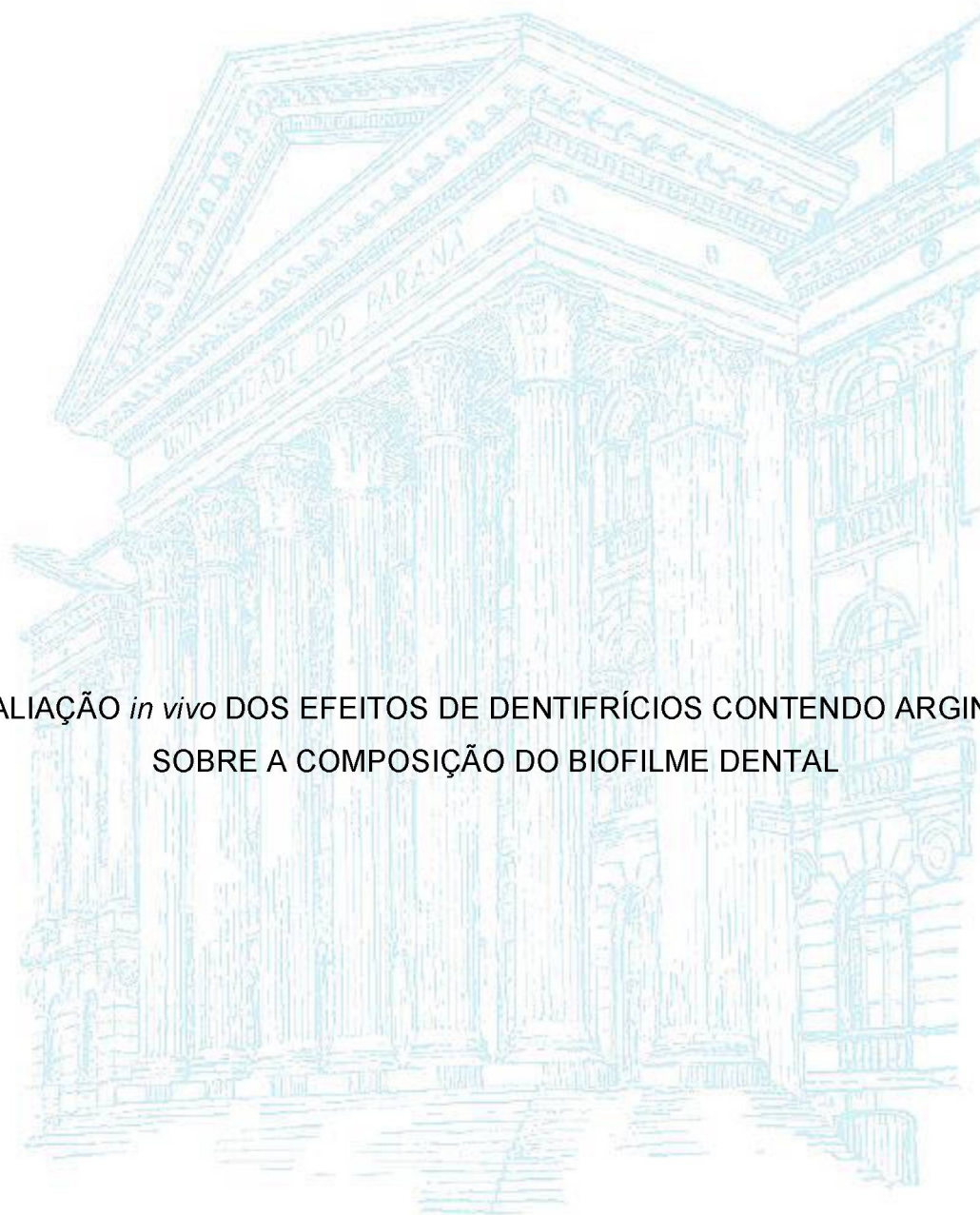


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LETÍCIA FERREIRA ZANLORENSI



AVALIAÇÃO *in vivo* DOS EFEITOS DE DENTIFRÍCIOS CONTENDO ARGININA
SOBRE A COMPOSIÇÃO DO BIOFILME DENTAL

CURITIBA

2018

LETÍCIA FERREIRA ZANLORENSI

AVALIAÇÃO *in vivo* DOS EFEITOS DE DENTIFRÍCIOS CONTENDO ARGININA
SOBRE A COMPOSIÇÃO DO BIOFILME DENTAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Bioquímica, área de concentração Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção de título de Mestre em Bioquímica.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elaine Machado Benelli

Co-orientador: Dr. Eduardo Balsanelli

CURITIBA

2018

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas. Biblioteca de Ciências Biológicas.

(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Zanlorensi, Letícia Ferreira

Avaliação *in vivo* dos efeitos de dentifrícios contendo arginina sobre a composição do biofilme dental. / Letícia Ferreira Zanlorensi. – Curitiba, 2018.

63 p.: il. ; 30cm.

Orientador: Elaine Machado Benelli

Coorientador: Eduardo Balsanelli

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

1. Arginina 2. Biofilme 3. Microbiota 4. Dentifrícios I. Título II. Benelli, Elaine Machado III. Balsanelli, Eduardo IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

CDD (22. ed.) 617.601



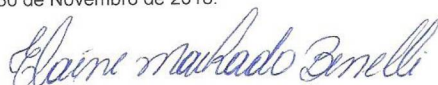
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
(BIOQUÍMICA)

TERMO DE APROVAÇÃO

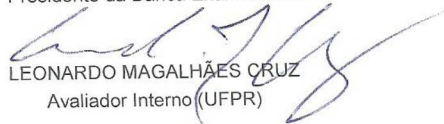
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS (BIOQUÍMICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **LETÍCIA FERREIRA ZANLORENSI**, intitulada: **AVALIAÇÃO *IN VIVO* DOS EFEITOS DE DENTIFRÍCIOS CONTENDO ARGININA SOBRE A COMPOSIÇÃO DO BIOFILME DENTAL**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de Mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 30 de Novembro de 2018.


ELAINE MACHADO BENELLI

Presidente da Banca Examinadora


LEONARDO MAGALHÃES CRUZ

Avaliador Interno (UFPR)


HELISSON FAORO

Avaliador Externo (ICC)

RESUMO

A cárie dental continua sendo um grande problema de saúde pública. A lesão de cárie é uma desmineralização do tecido dental que ocorre pela queda de pH no biofilme devido ao metabolismo bacteriano dos carboidratos fermentáveis provenientes da dieta. A introdução do fluoreto, tanto na água de abastecimento quanto em dentifrícios, reduziu a prevalência dessa doença. Entretanto, mesmo após a bem-sucedida introdução dos fluoretos, a cárie ainda é prevalente, principalmente porque o flúor não age sobre as causas, mas sim sobre os sinais da doença. Por isso, novas estratégias vêm sendo exploradas para prevenção, tratamento e avaliação do risco à cárie. Com isso, alguns dentifrícios passaram a conter 1,5% de arginina. Porém, atualmente, não há razão para recomendar dentifrício com arginina e flúor em detrimento de dentifrícios convencionais fluoretados. Além disso, a adição de arginina aos dentifrícios pode causar mudanças no ecossistema dental, tanto na composição quanto na função. O objetivo deste estudo *in vivo* é verificar o efeito dos dentifrícios contendo 1,5 % de arginina, 1450 ppm de flúor e carbonato de cálcio sobre a composição do microbioma do biofilme através do sequenciamento do *amplicon* 16S em plataforma Illumina. Três voluntárias do sexo feminino participaram desse estudo duplo-cego cruzado de 9 semanas. Todas passaram por dois períodos de tratamento de 3 semanas em que usaram dentifrício contendo 1,5% de arginina e dentifrício fluoretado. Foi observada diferença nas comunidades bacterianas encontradas durante os tratamentos nas voluntárias 1 e 2. Na voluntária 3 foram identificadas mudanças, mas, dentre as voluntárias, esta apresentou menor variabilidade. Tanto o dentifrício contendo arginina quanto o dentifrício contendo flúor foram capazes de alterar o ecossistema do biofilme em todas as voluntárias.

