida em 15 mL de tampão PIPES, homogeneizada por vortexação e alíquotas foram transferidas para tubos de microcentrífuga pré-pesados com auxílio de pipetas automáticas (volumes definidos em estudo piloto prévio). Em seguida os tubos foram centrifugados (21.000 g, 5 min, 4° C) e o sobrenadante foi cuidadosamente eliminado com auxílio de micropipetas sob microscópio (Figura 1). Essa centrifugação foi repetida duas vezes a fim de eliminar totalmente o resíduo de solução tampão e permitir a determinação adequada do peso úmido do *pellet* obtido. Para isso, os tubos foram novamente pesados (\pm 0,01 mg), sendo obtido por diferença o peso de *pellet*.

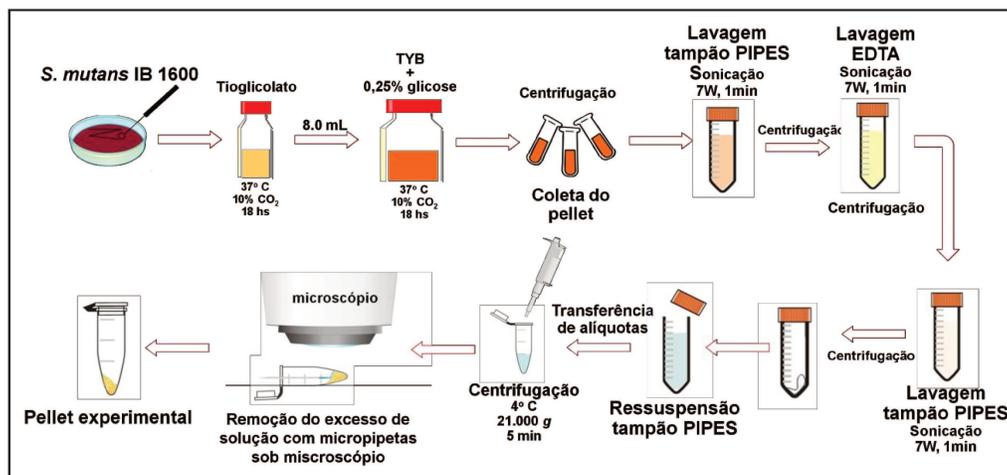


Figura 1. Preparo do *pellet* experimental de *S. mutans* a partir de uma cultura de estoque da cepa IB 1600.

4.2 Estudo da viabilidade bacteriana e controle do pH da solução tratamento

Com o intuito de avaliar se o tempo máximo para estudo da ligação e liberação de Ca e F às bactérias seria adequado em relação a viabilidade bacteriana, e se a capacidade tampão das soluções tratamento utilizadas seria suficiente para manutenção do pH durante todo o tempo experimental, um estudo prévio foi realizado onde o *pellet* bacteriano foi exposto às mesmas soluções e condições que foram utilizadas nos experimentos que serão descritos ao longo deste tópico.

Assim, após adição das soluções tratamento e sonicação por 15 s, 7 W, e ao término do tempo máximo de tratamento para cada estudo realizado, uma alíquota de 100 μ L foi coletada e diluições decimais foram realizadas em NaCl 0,9%. As diluições 10^{-3} à 10^{-8} foram semeadas em placas de BHI ágar e incubadas à 37 °C, 10% CO₂ por 48 h. O número de unidades formadoras de colônia (UFC) foi determinado e os resultados expressos em UFC/mg de *pellet* bacteriano.

Para controle do pH da solução tratamento, o *pellet* bacteriano ao fim do tratamento foi centrifugado (21.000 g, 4 °C, 5 min), o sobrenadante foi coletado e seu pH determinado utilizando fitas indicadoras com sensibilidade de 0,5 unidade (Merck, Germany).

4.3 Validação do protocolo experimental

Em todos os experimentos realizados neste estudo, a quantidade de Ca e F ligados à superfície bacteriana foi estimada extraindo-se do *pellet*, após tratamento com as respectivas soluções, a concentração total de Ca e F (por extração ácida, conforme descrito por Cury *et al.* 1997). Para assegurar que o resultado obtido refere-se a quantidade de íons ligada à superfície de *S. mutans* e não a íons apenas retidos no fluido da massa bacteriana, dois experimentos foram conduzidos com o objetivo de validar o protocolo experimental: um deles para a ligação de Ca e outro para a ligação de F. Nesses experimentos, *pellets* bacterianos foram equilibrados com tampões contendo concentração conhecida de Ca ou F, priorizando uma baixa proporção de volume de solução por peso bacteriano, de modo a

permitir a determinação da redução da concentração destes íons na solução e confirmar sua ligação às bactérias.

Para validação da ligação de íons Ca, *pellets* bacterianos obtidos a partir da cultura de *S. mutans* foram tratados com solução tampão PIPES contendo 1 ou 10 mM Ca (concentrações encontradas no fluido do biofilme em repouso e durante uma queda de pH [Tenuta *et al.* 2006; Margolis & Moreno 1992]), por 60 minutos, 37 °C, na proporção de 15 mL/g para o grupo 1 mM Ca; e 7,5 mL/g para o grupo 10 mM Ca. O tampão PIPES foi escolhido por apresentar insignificante afinidade por íons Ca (Good & Izawa, 1972), assegurando que o veículo utilizado nos tratamentos não influenciaria nos resultados. A proporção diferenciada para os grupos 1 e 10 mM foi calculada baseando-se nos valores da capacidade de ligação de Ca encontrada Rose *et al.* (1993), de modo a possibilitar a observação da redução na concentração de Ca da solução tratamento.

Após 60 min de equilíbrio, a suspensão bacteriana foi centrifugada (21.000 g, 5 min, 4 °C); o sobrenadante foi coletado para determinação da concentração de Ca residual; o remanescente de solução tratamento foi cuidadosamente removido com auxílio de micropipetas sob microscópio, a fim de garantir a não contaminação da etapa seguinte, na qual o *pellet* bacteriano foi tratado com HCl 0,5 M por 3 horas (Cury *et al.* 1997) para extrair todo Ca ligado à superfície bacteriana (Figura 2).

Para validação da ligação de íons F, mediada por Ca, às bactérias, o *pellet* bacteriano foi previamente equilibrado por 10 min com solução contendo 1 ou 10 mM Ca, uma alíquota foi coletada para determinação baseline de F e a suspensão foi centrifugada a fim de recuperar o *pellet* enriquecido com Ca. Este *pellet* resultante foi em seguida tratado com solução contendo a mesma concentração de Ca usada no tratamento inicial, e 52,6 µM F (1 ppm F), na proporção 1,5 mL/g, 37 °C, 60 min. As concentrações de Ca e F utilizadas não excedem o produto de solubilidade do mineral “CaF₂”, evitando que haja precipitação desse mineral durante o teste. Após 60 min, a suspensão bacteriana foi centrifugada; o sobrenadante coletado para determinação da concentração de F residual; o remanescente de solução tratamento foi cuidadosamente removido com auxílio de micropipetas sob microscópio; e o *pellet* bacteriano foi tratado com HCl 0,5 M por 3 horas para extrair todo F ligado.

Todos os experimentos foram repetidos 3 vezes (n=3), com triplicata de amostra em cada repetição.

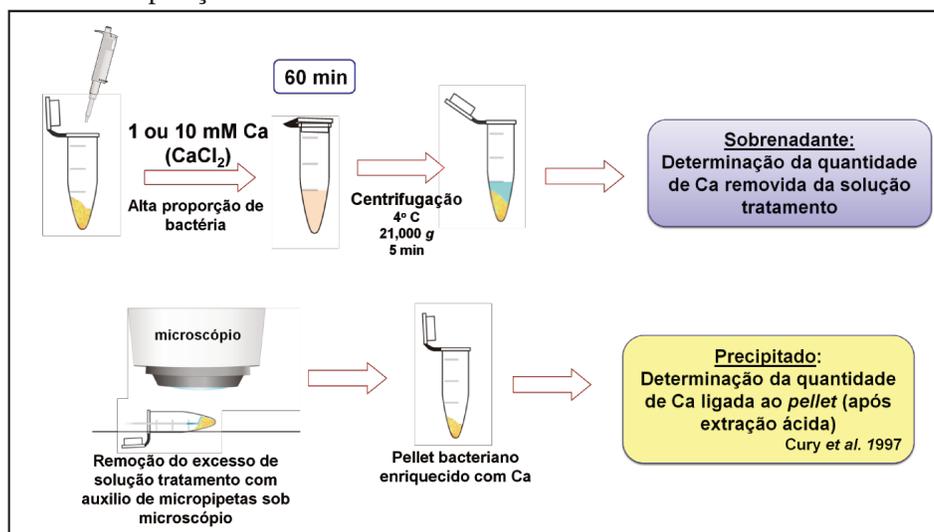


Figura 2. Adição da solução tratamento contendo concentração conhecida de Ca ao *pellet* bacteriano obtido da cultura de *S. mutans* IB 1600; equilíbrio por 60 min a 37°C e centrifugação para separação da solução tratamento e *pellet*. Coleta do sobrenadante e determinação da concentração de íons. O remanescente de solução tratamento sobre o *pellet* foi eliminado com auxílio de micropipeta acoplada a bomba a vácuo, sob microscópio e ao precipitado foi adicionado HCl 0,5 M para extração dos íons ligado às bactérias.

4.4 Estudos para avaliar a ligação e liberação de Ca a *S. mutans* em função do tempo e do pH

4.4.1 Estudo 1: Cinética e capacidade de ligação de Ca a *S. mutans*

Visando avaliar a importância da ligação de Ca às bactérias do biofilme dental, como reservatório de íons a serem liberados para o fluido do biofilme ou mesmo como sítio para posterior ligação de F, a capacidade e cinética de ligação de Ca à *S. mutans* foi avaliada neste estudo. *Pellets* bacterianos foram tratados com tampão PIPES 0,05 M contendo 0 (controle), 1 ou 10 mM Ca (concentrações encontradas no fluido do biofilme em repouso e durante uma queda de pH [Tenuta *et al.* 2006; Margolis & Moreno 1992]), pH 7,0, a 37 °C, na proporção 150 mL/g de *pellet* bacteriano, por até 60 min. Assim, 5, 10, 30 e 60 min após a exposição das bactérias ao tampão contendo Ca, os tubos contendo as amostras foram centrifugados, o sobrenadante descartado e o *pellet* resultante analisado

quanto à concentração total de Ca ligado (após extração com HCl 0,5 M) (Figura 3a). A alta proporção de solução tratamento por peso utilizada neste estudo assegurou que não ocorresse alteração significativa da concentração de Ca nas soluções tratamento durante o experimento. Para a construção de curvas da cinética de ligação de Ca à superfície de *S. mutans*, a concentração de Ca em *pellets* não tratados foi considerada como tempo 0 na curva de ligação.

Adicionalmente, *pellets* bacterianos pré-tratados com Ca na concentração de 1 mM por 10 min foram reequilibrados com tampão contendo 10 mM de Ca por 10, 30 e 60 min, a 37 °C, a fim de avaliar a capacidade e cinética de ligação de Ca em bactérias previamente expostas a Ca (mais próximo da situação clínica, p.ex., quando um bochecho de solução contendo Ca é realizado).

Em todo o estudo, para cada tempo testado, foram utilizados 2 tubos e os experimentos foram repetidos 3 vezes (n=3). O gráfico da concentração de Ca ligado em função do tempo foi construído e parâmetros da cinética de ligação foram calculados.

