



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

MATEUS XAVIER DE QUEIROZ

**ESTUDO DA CONCENTRAÇÃO DE ÍONS CÁLCIO, FOSFATO E
FLUORETO NA MATRIZ EXTRACELULAR DO BIOFILME FORMADO
SOB EXPOSIÇÃO À SACAROSE**

PIRACICABA

2017

MATEUS XAVIER DE QUEIROZ

**ESTUDO DA CONCENTRAÇÃO DE ÍONS CÁLCIO, FOSFATO E
FLUORETO NA MATRIZ EXTRACELULAR DO BIOFILME FORMADO
SOB EXPOSIÇÃO À SACAROSE**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de Odontologia de
Piracicaba da Universidade Estadual de
Campinas como parte dos requisitos
exigidos para obtenção do título de Cirurgião
Dentista.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Antônio Pedro Ricomini Filho

Este exemplar corresponde à versão final
do trabalho de conclusão de curso
apresentado pelo aluno Mateus Xavier de
Queiroz e orientado pelo prof. Dr. Antônio
Pedro Ricomini Filho.

PIRACICABA

2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): Não se aplica.

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Marilene Girello - CRB 8/6159

Q32e Queiroz, Mateus Xavier de, 1994-
Estudo da concentração de íons cálcio, fosfato e fluoreto na matriz extracelular do biofilme formado sob exposição à sacarose / Mateus Xavier de Queiroz. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Antônio Pedro Ricomini Filho.
Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Biofilme. 2. Fluoretos. 3. Sacarose. I. Ricomini Filho, Antônio Pedro, 1983-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações adicionais, complementares

Palavras-chave em inglês:

Biofilms

Fluorides

Sucrose

Titulação: Cirurgião-Dentista

Data de entrega do trabalho definitivo: 02-10-2017

**Ao meu pai e minha mãe por não medirem esforços
para me verem feliz, realizarem os meus sonhos e
me ajudarem a completar essa jornada.**

**A avó que me criou por me ajudar a ser o homem
que sou hoje; certamente isso contribuiu para que
eu chegasse até aqui.**

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Antônio Pedro Ricomini-Filho, por sua poderosa orientação e imprescindível disposição em aceitar desafios. Agradeço pela oportunidade de ser sua primeira orientação em um trabalho de conclusão de curso e por toda paciência, aprendizado, exemplo e competência durante esse processo.

A prof. Dra. Livia Maria Andaló Tenuta, minha orientadora de iniciação científica, pela paixão e comprometimento que demonstra ter pela ciência. Sempre exigiu não menos do que isso de mim, o que teve grande impacto na minha formação durante a graduação e escolhas após esta. Obrigado, pois decidi seguir carreira acadêmica e sempre carregarei seu exemplo comigo para que eu possa me espelhar.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Campinas, na pessoa do Magnífico Reitor **Prof. Dr. Marcelo Knobel**.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, na pessoa do Diretor **Prof. Dr. Guilherme Elias Pessanha Henriques**.

Ao **Prof. Dr. Flávio Henrique Baggio Aguiar**, coordenador do Curso de Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas.

Ao **Prof. Dr. Jaime Aparecido Cury** e às **Profas. Dras. Cínthia Pereira Machado Tabchoury e Altair A. Del Bel Cury** pela preciosa oportunidade de aprender e contar com suas contribuições durante todo meu tempo de iniciação científica e, principalmente, no Seminário de Tópicos Avançados em Cariologia.

Aos técnicos do laboratório de Bioquímica Oral da FOP-UNICAMP, **Waldomiro Vieira Filho** e **José Alfredo da Silva**, pela ajuda, paciência e agradável convivência durante a iniciação científica.

Aos meus **Professores de Graduação**, detentores do conhecimento das mais diversas áreas, por compartilhar seus ensinamentos e experiências, além de fortalecerem meu caráter após esses anos de formação.

Aos **Amigos da Graduação**, que tive a alegria de conhecer, por dividirem aquela que é chamada “a melhor fase de nossas vidas”.

Ao “**Quadrado**”, **Júlia, Karen, Karina** e **Lorena**, que foram minhas vizinhas de box nos atendimentos da clínica, por tornarem meus dias mais divertidos.

À **Larissa** e ao **Renan** por dividiram momentos inesquecíveis durante nosso tempo de iniciação científica na área de cariologia.

À todos os **Pós-graduandos** da área de cariologia pela disposição e aprendizado. Em especial à **Bárbara, Diego** e ao **João Gabriel** por contribuírem e me influenciaram positivamente com seus exemplos e suas amizades.

Àqueles que torceram por mim durante esse tempo e muito mais, pela alegria que compartilham comigo ao concluir mais essa etapa da minha vida.

RESUMO

Cárie dentária é definida como uma doença multifatorial, sendo que dois fatores são necessários para o desenvolvimento da doença, presença de biofilme acumulado sobre a superfície dental e exposição frequente a açúcares fermentáveis. Dentre os açúcares presentes na dieta humana, que podem ser fermentáveis pelas bactérias do biofilme dental, a sacarose é considerada o mais cariogênico. A maior cariogenicidade não se deve somente à produção de ácidos, mas principalmente à síntese de polissacarídeos extracelulares (PEC) por enzimas bacterianas. Os PEC além de contribuírem para adesão de células, facilitando a formação de biofilme sobre a superfície dental, também altera a matriz do biofilme na qual as células estão dispersas. A presença de uma matriz rica em PEC tem sido associada à redução da concentração de íons cálcio (Ca), fosfato (Pi) e fluoreto (F), os quais são importantes para os eventos de desmineralização e remineralização das estruturas dentais. O objetivo deste trabalho foi investigar como as concentrações de cálcio, fosfato e fluoreto podem ser encontradas biodisponíveis no biofilme dental e como a presença de sacarose na formação do biofilme pode alterar as concentrações destes íons. A presença desses íons no biofilme, de onde eles poderiam ser liberados para o fluido do biofilme, é associada à capacidade de ativar a remineralização e reduzir a desmineralização dental. Ainda não está claro na literatura como a exposição do biofilme à sacarose poderia diminuir as concentrações desses íons. No entanto, estudos recentes verificaram que as concentrações de Ca, Pi e F no biofilme não influenciam as concentrações encontradas no fluido, sendo assim, outros mecanismos poderiam ser responsáveis por esse efeito. Dentre estes íons, grande destaque tem sido dado ao íon F, o qual quando presente no biofilme contribui para evitar a desmineralização das estruturas dentais, favorecendo também ativação da remineralização. Assim, tendo em vista o efeito benéfico anticárie do F, tem sido sugerido que reservatórios desse íon no biofilme poderiam liberá-lo durante uma queda de pH para o fluido. Estes reservatórios seriam de grande importância principalmente nos biofilmes formados na presença de sacarose. Apesar do conhecimento já estabelecido na literatura, novos estudos são necessários para compreender como os íons Ca, Pi e F se apresentam em biofilme formado na presença de sacarose, bem como métodos para criação de reservatórios que evitem o desenvolvimento de cárie dental.

Palavras-chave: Biofilme, Fluoreto, Sacarose, Reservatórios.

ABSTRACT

Dental caries is defined as a multifactorial disease, and two factors are essential for the disease development, presence of biofilm accumulated over dental surface and frequent exposure to fermentable sugars. Among the sugars present in human diet, that can be fermented by dental biofilm bacteria, sucrose is considered the most cariogenic. The highest cariogenicity is not just about acid production, but mainly to the synthesis of extracellular polysaccharide (EPS) by bacterial enzymes. EPS besides to contribute to cells adhesion, facilitating biofilm formation on dental surface, also changes the biofilm matrix in which cells are dispersed. The presence of a EPS rich matrix has been associate to a reduction of the concentration of calcium (Ca), phosphate (Pi) and fluoride (F) ions, which are important for the demineralization and remineralization events of dental structures. The aim of this study was to investigate how calcium, phosphate and fluoride concentrations can be found bioavailable in dental biofilm and how the presence of sucrose can change concentration of these ions. The presence of these ions in biofilm, where they can be released to the biofilm fluid, is associated to the capacity of activating dental remineralization and reducing dental demineralization. It is not yet clear in the literature how the exposure of the biofilm to sucrose could decrease the concentrations of these ions. However, recent studies verified that Ca, Pi and F concentrations in biofilm did not influence the concentration in biofilm fluid, then, other mechanisms could be responsible for this effect. Among these ions, a great emphasis has been given to F ion, which when present in biofilm contributes to avoid dental structure demineralization, also favoring the activation of remineralization. Therefore, in view of the F beneficial anticaries effect, it has been suggested that reservoirs of this ion could release it during a pH drop to the fluid. These reservoirs would be of great importance mainly in the biofilms formed in the presence of sucrose. Despite the knowledge already established in literature, new studies are necessary to understand how Ca, Pi and F ions are present in the biofilm formed in the presence of sucrose, as well as methods for creating reservoirs that prevent dental caries development.