Palavras-chave: Arginina, Biofilme, Microbioma, Ecologia bucal

ABSTRACT

Dental caries remains the major public health problem. Caries lesion is a demineralization of the dental tissue that occurs due to the pH decrease in the biofilm due to the bacterial metabolism of the fermentable carbohydrates from diet. The introduction of fluoride, both in water supply and in dentifrices, reduced the prevalence of this disease. However, even after the successful introduction of fluoride, caries is still prevalent, mainly because the fluoride does not act in the etiology of the disease, but over the signals. Therefore, new strategies have been explored for caries prevention, treatment and evaluation. In this way, some dentifrices now contain 1.5% arginine. However, currently, there is no reason to recommend dentifrice with arginine and fluorine over conventional fluoridated dentifrices. The addition of arginine to dentifrices can bring changes in the dental ecosystem, both in composition and function. The objective of this *in vivo* study is to verify the effect of dentifrices containing 1.5% arginine, 1450 ppm fluoride and calcium carbonate on the composition of the biofilm microbiome by sequencing the 16S amplicon on the Illumina platform. Three female volunteers participated in this double-blind cross-over study of 9 weeks. All underwent two treatment periods of 3 weeks in which they used a dentifrice containing 1.5% of arginine and fluoridated dentifrice. Differences were observed in the bacterial communities found during the treatments in volunteers 1 and 2. In volunteer 3, changes were identified, but among the volunteers, this presented the less variability. Both the arginine-containing dentifrice and the fluoride-containing dentifrice were able to alter the biofilm ecosystem in all volunteers.

Key words: Arginine, Biofilm, Microbiome, Oral ecology

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – HIPÓTESE DA PLACA ECOLÓGICA.....	17
FIGURA 2 – VIAS DE GERAÇÃO DE AMÔNIA (SAD e SAgD).....	20
FIGURA 3 – DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	25
FIGURA 4 – DISTRIBUIÇÃO DOS GÊNEROS BACTERIANOS MAIS ABUNDANTES NA VOLUNTÁRIA 1.....	29
FIGURA 5 - DISTRIBUIÇÃO DOS GÊNEROS BACTERIANOS MAIS ABUNDANTES NA VOLUNTÁRIA 2.....	30
FIGURA 6 - DISTRIBUIÇÃO DOS GÊNEROS BACTERIANOS MAIS ABUNDANTES NA VOLUNTÁRIA 3.....	30
FIGURA 7 – ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA) DOS GÊNEROS DAS COMUNIDADES BACTERIANAS.....	31
FIGURA 8 – RIQUEZA DAS COMUNIDADES BACTERIANAS DETERMINADA PELO ÍNDICE $chao1$	32
FIGURA 9 – RIQUEZA DAS COMUNIDADES BACTERIANAS DETERMINADA PELO NÚMERO DE OTUs OBSERVADOS EM CADA COLETA.....	32
FIGURA 10 – GÊNEROS SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTES NA SUA ABUNDÂNCIA ENTRE A TERCEIRA E QUINTA COLETAS NA VOLUNTÁRIA 1.....	33
FIGURA 11 – GÊNEROS SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTES NA SUA ABUNDÂNCIA ENTRE A SEGUNDA E TERCEIRA	

COLETAS NA VOLUNTÁRIA 1.....	34
FIGURA 12 – GÊNEROS SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTES NA SUA ABUNDÂNCIA ENTRE A QUARTA E QUINTA COLETAS NA VOLUNTÁRIA 1.....	35
FIGURA 13 – ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA) DOS GÊNEROS DAS COMUNIDADES BACTERIANAS.....	36
FIGURA 14 – GÊNEROS SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTES NA SUA ABUNDÂNCIA ENTRE A TERCEIRA E QUINTA COLETAS NA VOLUNTÁRIA 2.....	37
FIGURA 15 – GÊNEROS SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTES NA SUA ABUNDÂNCIA ENTRE A SEGUNDA E A TERCEIRA COLETAS NA VOLUNTÁRIA 2.....	38
FIGURA 16 – GÊNEROS SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTES NA SUA ABUNDÂNCIA ENTRE A QUARTA E QUINTA COLETAS NA VOLUNTÁRIA 2.....	39
FIGURA 17 – ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA) DOS GÊNEROS DAS COMUNIDADES BACTERIANAS.....	40
FIGURA 18 - GÊNEROS SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTES NA SUA ABUNDÂNCIA ENTRE A TERCEIRA E QUINTA COLETAS NA VOLUNTÁRIA 3.....	41
FIGURA 19 - GÊNEROS SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTES NA SUA ABUNDÂNCIA ENTRE A SEGUNDA E TERCEIRA COLETAS NA VOLUNTÁRIA 3.....	42

FIGURA 20 - GÊNEROS SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTES

NA SUA ABUNDÂNCIA ENTRE A QUARTA E

QUINTA COLETAS NA VOLUNTÁRIA 3.....43

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - GÊNEROS BACTERIANOS ENCONTRADOS

ANTES E DEPOIS DOS TRATAMENTOS.....43

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	13
1. OBJETIVO GERAL.....	15
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 CÁRIE DENTAL	16
2.1.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO DENTE.....	16
2.1.2 HIPÓTESE DA PLACA ECOLÓGICA.....	16
2.2 GERAÇÃO DE ALCALIS.....	18
2.3 ARGININA.....	19
2.4 DENTIFRÍCIOS COM ARGININA	21
3. MICROBIOMA BUCAL	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
4.1 DELINEAMENTO GERAL DO ESTUDO.....	24
4.2 ASPECTOS ÉTICOS.....	25
4.3 SELEÇÃO DOS PARTICIPANTES	25
4.4 DENTIFRÍCIOS	26
4.5 COLETA DE BIOFILME	26
4.6 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA.....	27
4.6.1 EXTRAÇÃO DE DNA.....	27
4.6.2 PREPARAÇÃO DA BIBLIOTECA DE AMPLICON.....	27
4.6.3 SEQUENCIAMENTO	28
4.6.4 ANÁLISES.....	28
5. RESULTADOS	29
6. DISCUSSÃO.....	45
7. CONCLUSÃO.....	48

REFERÊNCIAS.....	49
APÊNDICE 1 - ORIENTAÇÕES AO VOLUNTÁRIO	54
APÊNDICE 2 - FICHA DE ANAMNESE	55
APÊNDICE 3 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	57
ANEXO 1 – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP.....	60

INTRODUÇÃO

Apesar da prevalência de cárie dental ter reduzido significativamente em muitos países, a doença continua sendo um grande problema de saúde pública (FONTANA, 2016). Anteriormente era considerada uma doença de crianças e adolescentes, entretanto, como os adultos têm mantido seus dentes por mais tempo, a doença também os atinge (SANTARPIA *et al.*, 2014). Além disso, com o envelhecimento da população, a cárie radicular poder se tornar um desafio para o controle da doença no futuro (ALVES; MOURA; GROISMAN; MALTZ, 2016). De acordo com a OMS, a saúde bucal é um importante indicador de saúde geral, visto que uma saúde bucal precária pode levar a sérios problemas de saúde como diabetes, derrame e problemas cardiovasculares, entre outros (GUPTA, 2017).