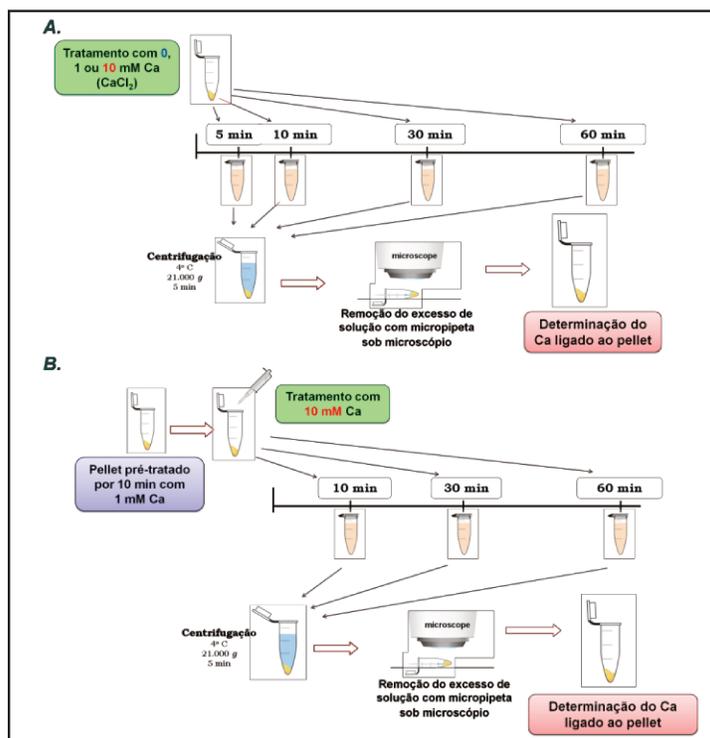


Figura 3. A. Delineamento experimental utilizado para determinar a máxima capacidade e a curva de cinética de ligação de Ca à *S. mutans*. B. Avaliação da capacidade de enriquecimento do reservatório de íons ligado à bactéria.

4.4.2 Estudo 2: Cinética de liberação de Ca ligado a *S. mutans*

Em acréscimo ao estudo anterior, torna-se relevante estudar a manutenção do Ca ligado às bactérias em função do tempo, i.e., em quanto tempo o biofilme enriquecido com Ca perde esse reservatório.

Assim, o *pellet* bacteriano previamente tratado com solução de Ca a 1 ou 10 mM por 10 min (tempo que levou a máxima capacidade de ligação de acordo com o experimento anterior), foi equilibrado com solução tampão PIPES livre de cálcio, pH 7,0, na proporção de 150 mL/g *pellet*. Adicionalmente, as bactérias previamente tratadas com a solução de Ca contendo 10 mM foram equilibradas na mesma proporção, com tampão PIPES contendo 1 mM de Ca. Um grupo controle no qual as bactérias foram pré-tratadas com tampão PIPES sem Ca foi adicionado. Assim, após 10, 30 e 60 min, os tubos contendo as amostras foram centrifugados (21.000 g, 5 min, 4 °C), o sobrenadante coletado e o *pellet* resultante analisado quanto à concentração remanescente de Ca ligado após extração com HCl 0,5 M (Figura 4). O sobrenadante (solução tratamento após equilíbrio) também foi analisado quanto à concentração de Ca, de modo a assegurar que não houve alteração de sua concentração pela quantidade de Ca que saiu do *pellet* bacteriano após o equilíbrio.

Foram realizadas três repetições deste experimento (n=3) e para cada tempo testado, foram utilizados 2 tubos (análise em duplicata). Um gráfico de liberação do Ca ligado às bactérias em função do tempo foi construído e parâmetros da cinética de liberação foram calculados.

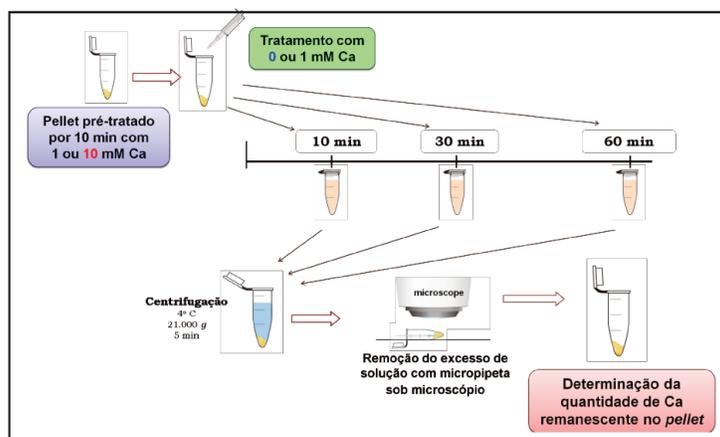


Figura 4. Delineamento experimental utilizado para determinar a liberação de Ca previamente ligado ao *pellet* bacteriano.

4.4.3 Estudo 3: Liberação de Ca ligado a *S. mutans* em função do pH

A importância do reservatório de íons ligado à superfície de bactérias está na sua capacidade de manter-se por um longo período de tempo e, principalmente, ser liberado para o fluido do biofilme durante a queda do pH, funcionando como tampão iônico para diminuir a desmineralização dental. A fim de determinar a capacidade de Ca ligado à superfície bacteriana de enriquecer o fluido do biofilme após a queda do pH, este estudo foi realizado.

Assim, bactérias pré-tratadas com 1 ou 10 mM de Ca foram reequilibradas com tampão acetato 0,5 M, pH 5,0, 37 °C, por 10 min (simulando o tempo em que o pH fica próximo de 5,0 como resultado de um desafio cariogênico (Stephan, 1944)), na proporção de 30% de volume de solução tratamento por peso de *pellet* bacteriano (semelhante à proporção de fluido/estroma do biofilme encontrada *in vivo* (Tatevossian, 1990b)). Como controles, soluções com pH 7,0 (PIPES) ou ácido clorídrico a 0,5 M (pH 1,86) foram utilizados no estudo. Todas as soluções tratamento continham a mesma concentração de Ca utilizada para o pré-tratamento das bactérias para evitar o efeito da menor concentração de íons Ca no fenômeno da liberação. A concentração final de Ca na solução tratamento foi considerada como indicativo da liberação de Ca em função do pH (Figura 5).

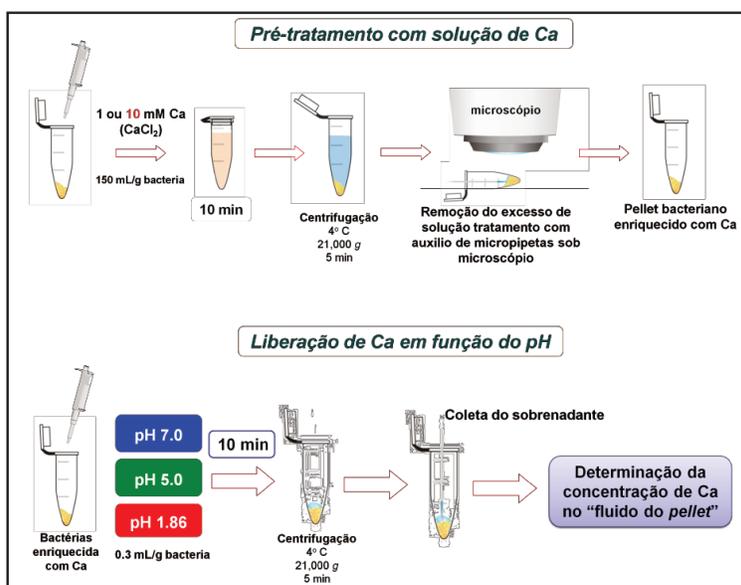


Figura 5. Delineamento experimental do estudo para avaliar o efeito do pH na liberação de Ca a partir de reservatório de íons ligados às bactérias.

4.5 Estudo 4: Estudo da cinética e capacidade de ligação de F a *S. mutans*

O presente experimento foi realizado para avaliar a cinética de ligação de F mediado por Ca à *S. mutans* e o efeito da presença de F no meio na ligação de Ca às bactérias.

Pellets bacterianos obtidos de uma cultura de *S. mutans* cultivada em meio TYB suplementado com 0,25% de glicose foram tratados com solução 1 ou 10 mM de Ca contendo 52,6 μ M F (1 ppm – concentração encontrada na água de abastecimento fluoretada, que tem comprovado efeito anticárie (McDonagh *et al.* 2000), e que não ultrapassa o limite de solubilidade do mineral CaF_2 (McCann, 1968)), por 5, 10, 30 e 60 min, a 37 °C, na proporção de 150 mL/g de *pellet*. Grupos controles que foram tratados com tampão PIPES livre de Ca e F, contendo apenas 1 mM de Ca ou 10 mM Ca, ou ainda, contendo apenas 1 ppm F, foram incluídos nos 60 min de experimento.

Em função do tempo, os tubos contendo a suspensão bacteriana foram centrifugados, o sobrenadante descartado, e o *pellet* resultante analisado quanto à quantidade de Ca e F ligado. Da mesma forma que os demais, foram realizadas três repetições deste experimento (n=3) e para cada tempo testado, foram utilizados 2 tubos (análise em duplicata). A curva de cinética de ligação de F foi determinada.

4.6 Análises da concentração de Ca e F

4.6.1 Ca e F ligado aos *pellets* bacterianos

Os *pellets* bacterianos foram tratados com ácido clorídrico 0,5 M, na proporção de 0,1 mL/10 mg de *pellet*, por 3 h em temperatura ambiente (Cury *et al.* 1997) para extração total do Ca e F presentes, centrifugados (11.000 g, 3 min) e o sobrenadante ácido foi coletado.

Para determinação da concentração de Ca foi utilizado o reagente colorimétrico Arsenazo III (Vogel *et al.* 1983). Os padrões de concentração de Ca conhecida continham HCl 0,5 M, assim como as amostras. Na reação foi adicionado igual volume de NaOH 0,5

M para neutralização do ácido, previamente à adição do Arsenazo III. A dosagem foi feita em placas de 96 poços, num leitor de microplacas (Multiskan Spectrum, Thermo), sendo determinada a absorbância das misturas a 650 nm.

Para a dosagem de F no extrato ácido, foi utilizado um eletrodo específico para o íon, adaptado para microanálise. Padrões de concentração conhecida de F contendo HCl 0,5 M foram usados como referência. Padrões e amostras foram neutralizados com NaOH 2,5 M (uma parte para 5 partes de amostra) e tamponados com uma parte de TISAB III para 10 partes de amostra. A concentração de F foi determinada aplicando-se as amostras ou padrões na superfície do cristal sensível a fluoreto do eletrodo íon-específico, sob óleo mineral, utilizando micropipetas. Sob microscópio, um microeletrodo de referência foi trazido em contato com cada uma das amostras, fechando o circuito e permitindo a determinação da concentração de fluoreto através de um potenciômetro (Vogel *et al.* 1997).

4.6.2 Ca e F nas soluções tratamento inicialmente e após o tratamento

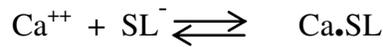
Da mesma forma que para o extrato ácido, a dosagem de Ca e F nas soluções tratamento foi realizada utilizando reagente colorimétrico Arsenazo III e eletrodo íon específico adaptado para microanálise. Porém, foram confeccionados padrões de concentração conhecida destes íons em tampão PIPES 0,05 M, acetato 0,5 M e HCl 0,5 M para que amostras e padrões estivessem na mesma condição. Para as amostras e padrões em HCl 0,5 M, neutralização prévia com NaOH foi realizada para ajuste do pH.

4.7 Análise dos Dados

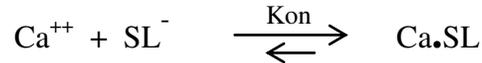
4.7.1 Curvas de cinética de ligação e liberação

Os dados dos experimentos de cinética de ligação e liberação foram interpretados como fenômenos bioquímicos e a seguir algumas considerações teóricas serão apresentadas para facilitar o entendimento.