Key-words: Biofilm, Fluoride, Sucrose, Reservoirs.

SUMÁRIO

- 1 INTRODUÇÃO
 - 2 PROPOSIÇÃO
 - 3 REVISÃO DA LITERATURA
 - 4 DISCUSSÃO
 - 5 CONCLUSÃO
- REFERÊNCIAS

1. INTRODUÇÃO

A cárie dentária é uma doença biofilme-açúcar dependente, sendo caracterizada pela desmineralização progressiva dos minerais dentais por ácidos produzidos por bactérias quando expostas frequentemente a carboidratos fermentáveis (Fejerskov e Kidd, 2008). O biofilme dental possui uma porção aquosa denominada fluido do biofilme, o qual permeia as células bacterianas e a matriz extracelular (Tenuta et al., 2006). Em uma condição de equilíbrio, o fluido do biofilme possui concentrações de cálcio (Ca), fosfato (Pi) e fluoreto (F) que evitam a desmineralização dental. No entanto, quando há frequente liberação de ácidos do metabolismo bacteriano, ocorre aumento da concentração de prótons (H^+) no biofilme, o qual irá interferir no equilíbrio dos íons Ca, Pi e F, favorecendo assim a desmineralização da estrutura dental (Margolis e Moreno, 1992; Marsh, 1994). Sendo assim, o estudo das concentrações de Ca, Pi e F no biofilme dental, mais especificamente no fluido do biofilme, é de extrema importância, pois governam a ocorrência de desmineralização ou remineralização dental (Carey et. al., 1986; Vogel et. al., 1990).

Dentre os carboidratos da dieta humana que podem ser metabolizados pelas bactérias do biofilme, a sacarose é considerada o mais cariogênico (Cury et al., 1997), pois além de ser fermentado a ácidos, serve de substrato para a produção de polissacarídeos extracelulares (PEC) (Rølla, 1994). A maior presença desses PECs torna o biofilme mais cariogênico, pois aumenta o volume e porosidade dele, e contribui para a adesão de novos microrganismos (Dibdin e Shellis, 1988; van Houte, 1994). Estudos também têm demonstrado que o biofilme exposto apenas à sacarose tem concentrações dos íons Ca, Pi e F reduzida (Tenuta et al, 2006). Nesse sentido, é provável que, em biofilmes expostos em menor frequência à sacarose, esses íons sejam encontrados em forma de minerais precipitados, sendo que em biofilmes expostos à uma maior frequência de sacarose, esses minerais seriam dissolvidos devido ao ambiente acidogênico criado pelas bactérias ao metabolizarem açúcares. Porém, ainda não está claro na literatura como a presença de sacarose no biofilme pode influenciar a concentração desses íons.

Além desses íons poderem ser encontrados na forma de minerais precipitados, outras formas de retenção de F têm sido estudadas para que em um momento de queda do pH no biofilme, o íon F possa ser liberado para o fluido do biofilme e interferir nos processos de des e remineralização dental, ou seja, ter seu efeito anticárie já

estabelecido na literatura (Vogel, 2011). Nesse contexto, é aceito que o F poderia ser retido no biofilme dental de duas formas: 1. por interação com o cálcio (Ca) ligado à superfície bacteriana e proteínas da matriz do biofilme (Rose et al., 1996), chamado de reservatório biológico; ou 2. reservatórios na forma de minerais precipitados contendo F, tipo fluoreto de cálcio (CaF_2).

Assim, o presente trabalho investigou o que a literatura tem encontrado sobre a relação entre a matriz extracelular do biofilme formado sob a exposição à sacarose e como esse carboidrato pode influenciar nas diferentes disponibilidades dos íons Cálcio, Fosfato e Fluoreto no biofilme dental.

2. PROPOSIÇÃO

O objetivo deste trabalho foi investigar na literatura científica disponível como as concentrações de cálcio, fosfato e fluoreto podem ser encontradas biodisponíveis no biofilme dental e como a presença de sacarose na formação do biofilme pode alterar as concentrações destes íons.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 CÁRIE DENTÁRIA

A perturbação no equilíbrio físico-químico entre o mineral do dente – hidroxiapatita - e os íons Ca, Pi e F no fluido do biofilme é o que determina essa doença, a cárie dentária (Fejerskov e Nyvad, 2003). Essa perturbação ocorre devido a alterações em uma complexa comunidade de microrganismos formada sobre a estrutura dentária denominado biofilme dental. As bactérias nesse biofilme ao metabolizarem carboidratos fermentáveis produzem ácidos e, conseqüentemente, queda no pH que ocasionará a desmineralização do esmalte dental (Marsh, 1994).

Outra forma de definir a doença cárie é que esta é biofilme-açúcar dependente, justamente porque as lesões de cárie só acontecerão nas regiões dentárias em que há acúmulo de biofilme. E açúcar dependente, pois a atividade metabólica do biofilme é um fator determinante nas flutuações do pH frente ao consumo de carboidratos fermentáveis (Fejerskov, 2004). Essas mudanças de pH no biofilme significam que se houve uma queda, haverá maior quantidade de prótons H^+ para interagirem com íons Ca, Pi e F em equilíbrio com o esmalte dentário, e, com isso, induzirem a desmineralização; ou que houve uma estabilização do pH por meio de efeito tampão e, com isso, uma ativação da remineralização do esmalte dentário (Margolis e Moreno, 1992). Assim, quando há mais eventos de desmineralização do que de remineralização ou quando o primeiro não é compensado pelo segundo, haverá perda mineral e conseqüentes lesões de cárie (Fejerskov et al, 2008).

Percebe-se, então, que os fatores que permeiam a cárie dentária são mais complexos e amplos, uma vez que, eles podem ser influenciados por características genéticas, ambientais e comportamentais (Fejerskov e Manji, 1990). Assim, cárie também pode ser definida como uma doença multifatorial em que há os fatores atuando sobre a estrutura dentária, os determinantes biológicos, e os fatores que atuam sobre o indivíduo/população, os determinantes distais. Esses determinantes foram organizados por Fejerskov e Manji em um diagrama (Figura 1):

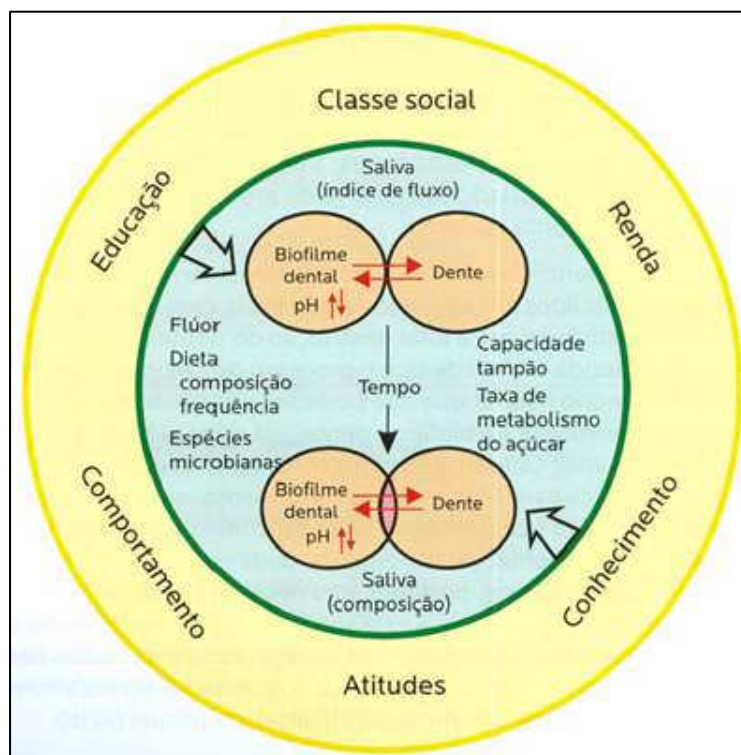


Figura 1 – Fatores determinantes do processo de cárie.