A lesão de cárie é uma desmineralização do tecido dental que ocorre pela queda de pH do biofilme devido ao metabolismo bacteriano dos carboidratos fermentáveis provenientes da dieta. A acidificação contínua dos biofilmes dentais resulta em aumento na proporção de microrganismos acidúricos e acidogênicos, um processo que altera a homeostase do pH e muda o equilíbrio do processo desmineralização/remineralização (des/re) em direção à perda de minerais (NASCIMENTO; BURNE, 2014).

O uso dos dentifrícios contendo fluoreto é considerado responsável pela diminuição da incidência de cárie em países em desenvolvimento nos anos 90 (BOTELHO *et al.*, 2014). No Brasil, uma redução na prevalência da cárie a partir da década de 70 foi observada juntamente com a adição de flúor na água de abastecimento, e a partir da década de 90, com a adição de flúor em dentifrícios (ALVES; MOURA; GROISMAN; MALTZ, 2016).

Similar à hidroxiapatita, a fluorapatita tem os íons hidroxila substituídos por flúor. O íon flúor é menor e mais eletronegativo que a hidroxila, o que leva a um melhor arranjo dos íons e, conseqüentemente, menor solubilidade da fluorapatita em comparação com a hidroxiapatita. O íon flúor, quando disponível na cavidade bucal, exerce efeito sobre o processo des/re no sentido de diminuir a progressão da lesão de

cárie, pois o fluoreto é ativador da precipitação de minerais sobre o dente (TENUTA; CURY, 2016, b).

Entretanto, a cárie dental permanece prevalente, mesmo após a bem-sucedida introdução dos fluoretos (SOUZA *et al.*, 2013). Isso porque ele não é capaz de agir nos fatores etiológicos da doença, mas sim sobre os sinais clínicos (HENZ; JARDIM, 2016; ALVEZ; PAROLO; MALTZ, 2016; TENUTA; CURY, 2016). O fluoreto tem ação limitada em proteger o dente contra a cárie (SANTARPIA *et al.*, 2014).

Como a cárie dental continua sendo o maior problema de saúde bucal, novas estratégias vêm sendo exploradas para prevenção, tratamento e avaliação do risco à cárie (NASCIMENTO *et al.*, 2009). Com isso, alguns dentifrícios passaram a conter 1,5% de arginina, um composto de cálcio insolúvel e 1450 ppm de flúor (CUMMINS 2013; SOUZA *et al.*, 2013; SRISILAPANAN *et al.*, 2013; YIN *et al.*, 2013; KRAIVAPHAN *et al.*, 2013; SANTARPIA *et al.*, 2014, WOLFF *et al.*, 2013, CANTORE, *et al.*, 2013).

Uma revisão sistemática analisando os estudos realizados usando esse tipo de produto mostrou que a maioria dos estudos apresentam moderado risco à erros, deficiência nos protocolos de estudo, conflito de interesses, entre outros (ASTVALDSDÓTTIR *et al.*, 2016). Para os autores, não há evidência disponível de que a adição de arginina a produtos dentais contendo flúor tenha algum efeito na prevenção de cárie em adultos e crianças, além de que todos os estudos incluídos foram originados ou financiados pela companhia que fabrica o produto teste. Eles sugerem que mais estudos independentes de interesses financeiros sejam necessários. Assim, atualmente, não há razão para recomendar dentifrício com arginina e flúor em detrimento de dentifrícios convencionais fluoretados. Segundo Jardim, Alves e Maltz (2016), estudos independentes e bem delineados são necessários para poder determinar o efeito anti-cárie dos produtos contendo arginina. Ainda, a utilização antiética e desnecessária de placebo, o fato dos estudos não terem sido propriamente cegos, a randomização ser questionável, a falta de protocolos publicados anteriormente aos estudos e os conflitos de interesses que, de acordo com Shaw, Naim-Akbar e Astvaldsdóttir (2015), não foram devidamente publicados em todos os artigos, faz com que os estudos envolvendo o dentifrício em questão sejam questionáveis.

Além disso, a adição de arginina aos dentifrícios traz mudanças no ecossistema dental, tanto na composição quanto na função, comportando-se como um prebiótico (KOOPMAN *et al.*, 2017). Prebióticos são compostos que têm efeito positivo na saúde humana através de uma estimulação de crescimento seletiva de microrganismos (MUGAMBI; YOUNG; BLAAUW, 2014). Como a microbiota bucal, em situação de saúde, está em equilíbrio dinâmico com o hospedeiro, mudanças que influenciem o crescimento microbiano podem perturbar o equilíbrio e favorecer uma microbiota comensal ou patogênica. Mudanças nas condições bucais podem desfazer a relação simbiótica normal entre o hospedeiro e os microrganismos, aumentando o risco a doenças (MARSH; DEVINE, 2011).

1. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo *in vivo* é verificar o efeito dos dentifrícios contendo 1,5 % de arginina, 1450 ppm de flúor e carbonato de cálcio sobre a composição do microbioma do biofilme através da variação microbiana a partir do sequenciamento do amplicon 16S em plataforma Illumina.

2. REVISÃO DE LITERATURA

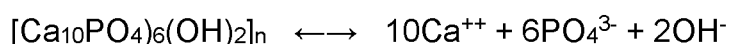
2.1 CÁRIE DENTAL

2.1.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO DENTE

Os tecidos duros pertencentes ao dente são o esmalte, dentina e cemento, compostos majoritariamente por cristais de hidroxiapatita. O esmalte é composto por 95% de minerais, sendo a restante matriz proteica depositada durante a formação, além de água. Já a dentina e cemento apresentam uma rede de fibras de colágeno tipo I em torno dos cristais de hidroxiapatita, modificando as propriedades desses tecidos (TENUTA; CURY, 2016, b).

A hidroxiapatita é composta por cálcio, fosfato e hidroxila que formam cristais hexagonais. O cristal de hidroxiapatita é composto por unidades de $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$.

A reação de equilíbrio entre a hidroxiapatita e o meio bucal é dada pela equação:



A principal alteração que afeta o equilíbrio entre mineral e fluidos bucais é a redução do pH (TENUTA; CURY, 2016, b). A queda do pH faz com que os íons PO_4^{3-} e OH^- combinem-se com o H^+ formando, removendo esses íons da solução. Assim, o meio fica subsaturado em relação a hidroxiapatita levando a dissolução desse sal.

2.1.2 HIPÓTESE DA PLACA ECOLÓGICA

Os receptores específicos da superfície dos microrganismos interagem diretamente com a película dental adquirida (camada de proteínas adsorvida na superfície dental), iniciando a formação do biofilme. Os primeiros microrganismos que

se ligam na película são chamados de pioneiros, que rapidamente dão lugar a uma comunidade mais complexa oriunda da interação de outros microrganismos aos pioneiros (OVERMAN, 2000).

A composição do biofilme dental sofre grande influência do ambiente no qual é formado. A dieta desempenha um papel fundamental na formação do biofilme relacionado à cárie, visto que na presença de açúcares fermentáveis, especialmente a sacarose, as bactérias irão metabolizá-los para obter energia. Conseqüentemente, a produção de ácidos levará a queda de pH, acarretando na desmineralização. O biofilme exposto constantemente a açúcares fermentáveis resultará em uma seleção bacteriana favorecendo os microrganismos mais adaptados a esse ambiente (MARSH, 1994). A dinâmica da mudança microbiológica do biofilme devido a alteração de pH pode ser observada na figura 1. Assim, o estilo de vida do hospedeiro influencia diretamente o desenvolvimento, composição e atividade metabólica da microbiota bucal residente (MARSH; DEVINE, 2011).