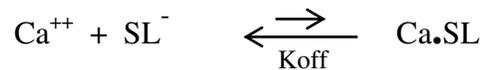
A ligação de íons Ca a grupamentos aniônicos presentes na parede bacteriana de *S. mutans* se dá por interação iônica e segue a lei de ação das massas:



Onde, Ca^{++} , representa íons Ca divalentes presentes na solução (ligante); e SL^{-} , sítios de ligação aniônicos presentes na parede bacteriana (receptor). Em um experimento de cinética de ligação, o objetivo é avaliar a velocidade com que, ligante mais receptor, interagem para formar o complexo ligante-receptor, ou seja, o número de eventos de ligação por unidade de tempo.



Já em um experimento de cinética de liberação, o objetivo é avaliar a velocidade com que o complexo ligante-receptor tende a se desfazer por unidade de tempo.



Em um dado tempo, a constante de associação (K_{on}) e a constante de dissociação (K_{off}) tendem a se igualar e então a equação entra em equilíbrio. Nesse momento, é possível calcular o grau de afinidade entre o ligante e o receptor. Este se traduz na constante de equilíbrio (K_d) e na meia-vida que são definidas, respectivamente, como a concentração e o tempo que metade dos sítios de ligação disponíveis estão ocupados pelo ligante. Importante destacar que quanto menores os valores de K_d , maior é o grau de afinidade entre o ligante e o receptor.

O software GraphPad Prism 5 (GraphPad software Inc. 2007) foi utilizado para ajustar os dados obtidos e calcular estas variáveis a partir das equações descritas abaixo, além da máxima capacidade de ligação para cada concentração e o platô de liberação alcançado para cada condição testada.

Para o experimento de cinética de ligação, foi utilizada a seguinte equação:

$$[\text{Ca}_b] = \text{Ca}_{b \max} * \{ 1 - \exp^{[-1 * (\text{Kon} * [\text{Caf}] + \text{Koff}) * t]} \}$$

Onde:

$[\text{Ca}_b]$ = quantidade de Ca ligado

$\text{Ca}_{b \max}$ = máxima ligação alcançada no equilíbrio

K_{on} = constante de associação

[Ca_f] = concentração de Ca na solução tratamento
K_{off} = constante de dissociação
t = tempo em minutos.

Para o experimento de cinética de liberação, foi utilizada a equação:

$$[Ca_b] = (Ca_{b0} - Ca_{\infty}) * \exp^{(-K_{off} * t)} + Ca_{\infty}$$

Onde, Ca_{b0} = quantidade de Ca ligado no tempo zero e Ca_∞ = quantidade de Ca que permanece ligado no tempo infinito (platô de liberação).

A constante de equilíbrio (Kd) foi determinada pela razão entre K_{off} e K_{on} e a meia-vida, pela razão entre o logaritmo natural (ln = 2,72) e o valor de Kd.

4.7.2 Análise estatística

A quantidade de íons removida da solução tratamento e ligada ao *pellet* bacteriano no experimento de validação do protocolo experimental foi comparada por teste *t* pareado. Também foram comparadas por teste *t* pareado as concentrações de Ca ou F na solução tratamento, inicial ou após os testes, bem como as concentrações de Ca ou F ligados às bactérias, antes e após os testes.

No experimento de liberação em função do pH, as concentrações iniciais e finais de Ca nas soluções tratamento foram comparadas por teste *t* pareado, individualmente para cada pH testado. A diferença de liberação de Ca para as bactérias pré-tratadas com 1 ou 10 mM Ca, nos diferentes tratamentos, foi analisada por teste *t*.

Em todas as análises, foi verificada a normalidade de distribuição dos erros e a homocedasticidade dos dados, que foram atendidas em todas as comparações feitas, sem a necessidade de transformação dos dados. O sistema SAS (versão 9.2) foi usado para as análises, e o limite de significância adotado em 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Estudo da viabilidade bacteriana e controle do pH da solução tratamento

A viabilidade bacteriana foi preservada durante o tempo máximo dos experimentos (inicial: $1,73 \pm 0,33 \times 10^8$; após 60 min: $3,07 \pm 1,51 \times 10^8$ UFC/mg *pellet*) e o pH da solução tratamento nos diversos experimentos após o equilíbrio com às bactérias foi semelhante ao inicial.

5.2 Validação do protocolo experimental

Conforme mostrado na Figura 6, houve significativa redução da concentração de Ca na solução tratamento após 60 min de equilíbrio com as bactérias ($p < 0,05$). Ademais, houve um significativo aumento da concentração de Ca ligado ($\mu\text{mol/g}$) nos grupos experimentais (1 e 10 mM Ca), quando comparado ao *pellet* experimental sem exposição às soluções tratamento (Figura 7) ($p < 0,05$). A Tabela 1 mostra que a quantidade de Ca removida da solução não diferiu significativamente da quantidade extraída do *pellet* bacteriano ($p > 0,05$). Desta forma, o modelo experimental foi validado como capaz de determinar íons Ca removidos da solução por ligação à parede bacteriana e não apenas retidos no fluido do *pellet* bacteriano.

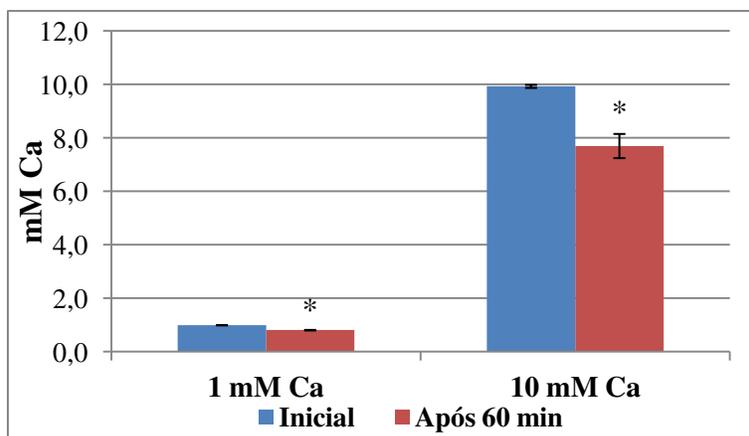


Figura 6. Concentração de Ca (mM, média \pm dp; n = 4) na solução tratamento, inicialmente e após 60 min de equilíbrio com o *pellet* bacteriano na proporção de 15 mL/g para o grupo 1 mM Ca; e 7,5 mL/g para o grupo 10 mM Ca. * Valores iniciais e finais diferem estatisticamente (teste *t* pareado; $p < 0,05$).

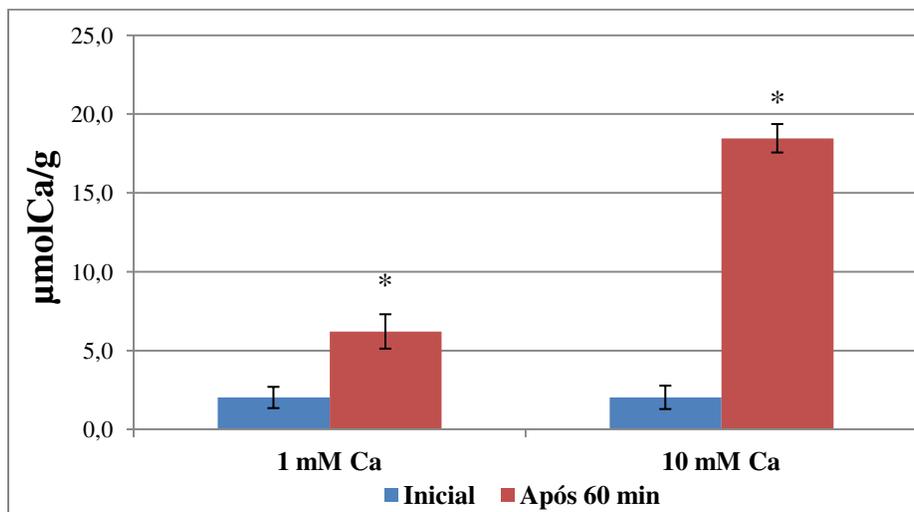


Figura 7. Concentração de Ca ligado às bactérias ($\mu\text{mol/g}$, média \pm dp; $n = 3$) no *pellet* experimental antes e após 60 min de exposição às soluções contendo 1 ou 10 mM Ca. * Valores iniciais e finais diferem estatisticamente (teste t pareado; $p < 0,05$).

Tabela 1. Quantidade de Ca removido da solução tratamento e ligado ao *pellet* bacteriano após 60 min de exposição das bactérias às soluções contendo 1 ou 10 mM Ca (μmol , média \pm dp; $n = 4$). Quantidade de Ca removida da solução e ligada ao *pellet* bacteriano não diferem estatisticamente (teste t pareado, $p > 0,05$).

Tratamento	Ca removido da solução	Ca ligado ao <i>pellet</i> bacteriano
1 mM Ca*	0,29 \pm 0,08	0,28 \pm 0,09
10 mM Ca**	1,90 \pm 0,41	1,83 \pm 0,26

*utilizada na proporção de 15 mL/g de bactéria

** utilizada na proporção de 7,5 mL/g de bactéria

Para o F, pode-se observar na figura 8 que houve significativa redução da concentração da solução tratamento ($p < 0,05$). Além disso, houve um significativo aumento da quantidade de íons ligado ao *pellet* bacteriano após 60 min de tratamento para os dois grupos experimentais quando comparado aos valores de baseline (coletado após o pré-tratamento com Ca) (Figura 9) ($p < 0,05$). A comparação direta entre a quantidade de íons subtraído da solução (nmol) e adicionado ao *pellet* bacteriano após a exposição às soluções tratamento mostrou-se estatisticamente diferente para o grupo pré-tratado com 1 mM Ca ($p < 0,05$), o que não foi observado para o grupo pré-tratado com 10 mM Ca ($p > 0,06$).

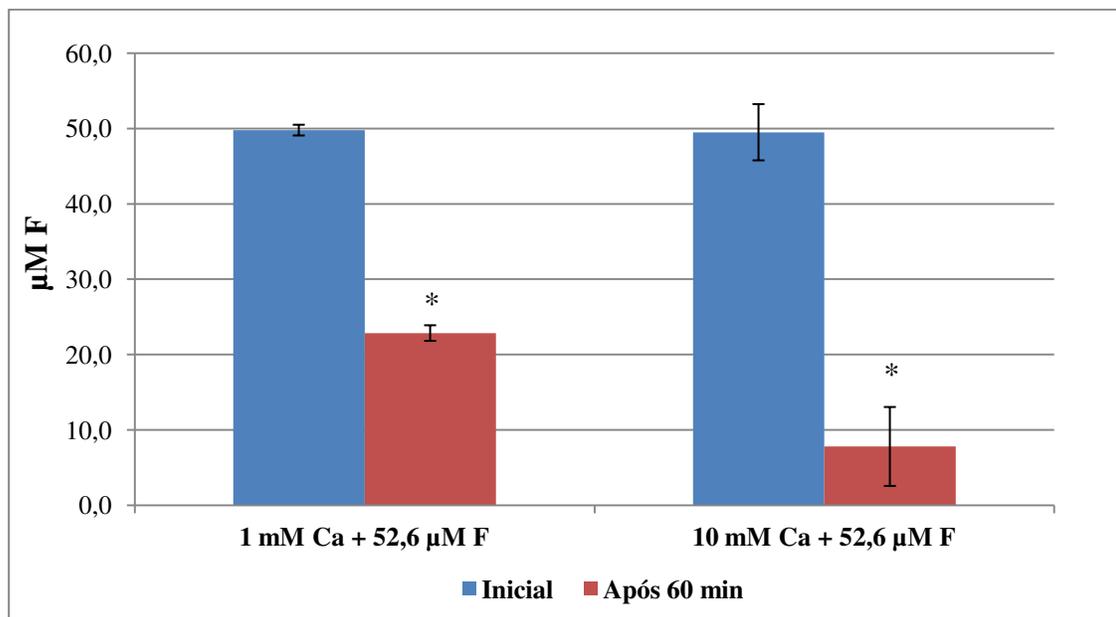


Figura 8. Concentração de F (μM ; média \pm dp; $n=3$) na solução tratamento inicialmente e após 60 min de equilíbrio das bactérias com soluções contendo 1 mM Ca + 52,6 μM F ou 10 mM Ca + 52,6 μM F. * Valores iniciais e finais diferem estatisticamente (teste t pareado; $p<0,05$). Experimento realizado com 1,5 mL de solução tratamento/g de *pellet* bacteriano.