Fonte: Fejerskov e Manji, 1990.

Assim, ainda que o biofilme seja um fator biológico essencial para que ocorram os processos de des e remineralização, e conseqüente formação de lesões de cárie, no entanto, sua presença apenas não é capaz de induzir a formação dessas lesões. São necessários outros fatores que irão determinar a cariogenicidade ou não desse biofilme como, por exemplo, o tipo de nutriente a que esse meio é exposto (Fejerskov, 2004).

O biofilme, como dito anteriormente, é uma complexa comunidade de microrganismos formada sobre a superfície dentária, onde as bactérias presentes quando expostas frequentemente a carboidratos fermentáveis irão metabolizá-los e produzir ácidos. A presença constante desses ácidos nessa comunidade de microrganismos irá selecionar aqueles que são acidúricos e acidogênicos, ou seja, o número de bactérias produtoras de ácido irá aumentar, tornando o biofilme um ambiente acidúrico (Marsh, 1994). Isso acarretará em um desequilíbrio dos íons Ca, Pi e F presentes no biofilme e fluido do biofilme com a estrutura dental, ocorrendo maiores eventos de desmineralização e levando ao desenvolvimento de lesões de cárie (Fejerskov et al, 2008) (Figura 2).

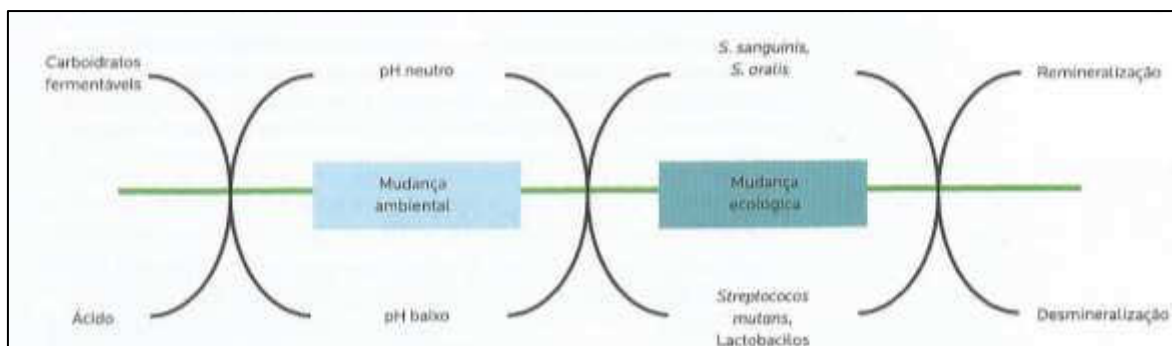


Figura 2 – Mudanças no biofilme frente a constante exposição a carboidratos fermentáveis.

Fonte: Marsh, 1994.

Além da produção de ácidos a partir da metabolização de carboidratos fermentáveis, a sacarose é um tipo de nutriente/carboidrato que pode atuar aumentando a cariogenicidade do biofilme (Dibdin e Shellis, 1988). As bactérias da espécie *Streptococcus mutans* utilizam esse açúcar como substrato para a síntese de PECs (polissacarídeos extracelulares) que tornarão a placa bacteriana mais volumosa e porosa, permitindo uma maior difusão dos ácidos por todo o biofilme (Newbrun, 1967; van Houte, 1994). Nesse sentido, a literatura tem demonstrado que biofilmes expostos à sacarose tem ainda uma menor presença dos íons Ca, Pi e F, contribuindo também para uma maior perda mineral da estrutura dentária (Tenuta et al, 2006; Ribeiro et al, 2005).

Tendo isso em vista, estudos têm sido conduzidos para elucidar a forma como as bactérias do biofilme têm contribuído para aumentar a cariogenicidade desse ambiente frente a exposições do carboidrato fermentável sacarose.

3.2 CARIOGÊNICIDADE DA SACAROSE

3.2.1 ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS

A sacarose é um carboidrato fermentável formado pela união de dois monossacarídeos, glicose e frutose, através de uma ligação glicosídica. Essa ligação pode ser hidrolisada por enzimas bacterianas e sintetizarem polissacarídeos extracelulares (PECs) (Newbrun, 1967). Os PECs tornam a matriz do biofilme mais volumosa e porosa, facilitando a difusão dos açúcares, provenientes da dieta, e a adesão de novos microorganismos (Dibdin and Shellis, 1988). Assim, o ambiente desse meio torna-se mais acidúrico, selecionando as bactérias capazes de sobreviver nessas condições e as produtoras de ácido (Marsh et al., 2011). A constante produção de ácidos no biofilme induzirá a desmineralização do esmalte dental, por isso, a sacarose tem sido considerada um dos carboidratos fermentáveis mais cariogênicos dentre os presentes na dieta.

A hipótese da placa ecológica (Marsh, 1994) explica essas mudanças que ocorrem no biofilme, em que esse ambiente sai de uma condição de equilíbrio da microbiota, saúde ou simbiose, e pode entrar em uma condição de doença, ou disbiose, devido a proliferação dos microrganismos patogênicos (Marsh, 1994). Dentre esses microrganismos está o *Streptococcus mutans*, que além da produção de ácidos, possui um aparato de enzimas capazes de sintetizar polissacarídeos extracelulares a partir da hidrolização da molécula de sacarose (Russell, 2009).

A espécie *S. mutans* pode produzir enzimas como a glucosiltransferases (GTF) e frutossiltransferases (FTF) para quebrar a molécula de sacarose (Bowen e Koo, 2011). Quando a sacarose é hidrolisada pelas FTFs, é utilizada a frutose da molécula de sacarose para síntese de polissacarídeos de frutanos, enquanto a glicose é liberada para produção de ácidos (Colby e Russel, 1997). Os PECs produzidos pelas FTFs são solúveis e servem de reserva energética para as células bacterianas quando não há exposição a carboidratos. Já, as GTFs podem ser produzidas em três diferentes tipos (B, C e D) e sintetizam polissacarídeos de glucano utilizando a glicose da molécula de sacarose, enquanto a frutose é liberada para ser metabolizada pelas bactérias e produzir ácidos. Os PECs produzidos pelas GTFs podem ser solúveis ou insolúveis, o que é determinado pelo tipo de GTF produzida pelo *S. mutans*. A GTF tipo B produz glucanos insolúveis, que podem se ligar a outros microrganismos e também torná-los

produtores de glucanos; a GTF C sintetiza um polímero misto, ou seja, glucanos com características solúveis e insolúveis (Bowen e Koo, 2011); a GTF D sintetiza apenas glucanos solúveis (Aires et al., 2011; Bowen e Koo, 2011). Assim, os glucanos com características insolúveis formados pelas GTFs B e C tornam a matriz extracelular mais volumosa, aumentando a aderência e agregação bacteriana (Bowen e Koo, 2011), modificam sua estruturação (Xiao et al., 2012; Koo et al., 2013) e promovem uma maior porosidade do biofilme dental (Dibdin e Shellis, 1988). Essa porosidade além de permitir que os açúcares provenientes da dieta penetrem mais no biofilme e nutram as bactérias (Van Houte et al., 1989; Zero et al., 1986), também dificulta a remoção dos ácidos produzidos através da saliva.