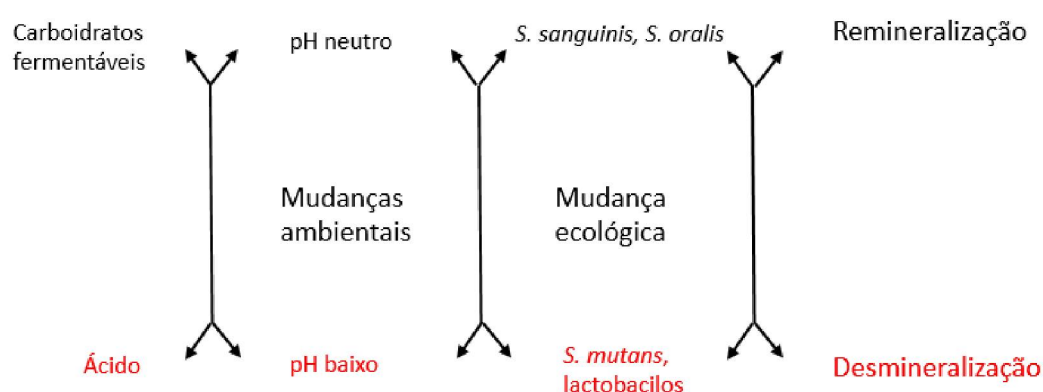


Figura 1: Hipótese da placa ecológica

Fonte: MARSH, 1991.

A sacarose, um carboidrato fermentável, é o único substrato para a produção de polissacarídeo extracelular, tanto de reserva como estruturais, modificando a estrutura no biofilme. Além disso, o biofilme formado na presença de sacarose tem concentrações mais baixas dos íons Ca, P e F, fundamentais para o processo des/re do esmalte e dentina (PAES LEME *et al.* 2006).

2.2 GERAÇÃO DE ALCALIS

Os dois maiores substratos para formação de álcalis pelo biofilme oral são ureia e arginina (BURNE; MARQUIS, 2000; LIU *et al.*, 2012; BELTRAN *et al.*, 2012). A ureia está presente na secreção das glândulas salivares e no exsudato gengival em concentrações que variam de 3-10 mM. A ureia é rapidamente hidrolisada a amônia e CO₂ pela urease bacteriana, encontrada em bactérias orais como *Streptococcus salivarius*, *Actinomyces naeslundii* e *Haemophilis orais* (BURNE; MARQUIS, 2000; LIU; NASCIMENTO; BURNE, 2012). A arginina na forma livre é secretada em concentrações médias de aproximadamente 50 µM, sendo também abundante nas proteínas e peptídeos salivares (VANWUYCKHUYSE *et al.*, 1995). Primeiramente, a arginina é catabolizada a ornitina, amônia e CO₂ por *Streptococcus* orais como *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus parasanguis*, *Streptococcus rattus* e *Streptococcus sanguis*, alguns lactobacilos e espiroquetas (BURNE; MARQUIS, 2000). Assim, a amônia produzida tanto pela ureia quanto pela arginina pode ser um importante fator inibitório para a microbiota potencialmente cariogênica e desenvolvimento da cárie, pois neutraliza os ácidos e estabiliza a microbiota oral compatível com saúde (NASCIMENTO *et al.*, 2009; BURNE; MARQUIS, 2000; DAWES; DIBDIN, 2001).

Em indivíduos sem cárie foi observada uma maior produção de amônia pela urease e arginina desaminase tanto na saliva quanto no biofilme, quando comparados a indivíduos com cárie, ou seja, nível elevado de produção de álcalis foi relacionado a indivíduos cárie-free (REYES *et al.*, 2014). Também, foi reportado maior produção de amônia a partir da arginina tanto no biofilme quanto na saliva de indivíduos sem cárie. Além disso, os níveis de urease no biofilme de indivíduos sem cárie foram 3 vezes maiores que nos indivíduos com cárie (GORDAN *et al.*, 2010). Nascimento *et al.* (2009) encontraram uma relação positiva entre altos níveis de produção de álcalis e resistência a cárie, visto que uma atividade maior de urease e arginina desaminase foi observada em indivíduos sem cárie, comparado com indivíduos cárie-ativo, sugerindo que o aumento do risco a cárie está associado a diminuição da capacidade de geração de álcalis pelas bactérias orais.

2.3 ARGININA

A arginina é um aminoácido não essencial encontrado em muitos alimentos, incluindo leite e seus derivados, carne, aves, frutos do mar, cereais e nozes (SOUZA *et al.*, 2013). Diferentemente da ureia, que sofre hidrólise pela urease produzindo amônia e CO₂, o catabolismo da arginina pela SAD gera ATP (BURNE; MARQUIS, 2000). O metabolismo da arginina tem demonstrado aumentar significativamente o pH do biofilme, *in vitro* e *in vivo*, mesmo na presença de carboidratos (NASCIMENTO; BURNE, 2014), então, a arginina poderia manter o biofilme saudável mesmo após desafio cariogênico, prevenindo mudança da flora do biofilme para predominância de acidogênicos, como *Streptococcus mutans* (SOUZA *et al.*, 2013).

A maioria das espécies de bactérias bucais SAD positivas consiste de streptococci orais: *S. sanguinis*, *S. gordonii*, *S. rattus*, *S. parasanguinis*, *S. mitis*, *S. oralis* e *S. cristatus* (NASCIMENTO; BURNE 2014), porém uma relação negativa entre os níveis de *S. mutans* e arginina desaminase foi observada (GORDAN *et al.*, 2010). O *S. mutans* consegue crescer e continuar ativo em ambiente de baixo pH, mas pode perder essa capacidade quando colocado no mesmo ambiente que microrganismos associados à saúde (CHEN; WEAVER; BURNE, 2000). Além disso, *Actinomyces*, *Bacillus* e *Neisseria* também estão associados ao metabolismo de arginina (NASCIMENTO; BURNE, 2014).

Os genes que codificam as enzimas presentes no SAD estão organizados em *operon*. A primeira enzima, codificada pelo gene *arcA*, chamada de arginina desaminase, hidrolisa a arginina a citrulina e amônia; a ornitina carbamoiltransferase, codificada pelo gene *arcB*, catabolisa a citrulina a ornitina e carbamoilfosfato; a carbamato quinase, codificada pelo gene *arcC*, é a enzima responsável pela transferência do grupamento fosfato da carbamoilfosfato para a ADP, gerando ATP, CO₂ e amônia (LIU; NASCIMENTO; BURNE, 2012).

O catabolismo de agmatina, produto da reação entre arginina e a enzima arginina descarboxilase, também tem efeito sobre a ecologia do biofilme oral, porém não como o metabolismo de arginina e ureia (GRISWOLD; CHEN; BURNE, 2004). A

agmatina é utilizada pelo Sistema Agmatina Desaminase (SAGD), similar a SAD, para produção de putrecina, amônia, CO_2 e ATP. Várias bactérias apresentam SAGD, como *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus downei*, *Streptococcus rattus*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus mitis* e *Streptococcus cricetus*, além de *Lactobacillus salivarius* e *Lactobacillus brevis*. Algumas dessas bactérias são associadas a cárie e expressam SAGD em altos níveis, porém apenas *S. sanguinis* e *S. salivarius*, bactérias associadas a saúde, podem gerar amônia pelo SAGD, além do SAD ou urease (GRISWOLD; NASCIMENTO; BURNE, 2009). Assim, o SAGD pode não ter uma função tão importante na fisiologia dessas bactérias comensais quanto tem para os *Streptococcus* cariogênicos. Além disso, SAGD não produz quantidade suficiente de amônia para modificar o pH do biofilme como SAD e urease produzem e pode aumentar a tolerância ácida de bactérias cariogênicas, tanto pela geração de ATP quanto pelo aumento do pH citoplasmático, fato que pode melhorar a capacidade dessas bactérias em metabolizar carboidratos em pH baixo (GRISWOLD; CHEN; BURNE, 2004). Ademais, o SAGD parece não ser tão amplamente distribuído nos microrganismos como o SAD (LIU; NASCIMENTO; BURNE, 2012). A figura 2 ilustra as vias de produção de amônia no biofilme.