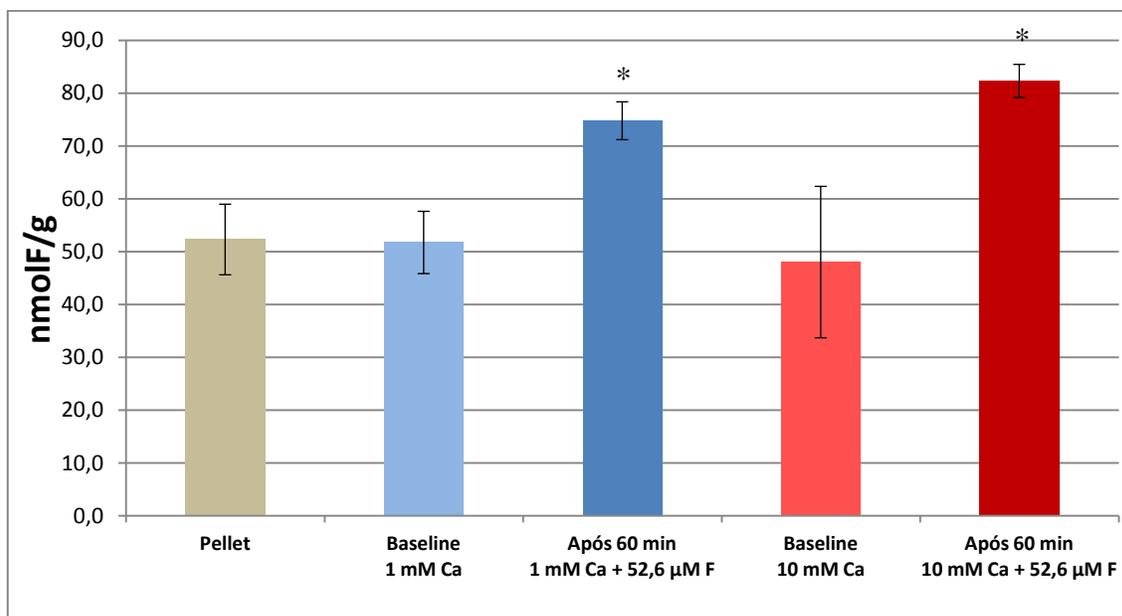


Figura 9. Concentração de F ligado (nmolF/g; média \pm dp; $n=3$) no *pellet* bacteriano, nos *pellets* pré-tratados apenas com solução contendo 1 ou 10 mM Ca (baseline) e após exposição destas às soluções contendo 1 mM de Ca + 52,6 μM F; 10 mM Ca + 52,6 μM F. * Valores baseline e finais diferem estatisticamente (teste t pareado; $p<0,05$). Experimento realizado com 1,5 mL de solução tratamento/g de *pellet* bacteriano.

Tabela 2. Quantidade de F removido da solução tratamento e ligado ao *pellet* bacteriano após saturação das bactérias com 1 ou 10 mM Ca, seguido de tratamento por 60 min com soluções contendo 1 mM Ca + 52,6 μ M F ou 10 mM Ca + 52,6 μ M F (nmol F, média \pm dp; n = 3). Quantidade de F removida da solução e ligada ao *pellet* bacteriano difere estatisticamente no grupo tratado com 1 mM Ca + 52,6 μ M F ($p < 0,05$), mas não difere no grupo tratado com 10 mM Ca + 52,6 μ M F (test t pareado, $p > 0,06$).

Tratamento	F removido da solução	F ligado ao <i>pellet</i> bacteriano
1 mM Ca + 52,6 μ M F*	4,25 \pm 0,44	2,43 \pm 0,71
10 mM + 52,6 μ M F*	6,11 \pm 0,34	3,30 \pm 0,99

* utilizado na proporção de 1,5 mL/g de bactéria

5.3 Cinética e capacidade de ligação de Ca à *S. mutans*

A Figura 10 mostra os resultados da cinética de ligação de Ca a *S. mutans*. O gráfico mostra que a quantidade ligada no *pellet* bacteriano está em função da concentração de Ca presente no meio e mostrou ser um fenômeno rápido onde é possível observar mais de 90% do Ca ligado nos primeiros 5 min. Os dados da tabela 5 mostram que a constante no equilíbrio (K_d) é da ordem de 10^{-3} M para os dois grupos de tratamento, sendo menor para o grupo tratado com 1 mM quando comparado ao grupo tratado com 10 mM (Tabela 3). A quantidade de Ca ligada no tratamento com 10 mM de Ca foi a mesma independentemente das bactérias estarem ou não saturadas com 1 mM de Ca (Figura 9).

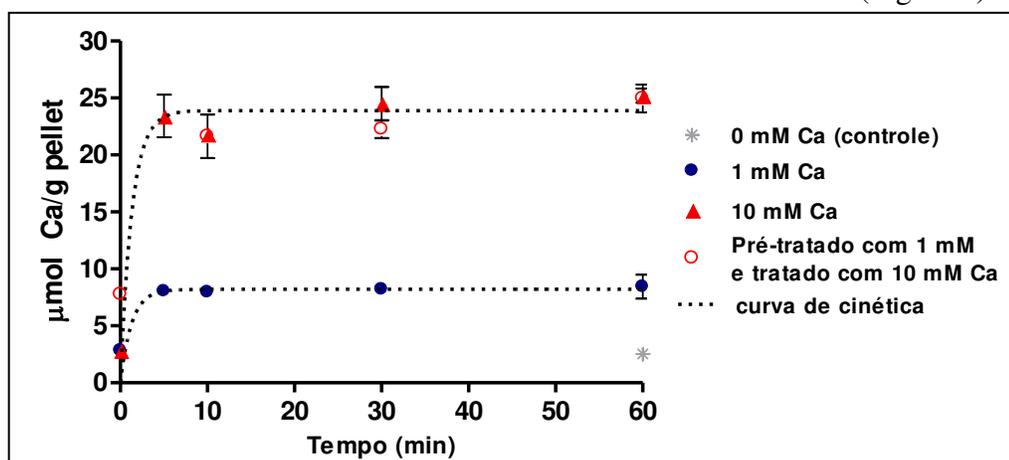


Figura 10. Concentração de Ca (μ mol Ca/g; média \pm dp; n = 3) no *pellet* bacteriano em função do tempo e da concentração de Ca na solução tratamento. *Concentração de Ca presente nas bactérias submetidas ao mesmo protocolo, porém tratadas com solução tratamento sem Ca (valor após 60 min). Tempo zero corresponde a concentração de Ca encontrada no *pellet* bacteriano antes do tratamento.

Tabela 3. Constante de associação (K_{on}), capacidade máxima de ligação (Ca_{bmax}) e constante de equilíbrio (Kd) calculada a partir da curva de cinética de ligação de Ca às bactérias em função da concentração da solução tratamento (média \pm dp, n=3).

Tratamento	K_{on} ($M^{-1} \cdot min^{-1}$)	Ca_{bmax} ($\mu mol/g$ pellet)	Kd (mM)
1 mM Ca	661,8 \pm 794,5	9,54 \pm 1,85	0,163
10 mM Ca	54,27 \pm 33,57	32,88 \pm 5,93	3,763

Kd: concentração que leva à saturação de metade dos sítios de ligação

5.3 Cinética de liberação de Ca ligado a *S. mutans*

Os resultados da figura 11 mostram que para as bactérias pré-tratadas com 1 mM de Ca, a liberação foi completa, atingindo a concentração de Ca presente em bactérias tratadas com o tampão sem Ca. Os dados apresentados na Tabela 4 mostram que este grupo teve menor constante de dissociação comparado aos grupos tratados com 10 mM Ca.

Para as bactérias pré-tratadas com 10 mM Ca, embora cerca de 70% da liberação tenha ocorrido nos primeiros 10 min, esta não foi completa após 60 min, alcançando 80% e 63% do esperado após equilíbrio com 0 e 1 mM Ca, respectivamente (Figura 11). A constante de dissociação do grupo reequilibrado com 1 mM Ca foi menor quando comparado ao grupo tratado com tampão livre de Ca (Tabela 4).

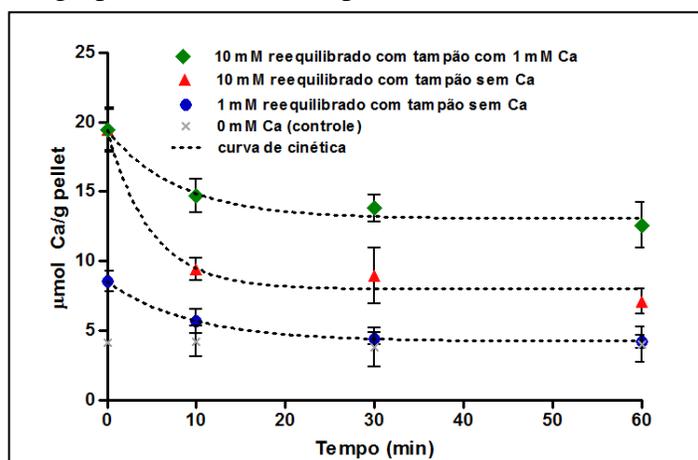


Figura 11. Concentração de Ca (μmol Ca/g; média \pm dp; n = 3) no pellet bacteriano após saturação com soluções contendo 1 e 10 mM Ca, seguido de tratamento com tampão sem Ca ou contendo 1 mM em função do tempo. Tempo zero corresponde a concentração de Ca após 10 min de pré-tratamento com soluções contendo 1 ou 10 mM Ca. O grupo controle (0 mM Ca) corresponde a concentração de Ca presente nas bactérias submetidas ao mesmo protocolo, porém tratadas com tampão sem Ca.

Tabela 4. Concentração de Ca ligada ao pellet bacteriano no tempo zero (Ca_{b0}) (após tratamento prévio por 10 min com solução contendo 1 ou 10 mM de Ca); no tempo infinito ($Ca_{b\infty}$) (após reequilíbrio com soluções livre de Ca ou contendo 1 mM Ca); constante de dissociação (K_{off}); constante de equilíbrio (K_d); e valores de meia-vida calculados a partir da curva de cinética de liberação (média \pm dp, n=3).

Tratamento	Ca_{b0} ($\mu\text{mol/g}$ pellet)	$Ca_{b\infty}$ ($\mu\text{mol/g}$ pellet)	K_{off} (min^{-1})	Meia-vida (min)
1 mM reequilibrado com tampão sem Ca	8,54 \pm 0,26	4,24 \pm 0,22	0,1078 \pm 0,02	6,43
10 mM reequilibrado com tampão sem Ca	19,44 \pm 0,64	7,99 \pm 0,46	0,2042 \pm 0,05	3,40
10 mM reequilibrado com tampão 1 mM Ca	19,41 \pm 0,58	13,06 \pm 0,46	0,1263 \pm 0,04	5,49

Meia-vida: tempo onde metade dos sítios de ligação estão ocupados pelo ligante.