3.2.2 ASPECTOS BIOQUÍMICOS

Apesar da relação entre a cariogenicidade do biofilme e a presença de PECs, sintetizados a partir da sacarose, estarem consolidados na literatura (Dibdin e Shellis, 1988; Van Houte et al., 1989; Zero et al., 1986), esses fatores não são os únicos a serem considerados (Cury et al., 1997). A mudança da composição inorgânica do biofilme em equilíbrio com a estrutura dentária quando exposto a sacarose tem sido investigada (Paes Leme et al., 2006). Nesse sentido, estudos têm sido conduzidos para elucidar a relação do biofilme formado sob exposição à sacarose com as concentrações dos íons Ca, Pi e F reduzidas (Tenuta et al., 2006). No entanto, ainda não está claro quais são os mecanismos que reduzem o conteúdo mineral do biofilme nessas condições.

Algumas hipóteses têm sido sugeridas na literatura para explicar esse fenômeno. Paes Leme et al. (2006) organizaram essas hipóteses para melhor entender o papel da sacarose nas propriedades cariogênicas do biofilme, bem como a presença desse carboidrato pode influenciar nas baixas concentrações desses íons nesse meio (figura 3).

1. Depleção dos reservatórios minerais. O constante pH baixo, devido ao metabolismo bacteriano, promoveria uma maior disponibilidade de prótons H^+ que poderiam interagir com os reservatórios minerais e liberá-los (Pearce, 1998). Assim, eles seriam difundidos na saliva, o que resultaria em um biofilme com menor concentração de Ca, Pi e F. Outra hipótese é que o ambiente acidúrico do biofilme não

permitiria a precipitação desses reservatórios (Tenuta et al., 2006). No entanto, os estudos que avaliaram o biofilme formado sob exposição à sacarose, o coletaram após 10 ou 12 horas (Cury et al., 1997, 2000, 2003), o que seria tempo suficiente para reprecipitação desses minerais. Além disso, Cury et al. (2003) não observaram diferença nas concentrações desses íons em biofilmes tratados com sacarose ou não após 48 horas da exposição ter sido interrompida para o primeiro ou promovida para o segundo. Portanto, a diminuição da concentração dos íons no biofilme parece estar mais associada a mudanças na estrutura da matriz do biofilme do que devido à presença dos ácidos produzidos pelo metabolismo bacteriano (Cury et al. 2003).

2. Incorporação dos íons do fluido do biofilme no esmalte dental. Devido as constantes quedas de pH no biofilme, o fluido do biofilme poderia ficar subsaturado em relação a hidroxiapatita, enquanto ainda estaria supersaturado em relação a fluorapatita (Larsen, 1990). Assim, F precipitaria no esmalte dental, porém, isso explicaria apenas a diminuição da concentração de F no fluido do biofilme, mas não as concentração de Ca e Pi. Ainda assim, como dito anteriormente, após 12 horas da exposição a sacarose, os minerais poderiam ser reprecipitados no biofilme dental.

3. Liberação de íons ligados a bactérias. Rose et al. (1996) propõem um tipo de reservatório biológico, em que o fluoreto poderia estar ligado a íons Ca presentes na parede bacteriana. Porém, esta retenção depende do equilíbrio com a concentração destes íons no fluido do biofilme e do seu pH, uma vez que o Ca está retido por meio de grupamentos aniônicos, nos quais também pode haver a ligação de íons hidrogênio (H^+). Assim, a quantidade de íons Ca e F ligados a essas estruturas diminuiria quando houvesse quedas de pH (Rose et al., 1993; 1996), pois o Ca é substituído nos sítios de ligação pelo íon hidrogênio. No entanto, além de esses reservatórios poderem ser reestabelecidos após o pH normalizar, também não é explicada a queda nas concentrações de Pi em biofilmes crescidos sob exposição à sacarose (Cury et al, 2003; Pecharki et al, 2005; Ribeiro et al., 2005; Aires et al, 2006).

4. Baixa densidade bacteriana. O biofilme formado sob exposição a sacarose apresenta maior concentração de PECs (Cury et al., 1997; Pearce et al., 2002), que por sua vez, aumenta o volume da matriz extracelular. Assim, o número de células bacterianas fica reduzido, assim como os sítios de ligação disponíveis para formar os

reservatórios biológicos citados anteriormente (Carlsson e Sundstrom, 1968; Pearce et al, 2002). Porém, novamente, essa hipótese explicaria apenas a diminuição da concentração dos íons Ca e F, e não de Pi.

5. Baixa concentração de proteínas específicas. Estudos têm demonstrado que 50% do Ca presente no biofilme dental está ligado a proteínas (Gao et al., 2001). Essa interação poderia funcionar como reservatórios de Ca que modulariam a formação de minerais e, assim, interferir nos processos de des e remineralização. Nesse sentido, Paes Leme et al. (2003) avaliaram a presença desse tipo de proteína em biofilme expostos ou não a sacarose, sendo observada a sua presença apenas em biofilmes formados sob a ausência desse açúcar (Paes Leme et al., 2004). A maior presença de PECs, sintetizados a partir da sacarose, aumenta o volume da matriz do biofilme e, com isso, poderia diminuir a presença dessas proteínas. A ausência dessas proteínas no biofilme poderia explicar as baixas concentrações de Ca no fluido do biofilme, que iniciaria o processo de desmineralização do esmalte dental devido a condições de subsaturação. Entretanto, os mecanismos envolvendo esse tipo de proteína específica e sua relação com íons cálcio ainda precisam ser elucidadas.

Assim, a cariogenicidade da sacarose é um fator relevante para biofilme dental, principalmente a sua associação com a diminuição concentração dos íons Ca, Pi e F no biofilme total (Cury et al., 1997, 2003; Tenuta et al., 2006). Porém, o pH e as concentrações desses íons no fluido do biofilme é o que determina a saturação do mineral dental e, portanto, os eventos de des e remineralização (Margolis e Moreno, 1992). Nesse sentido, seria possível que biofilmes expostos em menor frequência à sacarose, fosse encontrado esses íons em forma de minerais precipitados e em biofilmes expostos à uma maior frequência de sacarose, esses minerais seriam dissolvidos devido ao ambiente acidogênico criado pelas bactérias ao metabolizarem esse açúcar. Dessa forma, manter altas concentrações desses íons no biofilme para serem precipitados na forma de minerais seria importante para interferir nos processos de des e remineralização do esmalte dental. No entanto, Tenuta et al. (2006) ao avaliaram o efeito da sacarose no fluido do biofilme, observaram que as concentrações dos íons Ca, Pi e F no biofilme total não refletem as concentrações encontradas no fluido do biofilme. Assim, as concentrações de Ca, Pi e F no biofilme dental aparentam

não influenciarem na manutenção desses íons no fluido do biofilme (Tenuta et al., 2006).

Diante disso, outras formas para intervir na perda mineral devido a diminuição dos íons Ca, Pi e F no biofilme exposto a sacarose tem sido estudada. Sabe-se que o efeito benéfico anticárie do fluoreto está consolidado na literatura (ten Cate, 1997; Cury e Tenuta, 2008) e consiste na manutenção de níveis satisfatórios desse íon nos fluídos bucais, e principalmente no fluido do biofilme, de onde ele pode interferir nos processos de des e remineralização, pela precipitação de fluorapatita (Featherstone, 2000; Vogel, 2011). Nesse sentido, o estudo das formas de retenção do F no biofilme dental e sua manutenção após exposição a condições cariogênicas ajudaria no desenvolvimento de métodos que o mantenham por mais tempo no biofilme dental. Recentemente a literatura tem demonstrado formas eficazes de atingir esse objetivo (Vogel et al., 2008a, 2008b, 2014; Souza et al., 2016).