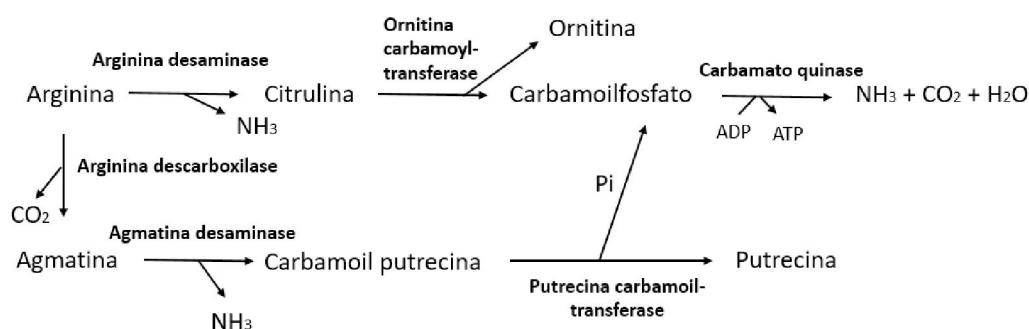


Figura 2: Vias de geração de amônia (SAD e SAGD) Fonte: adaptado de Liu; Nascimento; Burne, 2012.

2.4 DENTIFRÍCIOS COM ARGININA

Existem dois tipos de formulações de dentifrícios contendo arginina: 8% de arginina associada a carbonato de cálcio e 1,5% de arginina, um composto de cálcio insolúvel e 1450 ppm de flúor. A finalidade do dentifrício contendo 8% de arginina é tratar a hipersensibilidade dentinária, tendo sido verificado que seu benefício é um alívio rápido e duradouro, visto que a associação de arginina e carbonato de cálcio aceleram os mecanismos naturais de oclusão dos túbulos dentinários pela deposição de um mineral semelhante à dentina, contendo cálcio e fosfato, dentro dos túbulos e sobre superfície da dentina (PETROU *et al.*, 2009). Já o dentifrício contendo 1,5% de arginina vem sendo usado por agir no biofilme, prevenindo a iniciação e progressão de cárie pela redução dos fatores patológicos (CUMMINS, 2010). Porém, a ação dos dentifrícios contendo 8% de arginina sobre o biofilme também vem sendo investigada (KOOPMAN *et al.*, 2017; ZHENG *et al.*, 2017; XUE *et al.* 2017; YAMASHITA *et al.*, 2013).

A adição de arginina a dentifrícios sem flúor apresentou ação anti-cárie comparável ao dentifrício contendo 1100 ppm de flúor, pois, como sua ação é no biofilme, diminui os fatores patogênicos e previne a iniciação e progressão da lesão cáriesa. Além disso, a ação da arginina e do flúor são complementares, o que promoveria uma prevenção superior do aparecimento de cárie (CUMMINS, 2010). Com isso, alguns dentifrícios passaram a conter 1,5% de arginina, um composto de cálcio insolúvel e 1450 ppm de flúor (CUMMINS 2013; SOUZA *et al.*, 2013; SRISILAPANAN *et al.*, 2013; YIN *et al.*, 2013; KRAIVAPHAN *et al.*, 2013; WOLFF *et al.*, 2013, CANTORE, *et al.*, 2013; SANTARPIA *et al.*, 2014). Kraivaphan *et al.* (2013), mostraram que esse dentifrício é significativamente superior na prevenção de cavitação de lesão de cárie do que dentifrício contendo apenas 1450 ppm de flúor. Essa mesma formulação foi testada por Yin *et al.* (2013) e Souza *et al.* (2013), que observaram um efeito superior deste dentifrício na interrupção e reversão de lesões de cárie vestibular e radicular ativas em adultos, respectivamente. Segundo Santarpia *et al.* (2014), esse novo dentifrício é o primeiro a agir diretamente no biofilme reduzindo os efeitos prejudiciais

dos ácidos sobre os minerais dentais. Como a arginina é encontrada em muitos alimentos, é considerada segura para o uso em dentifrício (SOUZA *et al.*, 2013).

A efetividade do metabolismo da arginina na regulação do pH parece depender da disponibilidade da arginina para agir tanto como indutor quanto como substrato para SAD. Então, o efeito anti-cárie esperado oferecido pelos dentifrícios contendo arginina, em grande parte, ocorre pela habilidade da arginina em servir como indutor da SAD e substrato para produção de amônia pelo biofilme dental (NASCIMENTO; BURNE, 2014).

3. MICROBIOMA BUCAL

Os nichos disponíveis na cavidade bucal variam em disponibilidade de oxigênio, de nutrientes, características anatômicas, variação de temperatura e exposição ao sistema imunológico, afetando a composição da microbiota (ZAURA *et al.*, 2009). O gênero *Streptococcus*, por exemplo, é bastante encontrado em tecidos moles, língua e saliva. Já *Actinomyces* são encontrados a nível sub, supragengival e nas fissuras da língua. *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gengivalis* e *Tanarella forsythia* podem ser encontrados internamente às células epiteliais (SAMPAIO; MONTEIRO, 2014). Ainda, ocorrem modificações nos nichos, como a substituição da dentição decídua pela permanente, impactando na composição bacteriana, ou seja, as diferentes fases da vida têm papel fundamental em estabelecer a composição microbiana. O microbioma bucal varia de acordo com a idade e com os nichos (XU, *et al.*, 2014).

De todos os tecidos bucais, a superfície dental é a única que não descama. Isso facilita a formação da película dental adquirida. Holgerson *et al.* (2015) encontraram os gêneros *Campylobacter*, *Streptococcus* (especialmente *S. sanguinis*), *Granulicatella*, *Kingella* e *Leptotrichia* em superfícies dentárias livres de cárie em pré-escolares e escolares. Heller *et al.* (2016) identificaram, em indivíduos saudáveis, o gênero

Streptococcus e as espécies *Haemophilus parainfluenza*, *Gemella haemolysans*, *Slackia exigua* e *Rothia* como sendo pioneiros na formação do biofilme dental.

Outros gêneros e espécies bacterianas encontradas em diferentes nichos dentro da cavidade bucal são *Haemophilus*, *Corynebacterium*, *Neisseria*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus viridans*, *Veillonelas*, *Prevotella*, *Actinobacteria*, encontrados na mucosa. No sulco gengival há alta prevalência de *Acinetobacter*, *Haemophilus*, *Streptococcus*, *Granulicatella*, *Gemella*. Na língua, *Streptococcus*, *Veillonella*, *Actinomyces*, *Lactobacillus*, *Neisseria*, *Fusobacterium* e *Haemophilus*. Em materiais restauradores também ocorre colonização microbiana, menos complexa que a encontrada em dentes naturais, o que significa que a presença de dentes é um fator importante na composição da microbiota (QUINTANA, *et al.*, 2017).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 DELINEAMENTO GERAL DO ESTUDO

Esse foi um estudo duplo-cego cruzado que ocorreu em 9 semanas. Antes de começar a primeira semana, o biofilme dental dos voluntários foi coletado. Na primeira semana os voluntários foram orientados a utilizar um dentífrico não-fluoretado, 3 vezes ao dia, a fim de eliminar qualquer vestígio de princípio ativo proveniente dos produtos de higiene oral que estava sendo usado (*washout*). Todos os voluntários residiam em Curitiba, que contém água fluoretada, então a falta de fluoreto no dentífrico não caracteriza risco ao voluntário.