Os resultados da Tabela 5 mostram que a concentração de Ca na solução tratamento após 60 min de equilíbrio não sofreu significativa alteração uma vez que a concentração atingida após 60 min não é superior a 5% da concentração de Ca a que as bactérias foram submetidas.

Tabela 5. Concentração de Ca (mM; média \pm dp; n=3) nas soluções tratamento (PIPES) sem Ca ou contendo 1 mM de Ca inicialmente e após 60 min de equilíbrio com o *pellet* bacteriano pré-tratado com 1 ou 10 mM.

Pré-tratamento	PIPES sem Ca		PIPES + 1 mM Ca
	1 mM	10 mM	10 mM
Inicial	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	1,07 \pm 0,03
Após 60 min	0,04 \pm 0,00	0,12 \pm 0,02	1,13 \pm 0,04

5.5 Liberação de Ca ligado a *S. mutans* em função do pH

Os resultados da Figura 12 mostram que houve significativo aumento na concentração de Ca no tampão acetato, pH 5,0, e HCl pH 1,86 que permaneceu em contato por 10 min com as bactérias pré-tratadas com 1 mM e 10 mM Ca quando comparado aos valores iniciais da concentração de Ca nas soluções tratamento ($p < 0,05$). O mesmo não foi observado para o grupo controle negativo pH 7,0 ($p > 0,05$).

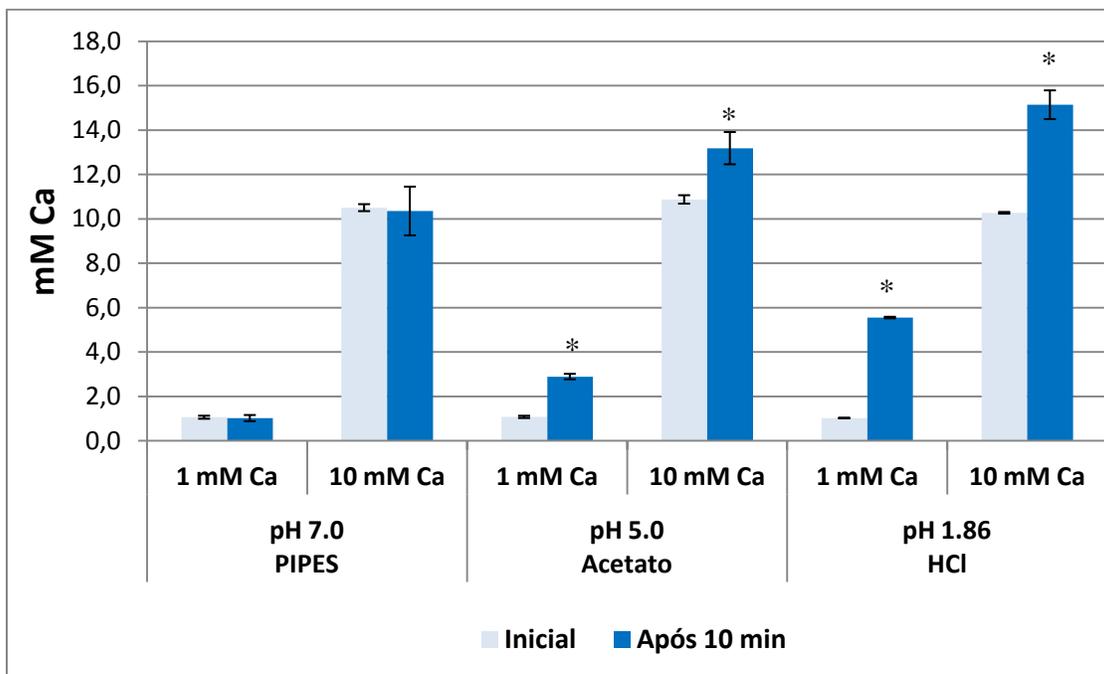


Figura 12. Concentração de Ca (mM, média \pm dp; n = 3) na solução tratamento inicialmente e após 10 min de equilíbrio das bactérias previamente tratadas com 1 ou 10 mM Ca com tampões pH 7,0 (PIPES 0,05 M), 5,0 (acetato 0,5 M) ou 1,86 (HCl 0,5 M). * Valores iniciais e finais diferem estatisticamente (teste *t* pareado; $p < 0,05$).

A tabela 6 mostra que a quantidade de Ca disponibilizada para a solução tratamento após 10 min de equilíbrio com as bactérias foi significativamente maior para o grupo tratado com pH 1,86 quando comparado ao grupo pH 5,0, e este, maior que o grupo tratado com pH 7,0, para ambas as condições de pré-tratamento ($p < 0,05$); entretanto não houve diferença estatisticamente significativa quando foi fixado a condição tratamento (pH 7,0, 5,0 e 1,86) e comparado a condição de pré-tratamento (1 e 10 mM) ($p > 0,05$).

Tabela 6. Quantidade de Ca ($\mu\text{mol/g}$, média \pm dp, n = 3) liberada das bactérias previamente tratadas com solução contendo 1 ou 10 mM de Ca após 10 min de tratamento com soluções de diferentes pH. Os valores negativos são sinônimo que houve ligação de Ca às bactérias.

Pré-tratamento	PIPES pH 7,0	Acetato pH 5,0	HCl pH 1,86
1 mM	-0,01 \pm 0,04	0,55 \pm 0,03	1,36 \pm 0,01
10 mM	-0,04 \pm 0,31	0,69 \pm 0,16	1,46 \pm 0,18

5.6 Cinética e capacidade de ligação de F a *S.mutans*

Os dados da Figura 13 mostram que houve significativo aumento da concentração de F nas bactérias nos primeiros 5 min de tratamento e que não houve diferença da quantidade ligada em função do tempo. Além disso, os dados mostram que a quantidade de F ligada não parece ser alterada pela concentração de Ca presente nas bactérias.

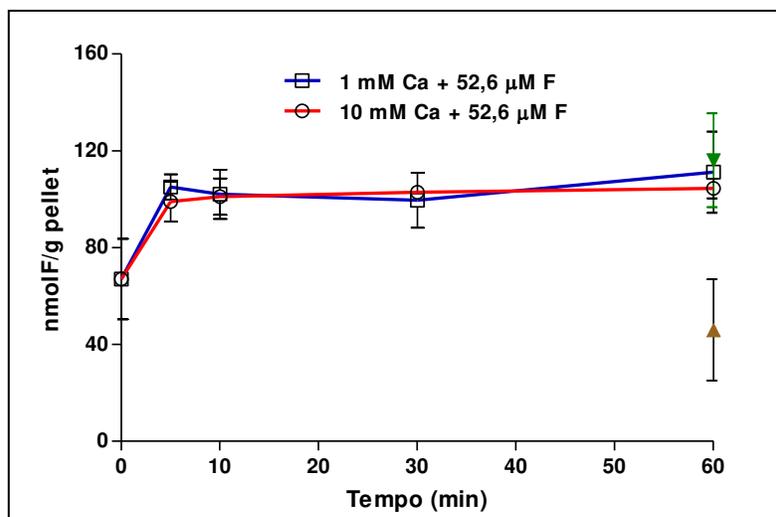


Figura 13. Concentração de F ligado (nmolF/g; média \pm dp; n=3) ao *pellet* bacteriano em função do tempo e da concentração de Ca na solução tratamento. Tempo 0 corresponde a quantidade de F encontrada no *pellet* bacteriano sem tratamento. Triângulo marrom e verde corresponde às bactérias tratadas com solução livre de Ca e F ou contendo apenas 52,6 μ M F por 60 min, respectivamente. Experimento realizado com 150 mL de solução tratamento/g de *pellet* bacteriano.

A Tabela 7 mostra que a presença de 52,6 μ M F não alterou a quantidade de Ca ligado às bactérias após 60 min quando comparado ao *pellet* bacteriano tratado apenas com soluções contendo 1 ou 10 mM Ca.

Tabela 7. Concentração de Ca no *pellet* bacteriano na presença ou ausência de 1 ppm F (μ mol Ca/g de bactéria; média \pm dp; n = 3) após 60 min de tratamento.

1 mM Ca		10 mM Ca	
0 μ M F	52,6 μ M F	0 μ M F	52,6 μ M F
10,38 \pm 1,34	10,63 \pm 0,81	25,81 \pm 1,93	26,07 \pm 0,36

6 DISCUSSÃO

O biofilme dental tem considerável capacidade de retenção de íons Ca, Pi e F, que poderiam ser mobilizados para o fluido diminuindo o estado de subsaturação que se estabelece durante a queda do pH, fato que fortemente governa a dissolução da estrutura mineral do dente. A literatura reconhece dois tipos de reservatórios de íons no biofilme dental: (1) na forma de minerais precipitados (Kaufman e Kleinberg, 1976); (2) ou íons ligados a grupamentos aniônicos das paredes das bactérias (Rose *et al.* 1993; 1996) e proteínas (Gao *et al.* 2001). Tem-se sugerido que, em acréscimo aos minerais dissolvidos da estrutura dental, as mudanças inorgânicas observadas no fluido do biofilme, durante uma queda de pH, sejam provenientes desses reservatórios. Particularmente em relação aos íons ligados às bactérias, existem muitos poucos trabalhos na literatura que se ocuparam em investigar a dinâmica desta ligação (Tatevossian 1981, Rose *et al.* 1993). Avaliar a cinética de ligação e liberação destes íons da superfície bacteriana nos parece importante para fornecer subsídios para entendê-los como reservatório capaz de interferir no processo de formação da cárie dental.

Inicialmente avaliamos se as condições iniciais dos ensaios eram comparáveis às finais, tendo em vista que estes foram realizados em função do tempo e compará-las seria objetivo deste trabalho. Nossos resultados mostraram que as bactérias mantiveram-se viáveis ao longo do tempo máximo de cada experimento. Especificamente em relação a esta análise, a morte bacteriana não nos parece ser variável crítica nas análises uma vez que Tatevossian (1981) já havia mostrado que a capacidade de ligação de Ca é similar em bactérias mortas quando comparada a viáveis e que este fenômeno é dependente apenas de forças eletrostáticas entre as cargas presente na superfície bacteriana e os íons do meio. Por outro lado, a manutenção do pH ao longo do experimento é variável importante neste estudo, pois a ligação e liberação destes íons é função também do pH do meio. Discussão aprofundada desta variável será feita mais adiante no experimento de liberação de íons em função do pH.