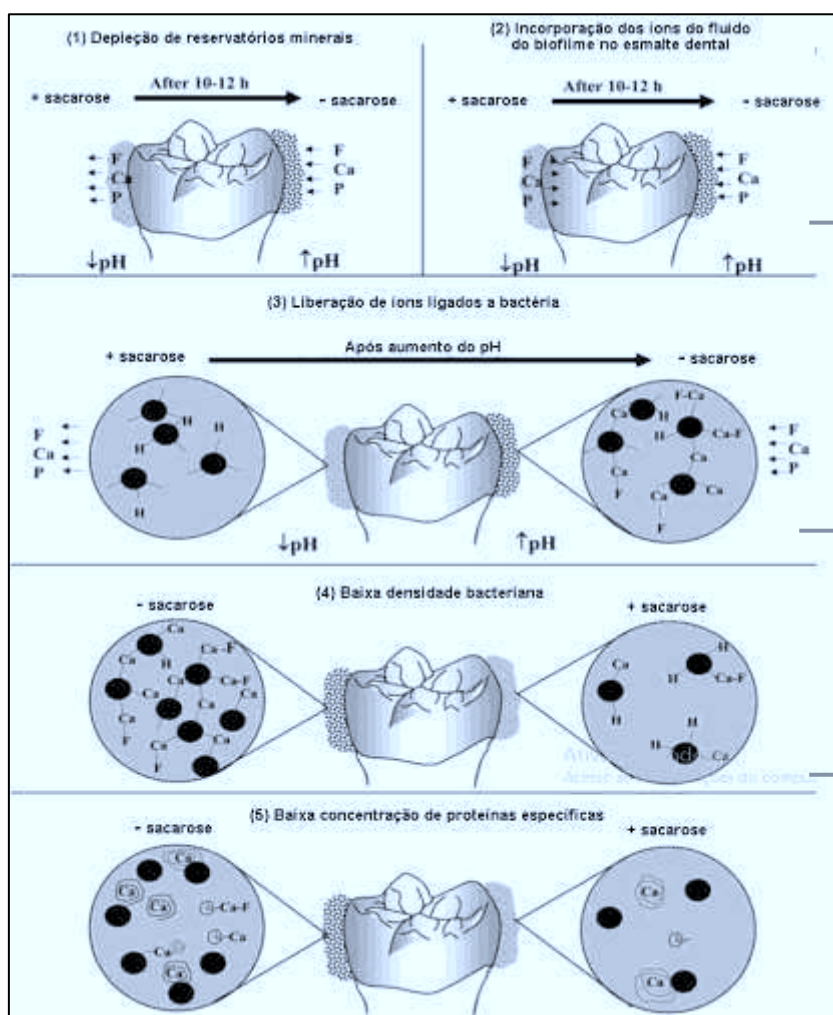


Figura 3 – Ilustração das hipóteses.

Fonte: Paes Leme et al. (2006).

3.3 RESERVATÓRIOS DE F

Nas últimas décadas, tem sido observada uma acentuada redução da prevalência da cárie dentária em diversas partes do mundo (Murray, 1994), inclusive no Brasil (Brasil, Ministério da Saúde, 2011). Os fatores apontados como prováveis responsáveis pelo declínio desta prevalência no Brasil são: o aumento e a universalização da exposição das pessoas ao fluoreto (F) em suas variadas formas de aplicação, com destaque especial para a água de abastecimento e os dentifrícios fluoretados; e a maior ênfase nas atividades de promoção de saúde (Cury et al., 2004, Narvai et al., 2000). Entretanto, a cárie ainda é uma doença extremamente prevalente no Brasil, segundo levantamentos epidemiológicos (Brasil, Ministério da Saúde, 2011).

Nesse contexto, medidas preventivas mais eficazes, que permitam potencializar o efeito anticariogênico do flúor, deveriam ser pesquisadas. É consenso que os íons F interferem na progressão da lesão de cárie quando disponíveis no fluido do biofilme no momento do desafio cariogênico, quando há reversão da perda mineral líquida que ocorre na estrutura mineral do dente pela precipitação do mineral menos solúvel fluorapatita (FA), ao mesmo tempo em que a hidroxiapatita se dissolve (ten Cate, 1997; Cury e Tenuta, 2008). Diante disso, estudos prévios demonstraram que os reservatórios de fluoreto de cálcio formados no biofilme dental podem manter as concentrações de fluoreto no meio bucal ao liberarem esse íon durante a queda do pH para interferir nos processos de desmineralização e remineralização (Featherstone, 2000; Vogel, 2011, 2014).

Os reservatórios de F podem ser encontrados basicamente de duas formas biofilme dental: 1. por interação com o cálcio (Ca) ligado à superfície bacteriana e proteínas da matriz do biofilme (Rose et al., 1996), chamado de reservatório biológico; ou 2. reservatórios na forma de minerais precipitados contendo F, tipo fluoreto de cálcio (CaF_2) ou fluorapatita. Vogel (2011) organizou em sua monografia as características anticáries de cada um desses reservatórios.

1. Fluorapatita. A formação e concentração desse mineral no biofilme dental foi considerada uma das melhores formas de prevenir cárie dentária, uma vez que, mesmo sob condições cariogênicas não é dissolvido (Chow, 1990; Pearce et al., 1999). No entanto, como observado por Tenuta et al. (2006), as concentrações de F no biofilme total não influenciam nas concentrações do fluido do biofilme. Assim, o F importante é aquele que é liberado para o fluido do biofilme (Margolis e Moreno, 1992) e fluorapatita seria uma fonte pobre desse íon nesse meio.

2. Fluoreto de cálcio. A formação do “CaF₂” 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 (Rølla e Saxegaard, 1990; Ogaard, 1983). Esse tipo de reservatório seria uma desejável fonte de F livre, pois pode formar depósitos em regiões com atividade de cárie e liberar esse íon durante um desafio cariogênico (tem Cate, 1997).

3. Reservatórios biológicos. O modelo de ligação do F a íons Ca presente na parede bacteriana proposto por Rose et al. (1996) e outros sítios de ligação como proteínas, tecido mucoso ou fragmentos bacterianos aparentam ter o mesmo mecanismo de retenção e liberação do F para o fluido do biofilme. Esta retenção depende do equilíbrio com a concentração destes íons no fluido do biofilme e do seu pH, uma vez que o Ca está retido por meio de grupamentos aniônicos, nos quais também pode haver a ligação de íons hidrogênio (H⁺). Assim, a quantidade de íons Ca e F ligados a essas estruturas diminui quando o pH cai de 6,5 para 5,0 (Rose et al., 1993; 1996), pois o Ca é substituído nos sítios de ligação pelo íon hidrogênio, disponibilizando o primeiro, e consequentemente F, para o fluido do biofilme (Figura 4).