Após a primeira semana, as coletas de biofilme dental foram realizadas. Na sequência, iniciou o primeiro período de tratamento, composto por 3 semanas. Nesse período, o voluntário utilizou um dos dentífricos: 1,5% de arginina + 1450 ppm de fluoreto ou 1450 ppm de fluoreto, 3 vezes ao dia, escolhido de forma aleatória. Ao final desse período, uma nova coleta de biofilme dental foi realizada.

Um período de lavagem (*washout*) de uma semana foi realizado entre as duas fases de tratamento, em que o voluntário utilizou novamente o dentífrico não-fluoretado, a fim de que o princípio ativo da primeira fase não interferisse na segunda fase. Uma nova coleta de biofilme dental foi realizada antes do início da segunda fase de teste. Em seguida, teve início o último período de teste no qual o voluntário usou o outro dentífrico por 3 semanas. Se na primeira fase foi usado o dentífrico fluoretado, nessa foi usado o dentífrico com 1,5% de arginina + 1450 ppm de fluoreto, e vice-versa. No final, o voluntário utilizou o dentífrico sem flúor por uma semana (*washout*) e, finalmente, a última coleta de biofilme dental foi realizada. O fluxograma do delineamento experimental pode ser visto na figura 3.

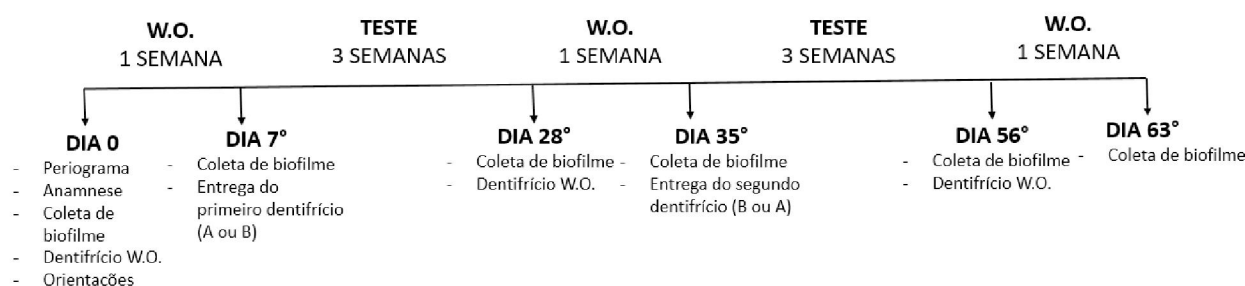


Figura 3: Delineamento experimental

4.2 ASPECTOS ÉTICOS

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP/SD) da Universidade Federal do Paraná com o parecer número 2.534.403 (Anexo 1) em 09/03/2018.

4.3 SELEÇÃO DOS PARTICIPANTES

Um e-mail informativo foi enviado para os alunos da pós-graduação do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR. A metodologia e os objetivos da pesquisa foram explicados para os alunos interessados em participar do projeto. Após concordar em participar da pesquisa, o voluntário assinou o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice 3) e todas as orientações práticas foram explicadas individualmente (Apêndice 1).

A seleção dos voluntários seguiu os seguintes critérios de inclusão: acima de 18 anos, boa saúde oral e sistêmica, compreender e assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, e de exclusão: fumantes, presença de qualquer doença sistêmica que possa alterar a produção e composição da saliva, tratamento com antibiótico, esteroide ou qualquer medicação conhecida por causar hipossalivação nos últimos 3

meses, presença de prótese ou aparelho ortodôntico e presença de gengivite ou periodontite (ZHENG *et al.*, 2017).

A avaliação da saúde bucal dos participantes foi realizada através de anamnese seguida de periograma, a fim de excluir os participantes que apresentassem profundidade de sondagem maior que 3 mm.

4.4 DENTIFRÍCIOS

Os dentifrícios foram manipulados pela farmácia de manipulação Phyto Fórmula, Curitiba/PR, nas seguintes formulações: dentifrícios de 50g contendo 1,5% de arginina e 1450 ppm de flúor, dentifrícios de 50g contendo 1450 ppm de flúor e dentifrícios de 50g contendo apenas a pasta base. A pasta base continha carbonato de cálcio, glicerina, lauril sulfato de sódio, mentol, sorbitol, gel natrosol e o flúor utilizado foi na forma de monofluorofosfato de sódio (Cosmoquímica Indústria e Comércio EIRELI, São Paulo/SP, código FISPQ-179), como no dentifrício referência (Colgate neutraçúcar). A quantidade de flúor disponível nos dentifrícios foi determinada.

4.5 COLETA DE BIOFILME

As amostras de biofilme foram coletadas pela manhã e os voluntários foram instruídos a não ingerir alimentos e não escovar os dentes antes da coleta (KOOPMAN *et al.* 2017).

O biofilme da face vestibular dos primeiros molares superiores foi coletado com curetas mini Gracey esterilizadas e imediatamente transferido para tubo de microcentrífuga de 1,5 mL contendo tampão GET (50 mmol/L de glucose, 10 mmol/L de EDTA, 25 mmol/L de Tris HCl pH 8,0). O biofilme foi ressuspenso e mantido a 4°C. As amostras foram homogeneizadas e armazenadas a – 20°C.

4.6 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

4.6.1 EXTRAÇÃO DE DNA

O biofilme coletado foi ressuspenso em tampão GET (500 μ L) e a lise enzimática das células iniciada pela adição de 25 μ g/mL de Lisozima, seguida de incubação por 30 minutos a 30 °C. Posteriormente, SDS 1% e 40 μ g/mL de Proteinase K foram adicionados ao tubo e incubado por 60 minutos a 60°C. O DNA foi extraído pela adição de 250 μ L da solução de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e centrifugação por 5 minutos a 12000g. A fase aquosa foi transferida para outro tubo contendo 0,7 volumes de isopropanol e o material foi centrifugado por 30 minutos a 12000g. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado duas vezes com etanol 80% (1 mL). O DNA das amostras foi seco a vácuo por 10 minutos e em seguida, ressuspenso em 15 μ L de água MilliQ. A quantidade de DNA isolada foi determinada por leitura de absorbância a 260 nm no Nanodrop2000 (Thermo).

4.6.2 PREPARAÇÃO DA BIBLIOTECA DE AMPLICON

A amplificação da região hipervariável V4 do gene ribossomal 16S rRNA foi feita utilizando-se 20 ng de DNA purificado, os primers universais 515F e 806R (CAPORASO *et al.*, 2012), KlenTaq MM (Sigma), e as seguintes condições de PCR: 94°C por 3 min; 18 ciclos de 94°C por 45 seg, 50°C por 30 seg e 68°C por 60 seg; seguido de 72°C por 10 min. A amplificação foi verificada por eletroforese em agarose (1,5%, TBE 1X), e quantificação do *amplicon* com Qubit (Invitrogen). Os *pools* de *amplicons* foram quantificados para sequenciamento por qPCR com kit de quantificação Kapa NGS ou com Qubit (Invitrogen).

4.6.3 SEQUENCIAMENTO

O sequenciamento das bibliotecas de *amplicon* foi realizado utilizando em plataforma Illumina MiSeq o kit MiSeq Reagent 500V2, de acordo com as especificações do fabricante, gerando leituras *pairend* de 2x de 250pb.