Também se fez importante neste estudo, validar o protocolo experimental utilizado de modo a garantir que o acréscimo encontrado na quantidade de Ca ou F ligado

às bactérias não seria exclusivamente resultado de “contaminação” do *pellet* com resíduos das soluções tratamento. Os achados deste experimento mostram que tanto para Ca, quanto para o F, houve significativa redução da concentração desses íons na solução tratamento e significativo aumento da concentração no *pellet* bacteriano que foi exposto às soluções contendo Ca e F (Figuras 6, 7, 9 e 10). Estes dados nos dão suporte para corroborar com estudos prévios que afirmam que há ligação de íons em bactérias do biofilme dental (Tatevossian 1981, Rose *et al.* 1993;1996). Além disso, para o Ca, não houve diferença estatisticamente significativa entre a quantidade de íons removida da solução daquela encontrada ligada ao *pellet* bacteriano assegurando a eficácia da remoção de residuais de solução tratamento do *pellet* bacteriano (Tabela 1). Para o F, apesar dos dados mostrarem que houve redução da concentração da solução tratamento e aumento da quantidade de íons ligados, a comparação direta entre estes dados foi estatisticamente diferente para o grupo pré-tratado com 1 mM Ca e relativa variabilidade foi encontrada para o grupo 10 mM Ca (Tabela 2), e aqui cabe explicação sobre as hipóteses para explicar esse resultado: 1. Parte do fluoreto que foi removido da solução tratamento pode ter sido incorporado no interior das células bacterianas: a entrada de F na bactéria acontece por difusão passiva na forma de HF (ácido fluorídrico). No pH 7,0, espera-se que aproximadamente 99,98% do F esteja em sua forma iônica (F⁻) e 0,014% esteja na forma de HF. Assim, considerando as concentrações de F presente na solução tratamento (52,6 µM, 1 ppm F), é de se esperar cerca de 7,43 nmol F na forma não-iônica passível de entrar bactéria. No entanto, é importante destacar que não se espera que 100% destas moléculas entrem nas bactérias e sim, que se estabeleça um equilíbrio entre o meio interno e o meio externo (Hamilton 1990). Assim, considerando que a diferença que esperaríamos observar é baixa entre os grupos, lançar mão desta hipótese pode nos ajudar a explicar os resultados. 2. O protocolo experimental utilizado não permite estimar com sensibilidade adequada a quantidade de íons ligada ao *pellet* bacteriano: a proporção de volume de solução tratamento/bactérias no teste de validação da metodologia para o F foi 10 vezes menor em relação ao utilizado no teste de validação para o Ca. Essa modificação foi necessária considerando a concentração de F utilizada no tratamento (52,6 µM F), cerca de 20 vezes menor do que a utilizada no tratamento com Ca (1 mM Ca). Devido à baixa proporção de volume de solução

tratamento/bactérias, a estimativa da quantidade de F ligada ao pellet pode ter sofrido maior influência de variabilidade experimental do que a avaliação da diminuição da concentração de F na solução tratamento. Essa explicação encontra também respaldo na significativa diminuição da concentração de F na solução tratamento (para 50% e 20% da concentração original, respectivamente, nos testes feitos com soluções contendo 1 mM Ca + 52,6 μ M F e 10 mM + 52,6 μ M F, respectivamente, figura 8) em relação ao modesto aumento da concentração de F no pellet bacteriano (menor do que 2 vezes, de 44% e 74% nos testes feitos com soluções contendo 1 mM Ca + 52,6 μ M F e 10 mM + 52,6 μ M F, respectivamente, figura 9). Em acréscimo, a determinação da diminuição da concentração de F na solução tratamento é direta, enquanto que no teste do aumento da concentração de F ligado às bactérias, há um passo intermediário de extração ácida dos íons ligados, o que aumenta a variabilidade experimental (Tabela 2). Essa explicação também ajuda a entender porque no experimento de cinética da ligação de F aos *pellets* bacterianos não foi possível observar diferenças entre os grupos pré-tratados com Ca a 1 ou 10 mM (Figura 13), enquanto que neste experimento de validação do protocolo experimental, significativa diferença foi observada na quantidade de F ligada aos *pellets* (maior para o grupo pré-tratado com Ca 10 mM). Esses dados serão discutidos em maiores detalhes abaixo.

Apesar da diferença obtida nos testes de subtração de F da solução tratamento e ligação ao pellet bacteriano, foi possível validar o protocolo experimental provando que o aumento observado na quantidade de íons ligada as bactérias não pode ser exclusivamente devido à contaminação por residuais da solução tratamento.

6.1 Cinética de ligação e liberação de Ca à *S. mutans*

Estudos de cinética tem por objetivo avaliar a velocidade com que dois reagentes interagem em função do tempo. Este é o contexto no qual se inserem os resultados dos experimentos que avaliaram a cinética de ligação e liberação de Ca, por isto, estes serão reunidos em um mesmo tópico de discussão. Inicialmente é importante notar que não houve alteração na concentração da solução tratamento em nenhum dos dois experimentos realizados durante o equilíbrio sendo possível aplicar com segurança os

conceitos e equações matemáticas que permite visualizá-los como um fenômeno químico e compará-lo com outros trabalhos realizados nesta linha (Rose *et al.* 1993, 1996).

No estudo da cinética de ligação, os resultados mostraram que a ligação de Ca às bactérias é função da concentração do meio e não alterou em função do tempo. Além disso, a capacidade de ligação da solução 10 vezes mais concentrada (10 mM) não foi proporcionalmente 10 vezes maior (Figura 10). Estes dados corroboram com o estudo recentemente publicado que avaliou o efeito da presença da matriz extracelular rica em polissacarídeos insolúveis na ligação de Ca em *S. mutans* (Leitão *et al.* 2012). Em relação aos valores de máxima capacidade de ligação para ambos os grupos (Tabela 3), estes valores estão de acordo com aqueles encontrados por Rose *et al.* (1993) quando avaliaram a ligação de Ca em cepas bacterianas do gênero estreptococos (aproximadamente 30,0 $\mu\text{mol/g}$ para a concentração de 10 mM).

A cinética de ligação de Ca mostrou ser um fenômeno rápido, onde é possível observar cerca de 90% do Ca ligado nos primeiros 5 min. A tabela 3 confirma estes achados uma vez que a constante de equilíbrio de ambas as condições de tratamento é da ordem de 10^{-3} M, que denota alto grau de afinidade dos grupamentos aniônicos pelo Ca. Comparando o K_d das duas condições avaliadas é possível observar que houve uma diminuição da afinidade pelo aumento da concentração da solução tratamento. Como foi mencionado anteriormente, o K_d representa a concentração necessária para que metade dos sítios de ligação estejam ocupados pelo ligante. Observando os valores da Tabela 3, é possível notar que uma concentração 6 vezes menor seria suficiente para saturar metade dos sítios de ligação presente nas bactérias no grupo tratado com 1 mM de Ca. Já para o grupo tratado com 10 mM de Ca, seria necessária uma concentração 2,5 vezes menor para que isto ocorresse, ou seja, mais íons deveriam estar presentes no meio para que metade dos sítios de ligação fossem ocupados. Esta diferença também foi observada por Rose *et al.* (1996;1998) que explica que a diminuição da afinidade indica que estar ocorrendo uma mudança da predominância de ligação divalente (dois grupamentos aniônicos das bactérias para cada íon Ca presente (maior afinidade)) para monovalente (um grupamento aniônico para cada íon Ca (menor afinidade)). Essa reflexão nos ajuda a entender porque a constante de afinidade (K_{on}) do grupo de 1 mM é maior que do grupo 10 mM.

Tatevossian (1981) em um estudo *in vitro*, avaliou a ligação de Ca em “pools” de biofilmes coletados a partir de superfícies linguais dos dentes de voluntários. Seu ensaio consistiu em calibrar um eletrodo íon seletivo com soluções de concentração conhecida de Ca e equilibrá-lo com um padrão contendo 1 mM Ca, pH 7,0. Em seguida imergiu a massa bacteriana coletada e acompanhou a variação de milivoltagem em função do tempo, que indicaria ligação de Ca ao biofilme. Os resultados deste estudo mostraram que houve redução em 30% da concentração de Ca na solução (indicativo de ligação às bactérias) e a saturação foi alcançada nos primeiros 10 min. Cabe apontar que a diminuição da concentração de Ca na solução pode ter influenciado os resultados obtidos por este autor, o que não aconteceu no protocolo experimental usado no presente estudo.

Nossos resultados de cinética de ligação apontam também que este reservatório é capaz de enriquecer quando maior quantidade de íons é disponibilizada no meio, uma vez que houve uma equivalente quantidade de Ca ligado independente das bactérias já estarem ou não saturadas com 1 mM Ca (concentração de Ca encontrada no fluido do biofilme em repouso) (Figura 10). De fato, estudos *in situ* (Brudevold *et al.* 1985; Kashket & Yaskell 1992) e *in vivo* (Vogel *et al.* 2008) demonstraram que um bochecho de 1 min com soluções contendo lactato de cálcio são capazes de enriquecer o biofilme dental e interferir com o processo da cárie dental ou mesmo potencializar o efeito do F.

Assim como observado por Rose *et al.* (1993) nossos resultados demonstram que a curva de liberação de Ca mostrou-se diferente da curva de ligação (Figura 11). Na tentativa de explicar este fenômeno estes autores propuseram que a presença de polímeros inespecíficos da parede bacteriana promovem uma interação célula-célula e isto pode interferir na liberação dos íons Ca. Esta hipótese também é defendida em outro estudo que avaliou o papel do Ca na agregação e formação do biofilme dental (Rose *et al.* 2000). Observando os valores da constante de dissociação entre os grupos experimentais é possível reafirmar a hipótese que no grupo pré-tratado com 1 mM Ca prevaleceu a ponte iônica entre dois grupamentos aniônicos e um Ca (divalente), pois a constante de dissociação para este grupo é menor quando comparado aos demais, ou seja, a afinidade para que permaneçam ligados é maior, dificultando assim sua liberação (Tabela 4). Já para os dois grupos pré-tratados com 10 mM Ca, o menor valor de constante de dissociação do grupo

reequilibrado com 1 mM Ca, quando comparado ao grupo livre de Ca, pode ser explicado pela presença de íons Ca na solução, que tendem, mesmo que insignificadamente, a refazer o complexo ligante-receptor (Tabela 4).

Em relação à permanência destes íons no biofilme dental *in vivo* e *in situ*, não há um consenso na literatura. Kashket & Yaskell (1992) apontam que o benefício dos íons Ca na redução da perda mineral é mais evidente quando usado concomitantemente com o desafio cariogênico ou logo após este, e menor quando utilizado previamente. Observaram ainda que 45 min após a exposição da placa de *S. mutans* às soluções contendo lactato de cálcio, as concentrações já haviam retornado a níveis basais. Já Reynolds *et al.* (2003) mostraram significativo aumento das concentrações de Ca no biofilme dental após 2-3 h da última exposição à bochechos contendo Ca. Vogel *et al.* (2008) viram a permanência deste reservatório aumentada em até 3 vezes no biofilme dental após 1 hora do pré-bochecho com Ca. Dadas as devidas limitações, o conjunto dos dados dos experimentos de cinética de ligação e liberação do presente trabalho nos permite corroborar com os estudos prévios que observaram a alta capacidade de enriquecimento deste reservatório e a sua permanência por significativo período de tempo.

6.2 Liberação de Ca ligado a *S. mutans* em função do pH

Os resultados dos estudos supracitados mostram claramente a capacidade dos estreptococos em ligar íons à superfície bacteriana. Os principais sítios de ligação de Ca na superfície bacteriana são: os grupamentos carboxílicos presentes em aminoácidos de proteínas da parede ou membrana celular como aspartato e glutamato; e os grupamentos fosfatos do ácido teicóico e lipoteicóico (Anexo 1). A importância deste reservatório estará em sua capacidade de perdurar por um dado período de tempo no biofilme e principalmente ser prontamente liberado durante um desafio cariogênico para interferir com os eventos de des-remineralização – o que Vogel (2011) tem chamado de biodisponibilidade dos reservatórios inorgânicos do biofilme.

Rose *et al* (1993;1996) observando uma menor capacidade de ligação de Ca às bactérias em pH 5,0, quando comparado ao pH 7,0, postularam que durante a queda do pH

haveria disponibilização destes íons para o fluido do biofilme. Os dados no nosso estudo mostram claramente este fenômeno, pois houve significativo aumento da concentração de Ca no fluido do biofilme teste de *S. mutans* quando este foi tratado por 10 min com tampão pH 5,0 (Figura 12). A quantidade de Ca liberada foi equivalente a aproximadamente 5,4 e 2,5% do total de íons que estavam previamente ligados para o grupo tratado previamente com 1 e 10 mM, respectivamente (Tabela 6 *versus* valores baseline de Ca ligado às bactérias – dados não mostrados). Por dedução matemática, aqueles autores inferiram um aumento de aproximadamente 44,0 mM no fluido do biofilme, contra aproximadamente 3,0 mM encontrado no presente estudo. Esta significativa diferença pode ser explicada por diferenças no protocolo experimental dos estudos, já que nos trabalhos de Rose *et al.* (1993; 1996) o tempo de contato das bactérias com o tampão pH 5,0 foi de 2 horas, bem como os autores utilizaram uma alta proporção de volume de tratamento por peso. Além disso, nossos dados mostram-se mais próximos daqueles encontrados por Margolis & Moreno (1992), Tenuta *et al.* (2006) e Correia *et al.* (2012) no fluido do biofilme *in vivo* e *in situ* (3,0 - 9,6 mM), 5-7 min após um bochecho com sacarose.