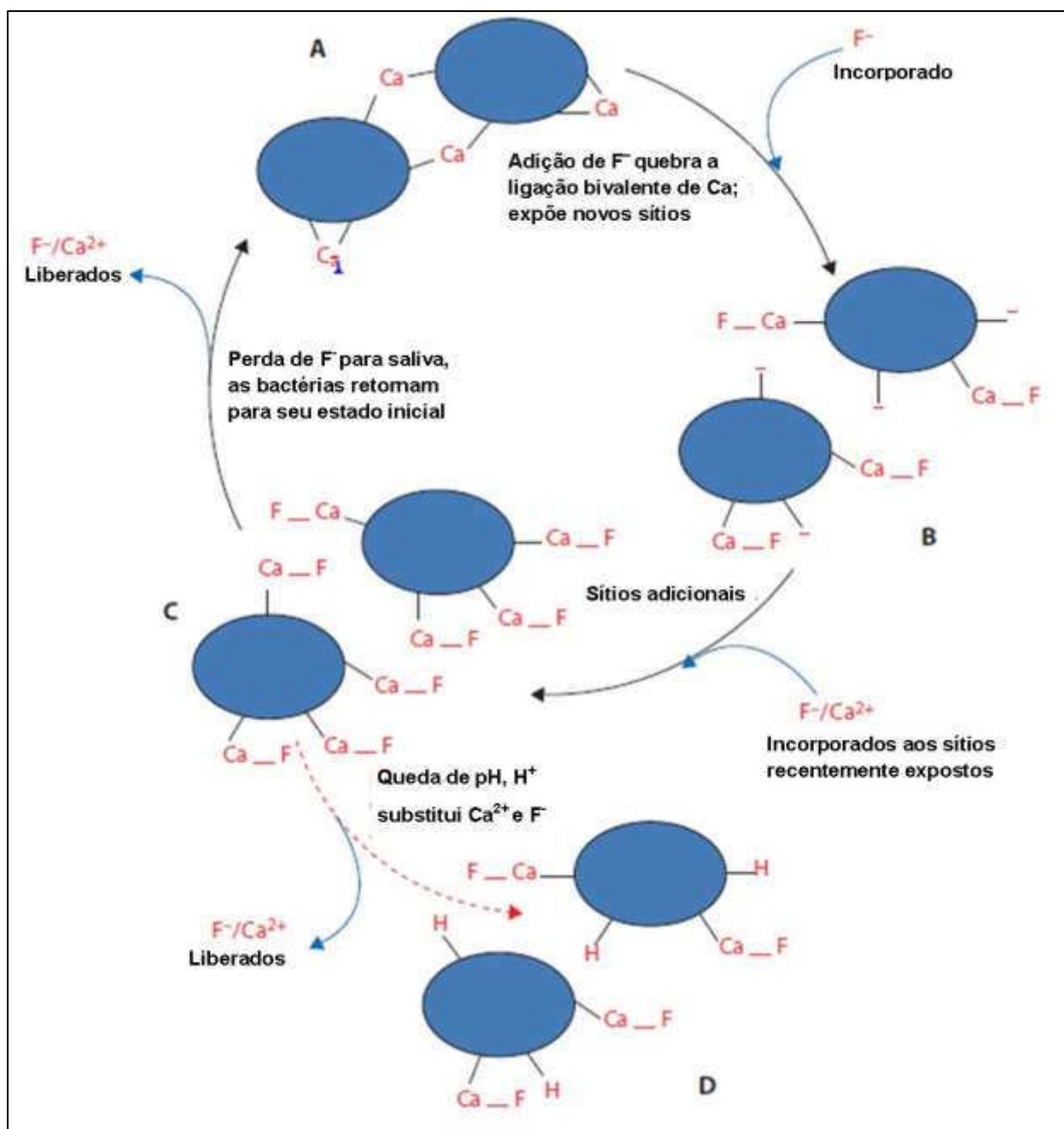


Figura 4 – Modelo dos reservatórios biológicos proposto por Rose et al. (1996).

Fonte: Vogel (2011).

Assim, foi recentemente proposto na literatura uma forma de aumentar o tempo de permanência do fluoreto nos fluidos bucais, pela formação de reservatórios de fluoreto de cálcio no biofilme dental remanescente após a higiene (Vogel et al., 2008a, 2008b, 2014). Este fluoreto de cálcio é formado no biofilme dental por um bochecho com solução contendo cálcio (Ca), visando aumentar a concentração de cálcio livre na cavidade bucal, previamente a utilização de um produto fluoretado, e consequentemente favorecer a formação de fluoreto de cálcio mesmo utilizando

produtos com concentração de F de uso diário, que normalmente não formam esse produto de reação (Vogel et al., 2010). Estudos in vivo avaliando a capacidade de enriquecimento do biofilme dental com F utilizando esse protocolo (pré-bochecho com cálcio seguido de bochecho com solução fluoretada) demonstraram aumentos na concentração de F da ordem de 12 vezes ou mais no biofilme total e 5 vezes ou mais no fluido do biofilme (Vogel et al., 2008a; Vogel et al., 2014), indicando potencial de aumento do efeito anticárie.

Tendo isso em vista, Souza et al. (2016) avaliaram o efeito dos reservatórios de fluoreto de cálcio formados a partir de um pré-bochecho de cálcio seguido de uma solução fluoretada no processo de desmineralização e remineralização do esmalte dentário in situ. Eles observaram que a inibição da desmineralização foi maior no grupo utilizando pré-bochecho de Ca quando comparada com o placebo e 250 ppm de F e equivalente ao grupo com 1000 ppm de F. No entanto, a remineralização dos grupos usando bochechos com F diferiram apenas do grupo de placebo, sem diferença entre eles. Assim, os resultados sugeriram que um pré-bochecho com Ca pode potencializar o efeito do bochecho fluoretado para reduzir a desmineralização do esmalte.

Portanto, o estudo do efeito anticárie do F já estabelecido na literatura (ten Cate, 1997; Cury e Tenuta, 2008) e como ele poderia ser potencializado através dos reservatórios de fluoreto (Featherstone, 2000; Vogel, 2011) tem ajudado no desenvolvimento de métodos (Vogel et al., 2008a; Vogel et al., 2014; Souza et al., 2016), que mantenham esse íon no fluido do biofilme para interferir nos processos de des e remineralização, mesmo diante das condições cariogênicas promovidas pela exposição à sacarose.

4. DISCUSSÃO

A cárie dentária tem sido definida como uma doença multifatorial, em que tanto determinantes biológicos quanto determinantes agindo sobre o indivíduo/população seriam responsáveis por seu desenvolvimento (Fejerskov e Manji, 1990). Porém, a presença do biofilme e a exposição a carboidratos fermentáveis são fatores essenciais para que ocorra o aparecimento de lesões de cárie na estrutura dentária (Fejerskov, 2004).

Outras teorias explicariam a doença cárie como a hipótese da placa específica (Loesche, 1976), microrganismos específicos no biofilme seriam responsáveis por desenvolver cárie. No entanto, cárie podia ser observada na ausência desses microrganismos específicos ou não era observada na presença deles. Assim, outra teoria também intenta explicar a doença cárie, a hipótese da placa inespecífica (Theilade, 1986). Devido a grande diversidade de microrganismos no biofilme e sua interação com o hospedeiro é que a doença cárie seria causada. Entretanto, o biofilme apresenta a predominância de algumas espécies em sua condição patogênica. Assim, a hipótese da placa ecológica é a que melhor explica o desenvolvimento da doença cárie (Marsh, 1994). Essa teoria propõe que após a exposição do biofilme a carboidratos fermentáveis e, conseqüentemente, produção de ácidos, ocorre uma seleção dos microrganismos capazes de sobreviver a esse novo ambiente. Assim, o biofilme sai de uma condição de saúde para uma condição em que os microrganismos acidúricos e acidogênicos estão em maior quantidade (Marsh et al., 2011). Essa mudança promoverá maiores concentrações de prótons (H^+) para interagirem com os íons Ca, Pi e F no fluido do biofilme e, assim, induzirem a desmineralização da estrutura dentária (Fejerskov et al, 2008).

Além disso, o tipo de nutriente a que esse biofilme é exposto poderia potencializar sua cariogenicidade (Fejerskov, 2004). O amido, por exemplo, presente nas dietas primitivas como fonte de energia, tem baixo potencial cariogênico comprovado por diversos estudos (Ribeiro et al., 2005). Já a sacarose tem sido considerada um dos carboidratos fermentáveis mais cariogênicos que estão presentes na dieta contemporânea, isso tem sido atribuído a maior presença de PECs em sua presença (Newbrun, 1967). Os polissacarídeos sintetizados por enzimas de *Streptococcus mutans* aumentam a porosidade da matriz extracelular e, assim, permite que os carboidratos da dieta se difundam mais facilmente por todo o biofilme e ocorra

produção de ácidos mais próximo da estrutura dental (Zero et al., 1992; Zero, 1995), contribuindo para sua desmineralização (Newbrun, 1967; van Houte, 1994). Adicionalmente, a associação da sacarose e amido é ainda mais comum na dieta contemporânea (Lingstrom et al., 2000), diante disso, estudos tem avaliado a associação desses dois carboidratos e observaram que a presença de amido pode potencializar ainda mais a cariogenicidade da sacarose (Firestone et al., 1982; Ribeiro et al., 2005).

Biofilme expostos a sacarose também tem apresentado uma menor concentração de íons Ca, Pi e F (Cury et al., 1997, 2000, 2003; Tenuta et al., 2006), o que seria mais um fator cariogênico desse açúcar, já que os íons presentes nesse meio poderiam ser liberados para fluido do biofilme em um momento de queda do pH para interferirem no processo de cárie. Assim, para desenvolver medidas que pudessem interferir na diminuição desses íons no biofilme, diversas hipóteses foram levantadas visando entender o mecanismo que leva a presença da sacarose gerar esse fenômeno, no entanto, ainda não há um consenso na literatura a respeito (Paes Leme et al., 2006).