4.6.4 ANÁLISES

As leituras obtidas no sequenciador foram analisadas na plataforma QIIME 1.9 (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) (CAPORASO *et al.*, 2010; CAPORASO *et al.*, 2011), seguindo um fluxo de trabalho desde a remoção de sequências de baixa qualidade, remoção de quimeras e classificação taxonômica. As sequências foram classificadas em gêneros bacterianos através do reconhecimento de unidades taxonômicas operacionais (OTUs), com identidade entre as sequências >97% quando comparadas contra uma base de dados (*método uclust*). Para comparar as sequências foi utilizada a atualização (SILVA 128) do ano 2017 do banco de dados de sequências ribossomais SILVA database (Yilmaz *et al.*, 2013). As amostras foram normalizadas em 7.410 leituras por amostra.

Foram utilizados os resultados de sequenciamento de uma amostra para cada ponto coletado. Devido a isso, o método empregado para comparação estatística de amostras foi o teste de qui quadrado. Posteriormente, a tabela de formato Biom de gêneros bacterianos obtida no QIIME foi convertida ao formato spf e transferida ao programa estatístico de metagenômica STAMP: statistical analysis of metagenomic profiles (PARKS *et al.*, 2014). Para determinar se os gêneros bacterianos ao longo das nove semanas apresentavam a mesma abundância foram comparados pelo teste de qui quadrado ($P < 0.05$) com posterior teste de correção de Bonferroni. Da mesma maneira os índices referentes à biodiversidade (chao1 e OTUs observados) foram comparadas pelo teste de qui quadrado ($P < 0.05$). São apresentados unicamente resultados estatisticamente significativos ($P < 0.05$).

5. RESULTADOS

Três voluntárias do sexo feminino, com idade entre 26 e 28 anos, completaram as 9 semanas do estudo, totalizando 6 coletas de biofilme para cada.

Os resultados mostraram que foram identificadas diferenças na composição dos gêneros bacterianos entre as três voluntárias. A voluntária 1 apresentou, ao longo das nove semanas, maior abundância de *Neisseria*, que representou 21,90% de todas as sequências (Figura 4), seguido por *Corynebacterium* (8,74%) e *Streptococcus* (7,77%). A voluntária 2 apresentou, ao longo das nove semanas, maior abundância de *Fusobacterium*, que representou 13,60% de todas as sequências (Figura 5), seguido por *Leptotrichia* (13,44%) e *Corynebacterium* (10,22%). A voluntária 3 apresentou, ao longo das nove semanas maior abundância de *Neisseria*, que representou 23,56% de todas as sequências (Figura 6) seguido por *Rothia* (15,73%) e *Streptococcus* (13,47%).

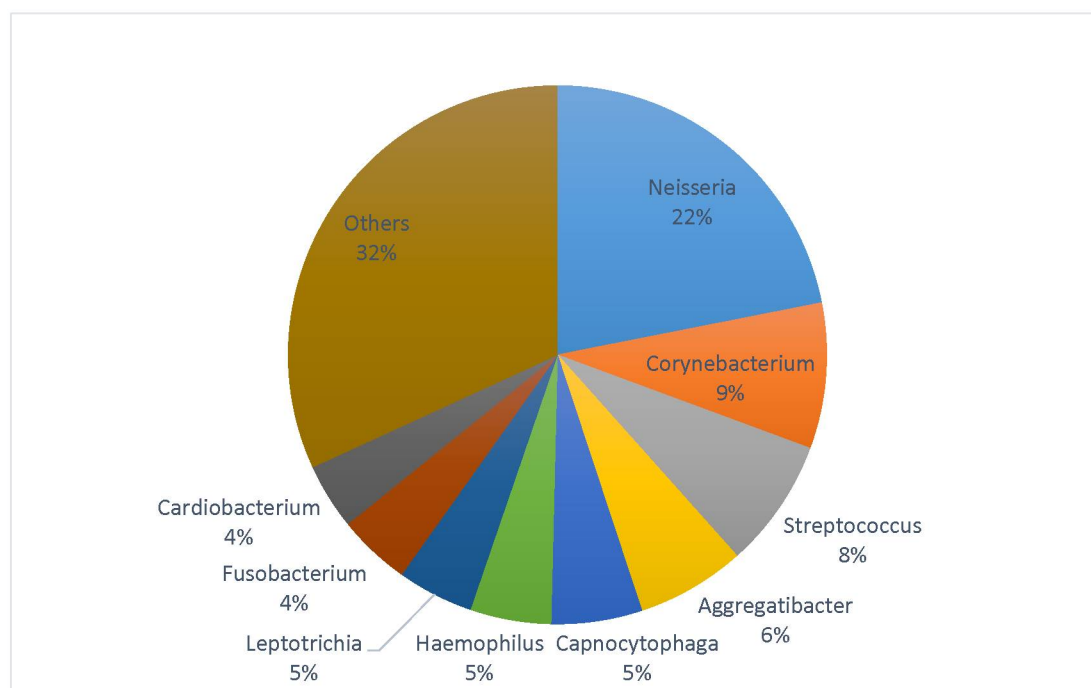


Figura 4. Distribuição dos gêneros bacterianos mais abundantes na voluntária 1.

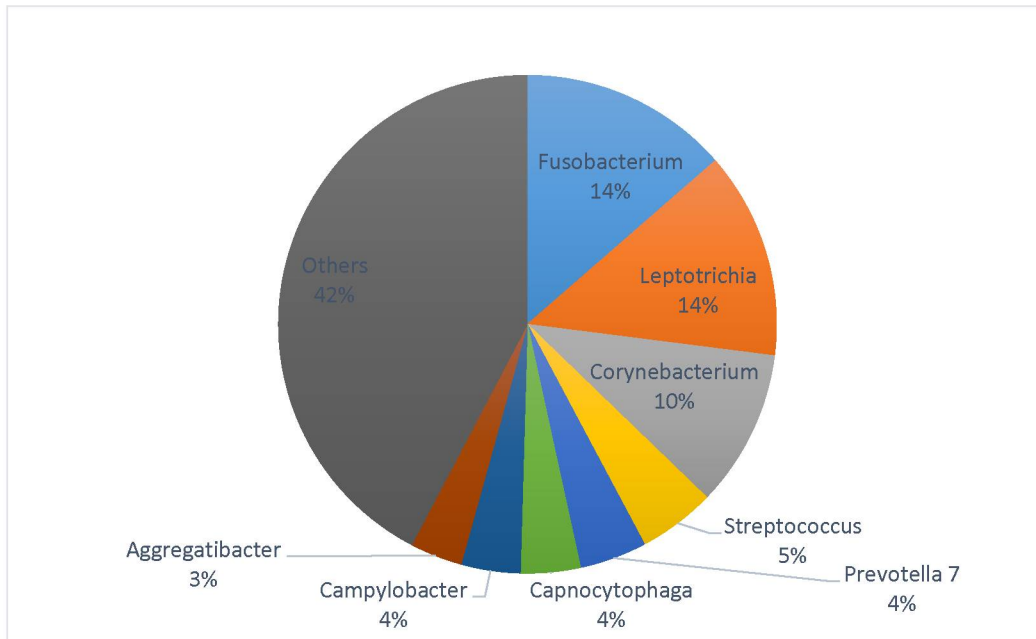


Figura 5. Distribuição dos gêneros bacterianos mais abundantes na voluntária 2.