O modelo empregado no presente estudo apresentou dose-resposta para os tratamentos uma vez que não houve aumento da concentração de Ca no grupo tratado com pH 7,0 (controle negativo) e aumento exacerbado no grupo controle positivo (pH 1,86) (Figura 12). No entanto, foi possível observar que a quantidade de Ca disponibilizada para o fluido do biofilme teste foi a mesma independente da condição prévia de tratamento que possibilitou a formação de uma maior quantidade de reservatório (10 mM) ou não (1 mM) (Tabela 6).

Duas hipóteses levantadas podem explicar estes resultados. A primeira reside no fato que o meio que permeia as bactérias e a intensidade da queda do pH será determinante na quantidade de íons a serem liberados dos reservatórios para o fluido do biofilme. Aqui cabem explicações sobre a intensidade da queda do pH e a natureza dos sítios de ligação de Ca nas bactérias. A influência do pH na liberação destes íons pode ser prevista conhecendo o pKa (constante de dissociação) destes grupamentos aniônicos que são, para o grupamentos carboxílico da cadeia lateral (grupo R) do aspartato, 3,65; para o grupamentos carboxílico do glutamato, 4,25; e para o grupamento fosfato do ácido teicóico,

2,3 (Dawson *et al.* 1969; Lambert *et al.* 1975). De forma bem simplificada, isto quer dizer que em valores de pH um ponto acima destes valores, os grupamentos estarão com 90% das cargas aniônicas livres para a ligação de Ca; uma vez ligados, o Ca só será disponibilizado para o fluido do biofilme em quedas de pH abaixo destes valores, e neste contexto o grupamento fosfato do ácido teicóico perde a importância como reservatório de íons na dinâmica da cárie dental, pois a queda de pH induzida pela metabolização das bactérias do biofilme não alcançam valores tão baixos. Rose *et al.* (1997) investigou a natureza e capacidade de ligação de Ca destes grupamentos e concluiu que o grupamento fosfato do ácido teicóico é responsável por aproximadamente 75% do total de íons ligados à estreptococos orais. Observaram ainda que, em *Lactobacilos casei* e *Actinomyces naeslundii*, predominam a ligação a grupamentos carboxílicos. Diante disto poderíamos concluir que é limitada a capacidade do reservatório de íons do biofilme dental em disponibilizá-los para o fluido após a queda do pH (corroborando os dados de que apenas 5% dos reservatórios são liberados durante um desafio ácido de 10 min).

Outra hipótese pode explicar a semelhança na quantidade de Ca disponibilizada pelos dois grupos de pré-tratamento. O modelo que utilizamos para simular a queda do pH é um sistema fechado, onde a saturação da solução tratamento, devido ao seu pequeno volume, pode ter ocorrido. O biofilme dental é permeado pela saliva que dilui os íons disponibilizados para o fluido do biofilme durante o desafio cariogênico. Diante desta hipótese, a importância de manter um maior reservatório de Ca no biofilme dental ganha força, pois íons poderiam ser mobilizados destes reservatórios durante os frequentes episódios de desafio cariogênico. De fato, diversos trabalhos apontam para uma menor concentração inorgânica no biofilme dental exposto a altas frequências de desafios cariogênicos quando comparado a baixas frequências (Cury *et al.* 1997, 2001; Paes Leme *et al.* 2004; Ccahuana-Vásquez *et al.* 2007). E uma das hipóteses levantadas por Paes Leme *et al.* (2006) para explicar esta menor concentração inorgânica é a depleção destes reservatórios pelas frequentes quedas do pH. Diante disto, novamente reforça-se a importância de lançar mão de estratégias para promover o enriquecimento deste reservatório no biofilme dental.

6.3 Cinética e capacidade de ligação de F a *S. mutans*

Como já mencionado anteriormente, a capacidade de ligação de íons a grupamentos negativos na parede celular de bactérias do biofilme dental foi objeto de estudo de poucos trabalhos na literatura. Única contribuição nesse sentido foi dada Rose *et al.* (1996, 1998) que mostraram que a capacidade de ligação de Ca em estreptococos foi 2x maior na presença de 5,0 mM de F, e essa proporção foi mantida em pH 5,0 quando comparado ao pH 7,0, ainda que menor. Estes resultados deram suporte ao modelo proposto por estes autores, fortemente aceito na comunidade científica, de que Ca liga-se às bactérias por ponte iônica entre dois grupamentos aniônicos das bactérias e um íon Ca; na presença de F, este compete por uma carga positiva do Ca, estabelecendo uma ponte bactéria-Ca-F. Como resultado, libera-se um grupamento aniônico para que mais Ca possa se ligar e estabelecer assim, mais uma ponte iônica. Assim, este modelo justifica o dobro da quantidade de Ca encontrada por estes autores. Ressalvas importantes cabem nestes achados, pois a concentração de F utilizada nestes estudos prévios não representa aquela encontrada nos fluidos orais capazes de formar este tipo de reservatório. Frente essas concentrações (0-10 mM de Ca e 5,0 mM – 95 ppm F; Rose *et al.* 1996), é de se esperar a precipitação de mineral CaF₂ no biofilme dental e os autores não abordam o controle da formação deste outro reservatório em seus experimentos. No presente estudo a concentração de Ca (1 e 10 mM) e F (1 ppm) não ultrapassou o limite de solubilidade do mineral CaF₂, $3,0 \times 10^{-11}$ M (McCann, 1968), o que nos permite afirmar que houve apenas a formação do reservatório de íons ligado às bactérias. Ademais, estas são concentrações comumente encontrada nos fluidos bucais, tanto para o Ca (1,0 - 9,6 mM – Margolis & Moreno 1992; Tenuta *et al.* 2006), quanto para o F quando da exposição da cavidade bucal aos agentes fluoretados mais comuns na prevenção da cárie.

Em relação à ligação de Ca às bactérias na presença de F, nossos resultados mostraram que não houve aumento significativo da quantidade de Ca ligado às bactérias pela presença de F após 60 min de tratamento (Tabela 7), discordando daquele encontrado por Rose *et al.* (1996). Neste ponto, não há um consenso na literatura em relação à presença de F aumentar a concentração de Ca no biofilme dental. Nobre dos Santos *et al.* (1988)

quando avaliaram a concentração inorgânica do biofilme dental de escolares durante a fluoretação, paralisação e refluoretação da água de abastecimento público, observaram que não houve alteração significativa da concentração de Ca em função do significativo aumento da concentração de F no biofilme. Paes Leme *et al.* (2004) observaram significativo aumento da concentração de Ca no biofilme formado *in situ* sob diferentes frequências de exposição a sacarose quando do uso do dentifrício fluoretado comparado ao placebo. Considerando os achados de Tenuta *et al.* (2009) que mostraram que o mecanismo de ação dos dentifrícios fluoretados está mais fortemente relacionado à capacidade do F em difundir para o biofilme e formar reservatórios ligados às bactérias; e tomando as devidas precauções em relação à dificuldade de isolar os dois tipos de reservatórios que o biofilme dental pode formar quando da exposição à agente fluoretados (mineral CaF_2 ou ponte iônica com bactérias e proteínas); podemos explicar nossos resultados com a hipótese que baixas concentrações de F (como aquela encontrada na água fluoretada e utilizada neste estudo) não aumenta a concentração de Ca ligado às bactérias a ponto de ser observado uma diferença significativa no biofilme dental. Assim o efeito do F em aumentar a ligação de Ca às bactérias do biofilme dental pode estar em função da concentração atingida no biofilme – não superior àquela necessária para formação do mineral CaF_2 , não inferior àquela que se atinge quando da exposição à água fluoretada, por exemplo.

Em relação à quantidade de F ligado às bactérias não diferir em função da concentração de Ca previamente ligado (Figura 13), a sensibilidade do modelo em detectar pequenas diferenças da concentração de íons ligados às bactérias pode explicar os resultados. Os dados do experimento de validação do protocolo experimental mostraram que houve maior redução da concentração de F na solução tratamento quando da presença de mais Ca ligado às bactérias (Figura 8). No entanto, a tabela 2 mostram que a quantidade de Ca das bactérias pré-tratadas com 1 mM foi capaz de subtrair 4,25 nmol F da solução, já a quantidade de Ca presente nas bactérias pré-tratada com 10 mM foi capaz de subtrair 6,11 nmol F, ou seja, uma diferença de 1,86 nmol de F que não foi observada quando os *pellets* bacterianos foram avaliados. Guardadas as limitações deste experimento, como já descrito acima, é importante ainda discutir a relevância clínica dessas concentrações. Ainda que baixas concentrações de F no biofilme dental tenham significativo impacto nos processos

de des-remineralização, não é de se esperar significativas diferenças no efeito anticárie do F⁻ diante destas duas condições (mais ou menos Ca nas bactérias).

Mais estudos deverão ser realizados nesta linha para avaliar o tempo de permanência destes íons e capacidade de liberação durante a queda do pH, bem como o potencial destes reservatórios em interferir diretamente com os eventos de des-remineralização.

7 CONCLUSÕES

Os resultados sugerem que, utilizando um delineamento experimental validado, íons Ca ligados a bactérias podem funcionar como um importante reservatório no biofilme dental capaz de permanecer ligado por um significativo período de tempo e ser prontamente liberado para o fluido do biofilme durante uma queda de pH. Além disso, a superfície bacteriana tem potencial para ligar íons F, mas nas condições experimentais testadas neste estudo, esta ligação não demonstrou ser influenciada pela presença de Ca previamente ligado.

REFERÊNCIAS*

Agus HM, Schamschula RG, Barmes DE, Bunzel M. Associations between the total fluoride content of dental plaque and individual caries experience in Australian children. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1976 Sep; 4(5): 210-4.

Aires CP, Tabchoury CP, Del Bel Cury AA, Koo H, Cury JA. Effect of sucrose concentration on dental biofilm formed *in situ* and on enamel demineralization. *Caries Res.* 2006; 40(1): 28-32.

Ashley FP. Relationships between dietary sugar intake, parotid saliva plaque calcium, and phosphorus concentrations and caries. *J Dent Res.* 1971; 50(5): 1212.

Ashley FP. Relationship of diet, saliva, plaque and caries. *J Dent Res.* 1972; 51: 1234.

Ashley FP. Effects of single exposure to sugar on calcium and phosphorus concentrations of dental plaque. *J Dent Res.* 1975 Sep-Oct; 54(5): 1015-8.

Ashley FP, Wilson RF. Dental plaque and caries. A 3-year longitudinal study in children. *Br Dent J.* 1977 Feb 1; 142(3): 85-91.

Brudevold F, Tehrani A, Attarzadeh F, Goulet D, van Houte J. Effect of some salts of calcium, sodium, potassium, and strontium on intra-oral enamel demineralization. *J Dent Res.* 1985 Jan; 64(1): 24-7.

Carey C, Gregory T, Rupp W, Tatevossian A, Vogel GL. The driving forces in human dental plaque fluid for demineralisation and remineralisation of enamel mineral. In: *Factors Relating to Demineralisation and Remineralisation of the Teeth.* S.A. Oxford: IRL Press; 1986. pp. 163-173.