Entretanto, Tenuta et al. (2006) observaram que a concentração dos íons no biofilme total parecia não influenciar nas concentrações destes no fluido do biofilme, onde ocorre os processos de des e remineralização dental. Nesse estudo, os biofilmes que foram tratados com sacarose e glicose + frutose apresentaram menores concentrações de Ca, Pi e F no biofilme total, mas não houve diferença nas concentrações do fluido do biofilme. Assim, outros mecanismos, que não a concentração desses íons no biofilme total, estariam envolvidos na manutenção de Ca, Pi e F no fluido do biofilme (Tenuta et al., 2006). Diante disso e do efeito anticárie consolidado do fluoreto (ten Cate, 1997; Cury e Tenuta, 2008), o estudo de reservatórios desse íon no biofilme, de onde ele poderia ser liberado para o fluido do biofilme em um momento de queda do pH, passaram a ser explorados. Assim, foi sugerido o uso de um bochecho com solução contendo cálcio (Ca), visando aumentar a concentração de cálcio livre na cavidade bucal, previamente a utilização de um produto fluoretado para potencializar a formação desses reservatórios (Vogel et al., 2008a, 2008b, 2014). Os estudos que avaliaram esse protocolo não só observaram um aumento na concentração de F no biofilme e no fluido do biofilme (Vogel et al., 2008a), como um favorecimento na formação de reservatórios de CaF_2 (Vogel et al., 2014).

Porém, os únicos estudos disponíveis que avaliavam o efeito de um pré-bochecho com Ca na des e remineralização do esmalte (Magalhães et al., 2007; Furlani et al., 2009) não confirmaram a superioridade desse tratamento em relação ao uso isolado do fluoreto. Apesar de estes estudos terem identificado que a utilização prévia da lavagem com Ca resulta em um aumento significativo da concentração de F no biofilme, não foi observado efeito dose resposta ao fluoreto, já que o grupo controle não diferiu do grupo fluoretado, no que diz respeito a avaliação da perda ou ganho de mineral (Magalhães et al., 2007; Furlani et al., 2009). Esses resultados indicaram que os estudos não apresentaram poder para diferenciar os grupos, já que o efeito anticárie do F deveria ter sido demonstrado. Ressalta-se ainda que estes estudos utilizaram o F em forma de dentifrício, porém, os estudos prévios que evidenciaram o aumento dos reservatórios de fluoreto de cálcio no biofilme dental foram a partir da utilização de um pré-bochecho com Ca seguido do uso de solução fluoretada em forma de bochecho (Vogel et al., 2008a, 2008b, 2014). Além disso, dentifrícios contém ingredientes que diminuem a formação de fluoreto de cálcio, como os detergentes (Barkvoll et al., 1988), o que pode ter influenciado os resultados e a avaliação isolada do efeito da combinação entre Ca e F. Assim, Souza et al. (2016) avaliaram o mesmo efeito anticárie seguindo o protocolo proposto com solução contendo cálcio seguida de solução fluoretada em biofilmes crescidos *in situ* sobre blocos de esmalte bovino sob exposições diárias de sacarose. Os resultados deste estudo observaram uma maior redução na desmineralização nos biofilmes tratados seguindo o protocolo, demonstrando que o pré-bochecho com cálcio potencializa o efeito anticárie do fluoreto (Souza et al., 2016).

Portanto, mesmo diante do potencial cariogênico da sacarose em relação à produção de PECs (Newbrun, 1967) ou a sua associação à diminuição dos íons Ca, Pi e F no biofilme (Cury et al., 2003), o efeito benéfico anticárie do fluoreto presente nos fluidos bucais é um dos mais eficazes (Cury e Tenuta, 2008). Assim como, o desenvolvimento de métodos que visem potencializar a concentração desse íon no fluido do biofilme para interferir nos processos de des e remineralização do esmalte dental (Vogel, 2011; Souza et al., 2016).

5. CONCLUSÃO

Apesar do conhecimento já estabelecido na literatura, novos estudos são necessários para compreender como os íons Ca, Pi e F se apresentam em biofilme formado na presença de sacarose, principalmente na ocorrência de diferentes frequências de queda de pH no biofilme. Adicionalmente, apesar dos métodos existentes para criação de reservatórios de F no biofilme dental, novos métodos devem ser desenvolvidos visando sempre aumentar os reservatórios de F no biofilme, os quais são de extrema relevância para o controle de cárie dental frente aos desafios cariogênicos.

REFERÊNCIAS

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.

Aires CP, Tenuta LMA, Carbonero ER, Sasaki GL, Iacomini M, Cury JA. Structural characterization of exopolysaccharides from biofilm of a cariogenic streptococci. *Carbohydr Polym.* 2011, 84 (4), pp. 1215–1220.

Barkvoll P, Embery G, Rølla G. Studies on the interaction between sodium lauryl sulfate and hydroxyapatite using Fourier transformed infrared spectroscopy. *J Biol Buccale.* 1988 Jun;16(2):75-9.

Bowen WH, Koo H. Biology of *Streptococcus mutans* - derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. *Caries Res.* 2011;45(1):69-86.

Brasil, Ministério da Saúde. SB Brasil 2010: pesquisa nacional de saúde bucal – resultados principais. 2011.

Carey CM, Gregory TM, Rupp NW, Tatevossian A, Vogel GL. The driving forces in human dental plaque fluid for demineralization and remineralization of enamel mineral. In: *Factors relating to demineralization and remineralization of the teeth*. Leach SA, editor. Oxford: IRL Press, 1986: 163-173.

Carlsson J, Sundström B. Variations in composition of early dental plaque following ingestion of sucrose and glucose. *Odontol Revy.* 1968;19(2):161-9.

Chow LC. Tooth-bound fluoride and dental caries. *J Dent Res* 1990;69: 595–600.

Colby SM, Russell RR. Sugar metabolism by *mutans streptococci*. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser.* 1997;26:80S-88S.

Cury JA, Rebello MA, Del Bel Cury AA. In situ relationship between sucrose exposure and the composition of dental plaque. *Caries Res.* 1997; 31: 356-360.

Cury JA, Rebelo MAB, Del Bel Cury AA, Derbyshire MTVC, Tabchoury CPM. Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in the presence of sucrose or glucose and fructose. *Caries Res.*, v.34, p.491-497, 2000.

Cury JA, Francisco SB, Simões GS et al. Effect of a calcium carbonate-based dentifrice on enamel demineralization in situ. *Caries Res* 2003;37(3):194-9.

Cury JA, Tenuta LM, Ribeiro CC, Paes Leme AF. The importance of fluoride dentifrices to the current dental caries prevalence in Brazil. *Braz Dent J* 2004;15(3):167-74.

Cury JA, Tenuta LM. How to maintain a cariostatic fluoride concentration in the oral environment. *Adv Dent Res.* 2008;120(1):13-6.

Cury JA, Tenuta LMA, Tabchoury CPM. *Bioquímica oral*. São Paulo: Artes Médicas, 2017. (Série Abeno: Odontologia Essencial - Parte Básica).

Dibdin GH, Shellis RP. Physical and biochemical studies of *Streptococcus mutans* sediments suggest new factors linking the cariogenicity of plaque with its extracellular polysaccharide content. *J Dent Res*. 1988; 67(6): 890-5.

Featherstone JD. The science and practice of caries prevention. *J Am Dent Assoc.*, v. 131, p. 887–899, 2000.

Fejerskov O, Manji F. Risk assessment in dentistry. Chapel Hill. University of North Carolina Dental Ecology, 1990. P. 215-17.

Fejerskov O, Nyvad B. Is dental caries an infectious disease? Diagnostic and treatment consequences for the practitioner. In: Schou L, editor. *Nordic Dentistry 2003 Yearbook*. Copenhagen: Quintessence Publishing; 2003. p. 141-52.