Carey CM, Mao Y, Vogel GL. Calcium activity in human plaque fluid during a sucrose challenge [Abstract, 1902]. *J Dent Res* 1994; 73.

Ccahuana-Vásquez RA, Tabchoury CP, Tenuta LM, Del Bel Cury AA, Vale GC, Cury JA. Effect of frequency of sucrose exposure on dental biofilm composition and enamel demineralization in the presence of fluoride. *Caries Res.* 2007; 41(1): 9-15.

Correia MF, Tenuta LMA, Cury JA. Mineral Ions in the Fluid of Biofilms Formed on Enamel and Dentine Shortly after Sugar Challenge. *Caries Res* 2012; 46: 408-412.

Cury JA, Rebello MA, Del Bel Cury AA. *In situ* relationship between sucrose exposure and the composition of dental plaque. *Caries Res.* 1997; 31(5): 356-60.

*De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseadas na norma do Internacional Committee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

Cury JA, Rebelo MA, Del Bel Cury AA, Derbyshire MT, Tabchoury CP. Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in the presence of sucrose or glucose and fructose. *Caries Res.* 2000 Nov-Dec; 34(6): 491-7.

Cury JA, Francisco SB, Del Bel Cury AA, Tabchoury CP. *In situ* study of sucrose exposure, mutans streptococci in dental plaque and dental caries. *Braz Dent J.* 2001; 12: 101-104.

Dawson RMC, Elliott DC, Elliott WH, Jones KM. *Data for Biochemical Research.* 2nd ed; Oxford: Oxford University Press, 1969.

Edgar WM. Studies of the role of calcium in plaque formation and cohesion. *J Dent.* 1979 Jun; 7(2): 174-9.

Ellwood R, Fejerskov O, Cury JA, Clarkson B. Fluoride in caries control. In: Fejerskov O, Kidd E, editors. *Dental caries: the disease and its clinical management.* 2nd ed. Oxford: Blackwell Munksgaard; 2008. pp. 287-323.

Fejerskov O. Concepts of dental caries and their consequences for understanding the disease. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1997 Feb; 25(1): 5-12.

Fu J, et al. Effect of plaque thickness on glucose retention and acid production [Abstract, 1815]. *J Dent Res.* 1991; 70.

Gao XJ, Fan Y, Kent RL Jr, Van Houte J, Margolis HC. Association of caries activity with the composition of dental plaque fluid. *J Dent Res.* 2001 Sep; 80(9): 1834-9.

Gaugler RW, Bruton WF. Fluoride concentration in dental plaque of naval recruits with and without caries. *Arch Oral Biol.* 1982; 27(3): 269-72.

Gibbons RJ. Formation and significance of bacterial polysaccharides in caries etiology. *Caries Res.* 1968; 2(2): 164-71.

Good NE, Izawa S. Hydrogen ion buffers. *Meth Enzymol.* 1972; 24: 53-68.

Grobler SR, Reddy J, van Wyk CW. Calcium, phosphorus, fluoride, and pH levels of human dental plaque from areas of varying fluoride levels. *J Dent Res.* 1982 Aug; 61(8): 986-8.

Hamilton IR. Biochemical effects of fluoride on oral bacteria. *J Dent Res.* 1990 Feb; 69 Spec 660-7: 682-3.

Hotz P, Guggenheim B, Schmid R. Carbohydrates in pooled dental plaque. *Caries Res.* 1972; 6(2): 103-21.

Kaufman HW, Kleinberg I. X-ray diffraction examination of calcium phosphate in dental plaque. *Calcif Tissue Res.* 1973 Feb 19; 11(2): 97-104.

Kashket S, Yaskell T. Effect of timing of administered calcium lactate on the sucrose-induced intraoral demineralization of bovine enamel. *Arch Oral Biol.* 1992 Mar; 37(3): 187-91.

Leitão TJ, Tenuta LMA, Ishi G, Cury JA. Calcium binding to *S. mutans* grown in the presence or absence of sucrose. *Braz Oral Res.* 2012 Mar-Apr; 26(2): 100-5.

Lambert PA, Hancock IC, Baddiley J. The interaction of magnesium ions with teichoic acid. *Biochem J.* 1975 Sep; 149(3): 519-24.

Macpherson LM, MacFarlane TW, Weetman DA, Stephen KW. Comparison of the plaque microflora from natural and appliance-borne enamel surfaces. *Caries Res.* 1991; 25(1): 58-64.

Margolis HC, Duckworth JH, Moreno EC. Composition of pooled resting plaque fluid from caries-free and caries-susceptible individuals. *J Dent Res.* 1988 Dec; 67(12): 1468-75.

Margolis HC. An assessment of recent advances in the study of the chemistry and biochemistry of dental plaque fluid. *J Dent Res.* 1990 Jun; 69(6): 1337-42.

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

Margolis HC, Moreno EC. Composition and cariogenic potential of dental plaque fluid. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1994; 5(1): 1-25.

McCann HG. The solubility of fluorapatite and its relationship to that of calcium fluoride. *Arch Oral Biol.* 1968 Aug; 13(8): 987-1001.

McDonagh MS *et al.*, Systematic review of water fluoridation. *BMJ.* 2000 Oct 7; 321(7265): 855-9.

Marsh PD. Dental plaque as a microbial biofilm. *Caries Res.* 2004 May-Jun; 38(3): 204-11.

Moreno EC, Margolis HC. Compositions of human plaque fluid. *J. Dent. Res.* 1988 Sep; 67(9): 1181-1189.

Nobre dos Santos M, Cury JA. Dental plaque fluoride is lower after discontinuation of water fluoridation. *Caries Res.* 1988; 22(5): 316-7.

Paes Leme AF, Dalcico R, Tabchoury CP, Del Bel Cury AA, Rosalen PL, Cury JA. *In situ* effect of frequent sucrose exposure on enamel demineralization and on plaque composition after APF application and F dentifrice use. *J Dent Res.* 2004 Jan; 83(1): 71-5.

Paes Leme AF, Koo H, Bellato CM, Bedi G, Cury JA. The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation-new insight. *J Dent Res.* 2006 Oct; 85(10): 878-87.

Pearce E. Plaque minerals and dental caries. *N Z Dent J.* 1998 Mar; 94(415): 12-5.

Rankine CA, Smith SL, Schneider PE, Gardiner DM. Biochemical comparison of plaque fluid on tooth and acrylic surfaces during a sucrose challenge. *Arch Oral Biol.* 1996 Jul; 41(7): 695-8.

Reynolds EC, Cai F, Shen P, Walker GD. Retention in plaque and remineralization of enamel lesions by various forms of calcium in a mouthrinse or sugar-free chewing gum. *J Dent Res.* 2003 Mar; 82(3): 206-11.

Rölla G, Bowen WH. Concentration of fluoride in plaque - a possible mechanism. *Scand J Dent Res.* 1977 Jan-Feb; 85(2): 149-51.

Rose RK, Dibdin GH, Shellis RP. A quantitative study of calcium binding and aggregation in selected oral bacteria. *J Dent Res.* 1993 Jan; 72(1): 78-84.

Rose RK, Shellis RP, Lee AR. The role of cation bridging in microbial fluoride binding. *Caries Res.* 1996;30(6):458-64.

Rose RK, Matthews SP, Hall RC. Investigation of calcium-binding sites on the surfaces of selected gram-positive oral organisms. *Arch Oral Biol.* 1997 Sep; 42(9): 595-9.

Rose RK, Turner SJ. Fluoride-induced enhancement of diffusion in streptococcal model plaque biofilms. *Caries Res.* 1998; 32(3): 227-32.

Rose RK. The role of calcium in oral streptococcal aggregation and the implications for biofilm formation and retention. *Biochim Biophys Acta.* 2000 Jun 1; 1475(1): 76-82.

Schamschula RG, Agus H, Bunzel M, Adkins BL, Barmes DE. The concentration of selected major and trace minerals in human dental plaque. *Arch Oral Biol.* 1977; 22(5): 321-5.

Shaw L, Murray JJ, Burchell CK, Best JS. Calcium and phosphorus content of plaque and saliva in relation to dental caries. *Caries Res.* 1983; 17(6): 543-8.

Stephan RM. Intra-oral hydrogen-ion concentrations associated with dental caries activity. *J Dent Res* 1944; 23: 257-66.

Tanaka M, Margolis HC. Release of mineral ions in dental plaque following acid production. *Arch Oral Biol.* 1999 Mar; 44(3): 253-8.

Tatevossian A. Kinetics of calcium binding and release from dental plaque. In: Röllä G, Sönju T, Embery G, editors. *Tooth surface interactions and preventive dentistry.* Oxford: IRL Press; 1981. p. 105-112.

Tatevossian A, Gould CT. The kinetics of inorganic phosphate in human dental plaque and saliva. *Arch Oral Biol.* 1979; 24(6): 461-6.

Tatevossian A. Fluoride in dental plaque and its effects. *J Dent Res.* 1990a Feb; 69 (Spec Iss): 645-52.

Tatevossian A. Facts and artefacts in research on human dental plaque fluid. *J Dent Res.* 1990b Jun; 69(6): 1309-15.

ten Cate JM. Review on fluoride, with special emphasis on calcium fluoride mechanisms in caries prevention. *Eur J Oral Sci.* 1997 Oct; 105(5 Pt 2): 461-5.

Tenuta LM, Del Bel Cury AA, Bortolin MC, Vogel GL, Cury JA. Ca, Pi, and F in the fluid of biofilm formed under sucrose. *J Dent Res.* 2006 Sep; 85(9): 834-8.

Tenuta LM, Zamataro CB, Del Bel Cury AA, Tabchoury CP, Cury JA. Mechanism of fluoride dentifrice effect on enamel demineralization. *Caries Res.* 2009; 43(4): 278-85.

Vale GC, Tabchoury CP, Arthur RA, Del Bel Cury AA, Paes Leme AF, Cury JA. Temporal relationship between sucrose-associated changes in dental biofilm composition and enamel demineralization. *Caries Res.* 2007; 41(5): 406-12.

Vogel GL, Chow LC, Brown WE. A microanalytical procedure for the determination of calcium, phosphate and fluoride in enamel biopsy samples. *Caries Res.* 1983; 17(1): 23-31.

Vogel GL, Mao Y, Carey CM, Chow LC. Increased overnight fluoride concentrations in saliva, plaque, and plaque fluid after a novel two-solution rinse. *J Dent Res.* 1997 Mar; 76(3): 761-7.

Vogel GL, Schumacher GE, Chow LC, Takagi S, Carey CM. Ca pre-rinse greatly increases plaque and plaque fluid F. *J Dent Res.* 2008 May; 87(5): 466-9.

Vogel GL. Oral fluoride reservoirs and the prevention of dental caries. *Monogr Oral Sci.* 2011; 22: 146-57.

Wood SR, Kirkham J, Marsh PD, Shore RC, Nattress B, Robinson C. Architecture of intact natural human plaque biofilms studied by confocal laser scanning microscopy. *J Dent Res.* 2000 Jan; 79(1): 21-7.

Zero DT, van Houte J, Russo J. Enamel demineralization by acid produced from endogenous substrate in oral streptococci. Arch Oral Biol. 1986; 31(4): 229-34.

Zero DT, Fu J, Anne KM, Cassata S, McCormack SM, Gwinner LM. An improved intra-oral enamel demineralization test model for the study of dental caries. J Dent Res. 1992 Apr; 71 Spec No: 871-8.

Zero DT. *In situ* caries models. Adv Dent Res. 1995 Nov; 9(3): 214-30.

ANEXO 1 – Estrutura molecular dos sítios de ligação de Ca e F na superfície bacteriana.