Fejerskov O. Changing paradigms in concepts on dental caries: consequences for oral health care. *Caries Res*. 2004 May-Jun;38(3):182-91.

Fejerskov O, Nyvad B, Kidd EAM. Pathology of dental caries. In: Fejerskov O, Kidd E, Nyvad B, Baelum V, editors. *Dental caries: the disease and its clinical management*. 2nd ed. Oxford: Blackwell Munksgaard; 2008.

Firestone AR, Schmid R, Muhlemann HR. Cariogenic effects of cooked wheat starch alone or with sucrose and frequency-controlled feedings in rats. *Arch Oral Biol*. 1982; 27, 759 – 763.

Furlani TA, Magalhães AC, Iano FG, Cardoso VES, Delbem ACB, Buzalaf MAR. Effect of Calcium Pre-rinse and Fluoride Dentifrice on Enamel and on Dental Plaque Formed In Situ. *Oral Health Prev Dent.*, v. 7, p. 23–28, 2009.

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*. 2011; 80:1834-1839.

Koo H, Falsetta ML, Klein MI. The exopolysaccharide matrix: a virulence determinant of cariogenic biofilm. *J Dent Res*. 2013 Dec;92(12):1065-73.

Larsen MJ. Chemical events during tooth dissolution. *J Dent Res*. 1990; 69(Spec Iss):575-580.

Lingstrom P, van Houte J, Kashket S. Food starches and dental caries. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2000; 11, 366 – 380.

Loesche WJ. Chemotherapy of dental plaque infections. *Oral Sci Rev*. 1976; 9:65-107.

Magalhães AC, Furlani TA, Italiani FM, Iano FG, Delbem ACB, Buzalaf MAR. Effect of calcium pre-rinse and fluoride dentifrice on remineralisation of artificially demineralised enamel and on the composition of the dental biofilm formed in situ. *Arch Oral Biol*, v. 52, p. 1155-1160, 2007.

Maltz M, Tenuta LMA, Groisman S, Cury JA. Cariologia: conceitos básicos, diagnósticos e tratamento não restaurador. São Paulo: Artes Médicas, 2016. (Série Abeno: Odontologia Essencial - Parte Clínica).

Margolis HC, Moreno EC. Composition of pooled plaque fluid from caries-free and caries-positive individuals following sucrose exposure. *J Dent Res*. 1992;71:1776-1784.

Marsh PD. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res*. 1994; 8:263-271.

Marsh PD, Moter A, Devine DA. Dental plaque biofilms: communities, conflict and control. *Periodontol* 2000. 2011 Feb;55(1):16-35.

Murray, J. J. Comments on the Conference (Second International Conference on Declining Caries). *International Dental Journal*. 1994;44(Sup. 1): 457-458.

Narvai PC, Castellanos RA, Frazão P. Prevalência de cárie em dentes permanentes de escolares do Município de São Paulo, SP, 1970 – 1996. *Rev Saúde Pública* 2000; 34:196-200.

Newbrun E. Sucrose, the arch criminal of dental caries. *Odontol Revy*. 1967; 18:373-386.

Ogaard B, Rølla, Helgeland K. Uptake and retention of alkali-soluble and alkali-insoluble fluoride in sound enamel in vivo after mouthrinses with 0.05% or 0.2% NaF. *Caries Res* 1983;17: 520–524.

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; 83:71-75.

Paes Leme AF, Tabchoury CP, Zero DT, Cury JA. Effect of fluoridated dentifrice and acidulated phosphate fluoride application on early artificial carious lesions. *Am J Dent*. 2003 Apr;16(2):91-5.

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; 85(10): 878-87.

Pearce E. Plaque minerals and dental caries. *NZ Dent J*. 1998; 94:12-15.

Pearce EI, Margolis HC, Kent RL Jr. Effect of in situ plaque mineral supplementation on the state of saturation of plaque fluid during sugar-induced acidogenesis. *Eur J Oral Sci* 1999;107:251-259.

Pearce EI, Sissons CH, Coleman M, Wang X, Anderson SA, Wong L. The effect of sucrose application frequency and basal nutrient conditions on the calcium and phosphate content of experimental dental plaque. *Caries Res*. 2002; 36:87-92.

Pecharki GD, Cury JA, Paes Leme AF, Tabchoury CP, Del Bel Cury AA, Rosalen PL, et al.. Effect of sucrose containing iron (II) on dental biofilm and enamel demineralization in situ. *Caries Res*. 2005; 39:123- 129.

Ribeiro CCC, Tabchoury CPM, Del Bel Cury AA, Tenuta LMA, Rosalen PL, Cury JA. Effect of starch on the cariogenic potential of sucrose. *British Journal of Nutrition*. 2005; 94: 44–50.

Rølla G, Saxegaard E. Critical evaluation of the composition and use of topical fluorides with emphasis on the role of calcium fluoride in caries inhibition. *J Dent Res* 1990;69(Spec No):780–785.

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

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

Russell RRB. Bacterial Polysaccharides in dental plaque. In: *Bacterial Polysaccharides Current Innovations and Future Trends*. M Ullrich editor. Norfolk, UK: Caister Academic Press; 2009. pp. 143-156.

Souza JGS, Tenuta LM, Del Bel Cury AA, Nóbrega DF, Budin RR, De Queiroz MX, Vogel GL, Cury JA. Calcium Pre-rinse before Fluoride Rinse Reduces Enamel Demineralization: An in situ Caries Study. *Caries Research*, 2016; 50:372-377.

ten Cate JM. Review on fluoride, with special emphasis on calcium fluoride mechanisms in caries prevention. *Eur J Oral Sci*. 1997; 105: 461–465.

Tenuta LMA, 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; 85(9): 834-838.

Theilade E. The non-specific theory in microbial etiology of inflammatory periodontal diseases. *J Clin Periodontol*. 1986. 13:905-911.

van Houte J, Russo J, Prostak KS. Increased pH-lowering ability of *Streptococcus mutans* cell masses associated with extracellular glucan-rich matrix material and the mechanisms involved. *J Dent Res*. 1989; 68(3):451-459.

van Houte J. Role of microorganisms in caries etiology. *J Dent Res*. 1994; 73(3):672-681.

Vogel GL, Carey CM, Chow LC, Tatevossian A. Micro-analysis of plaque fluid from single-site fasted plaque. *J Dent Res*. 1990; 69:1316-1323.

Vogel GL, Schumacher GE, Chow IC, Takagi S, Carey CM. Ca pre-rinse greatly increases plaque and plaque fluid F. *J Dent Res*. 2008a; v. 87, n. 5, p. 466-469.

Vogel GL, Chow IC, Carey CM. Calcium pre-rinse greatly increases overnight salivary fluoride after a 228 ppm fluoride rinse. *Caries Res*. 2008b; v. 42, n. 5, p. 401-404.

Vogel GL, Tenuta LM, Schumacher GE, Chow IC. No calcium-fluoride-like deposits detected in plaque shortly after a sodium fluoride mouthrinse. *Caries Res*. 2010;44(2):108-15.

Vogel GL. Oral Fluoride Reservoirs and the Prevention of Dental Caries. Monogr Oral Sci., v. 22, p. 146–157, 2011.

Vogel GL, Tenuta LM, Schumacher GE, Chow IC. A Calcium Prerinse Required to Form Calcium Fluoride in Plaque from a SodiumFluoride Rinse. Caries Res. 2014; v. 48, p. 174–178.

Xiao J, Klein MI, Falsetta ML, Lu B, Delahunty CM, Yates JR 3rd, et al. The exopolysaccharide matrix modulates the interaction between 3D architecture and virulence of a mixed-species oral biofilm. PLoS Pathog. 2012;8(4):e1002623.

Zero DT, van Houte J, Russo J. The intra-oral effect on enamel demineralization of extracellular matrix material synthesized from sucrose by Streptococcus mutans. J Dent Res. 1986; 65(6):918-923.

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;71(Spec Iss):871-8.

Zero DT. Adaptações na placa dental. In: Bowen WH, Lowrence AT. Cariologia para a década de 90. Ed. Santosm So Paulo – SP. 1ª edição, 1995.