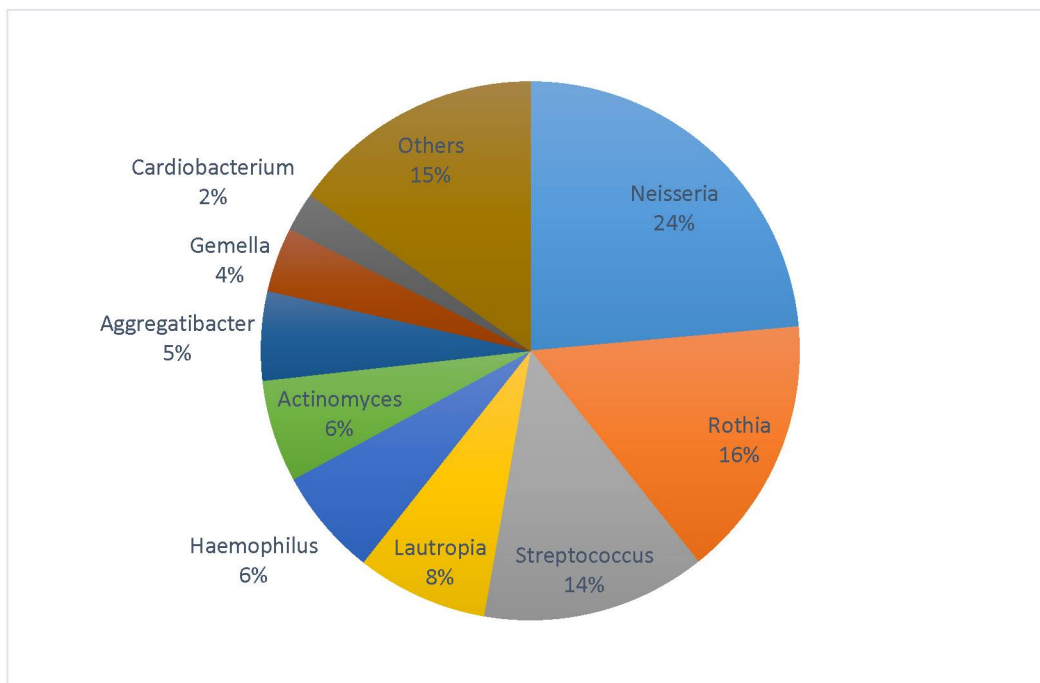


Figura 6. Distribuição dos gêneros bacterianos mais abundantes na voluntária 3.

Na análise de componentes principais (PCA) foi observada uma clara diferenciação das comunidades bacterianas entre as semanas na voluntária 1. Assim, o eixo PC1 (variável tratamento entre semanas) explicaria 75.5% das mudanças nas comunidades bacterianas a nível de gênero ao longo do tempo avaliado (Figura 7). No PCA é possível observar como a comunidade da semana 1 está mais próxima da semana 2 e vai ficando mais distante conforme os dentifrícios foram introduzidos, como observado comparando os resultados da coleta 6 à coleta 1.

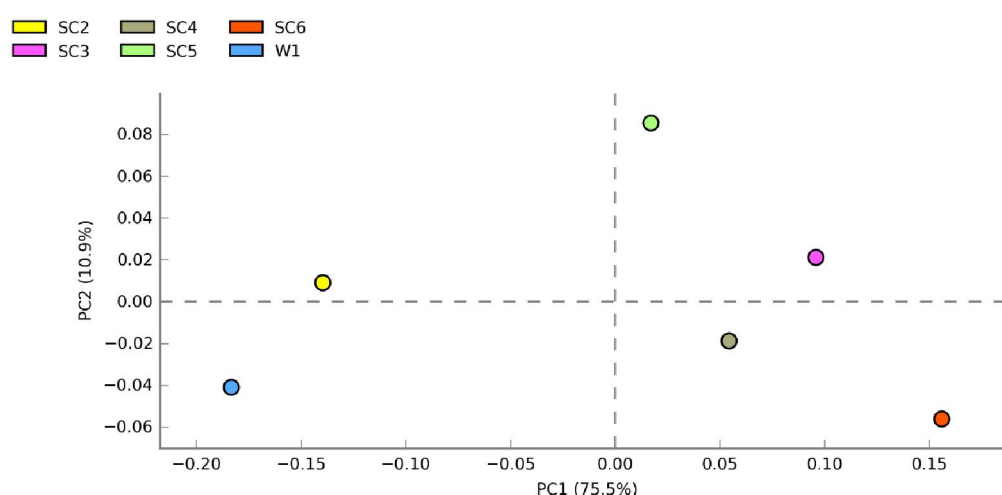


Figura 7. Análise de componentes principais (PCA) dos gêneros das comunidades bacterianas. A figura foi construída empregando o método de distância Bray-Curtis e representa a distância filogenética entre amostras, ou seja, um resumo da composição bacteriana de cada amostra. Cada ponto na figura representa uma coleta. W1 = coleta 1; SC2 = “sample collection” 2.

Por outro lado, referente à biodiversidade das comunidades bacterianas, foi observada diminuição significativa da riqueza pelos índices chao1 e número de OTUs na coleta 6 pelo teste de *qui* quadrado ($P < 0.05$) quando comparada à coleta 1 (Figuras 8 e 9).

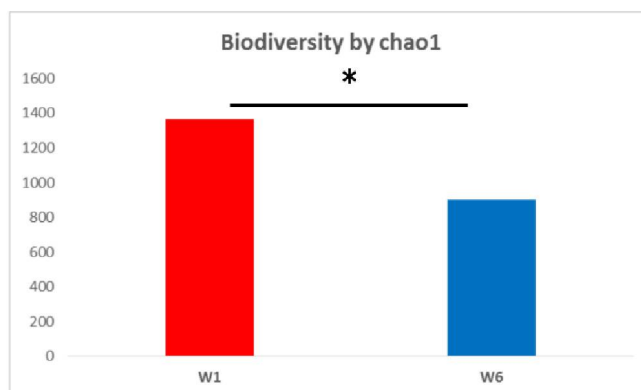


Figura 8. Riqueza das comunidades bacterianas determinada pelo índice chao1. Asterisco significa diferença significativa entre as semanas pelo teste de *qui* quadrado ($P < 0.05$). W1 = coleta 1 e W6 = coleta 6

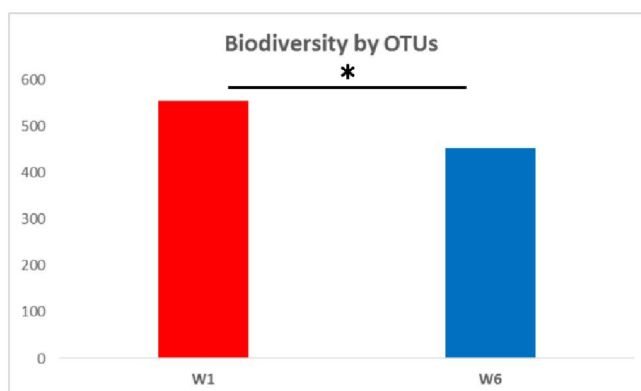


Figura 9. Riqueza das comunidades bacterianas determinada pelo número de OTUs observada em cada coleta. Asterisco significa diferença significativa entre as semanas pelo teste de *qui* quadrado ($P < 0.05$). W1 = coleta 1 e W6 = coleta 6

No primeiro período de tratamento, a voluntária 1 usou o dentifrício contendo 1,5% de arginina e 1450 ppm de flúor (coleta 3). A quantidade de *Neisseria*, *Actinomyces*, *Haemophilus* e *Rothia* encontrada no biofilme coletado após o uso da arginina foi maior que no biofilme coletado após o uso de 1450 ppm de flúor. Já as quantidades de *Eikenella*, *Corynebacterium*, *Aggregatibacter* e *Porphyromonas* foram maiores nas

amostras de biofilme coletadas após o uso do dentifrício fluoretado (coleta 5), (Figura 10).

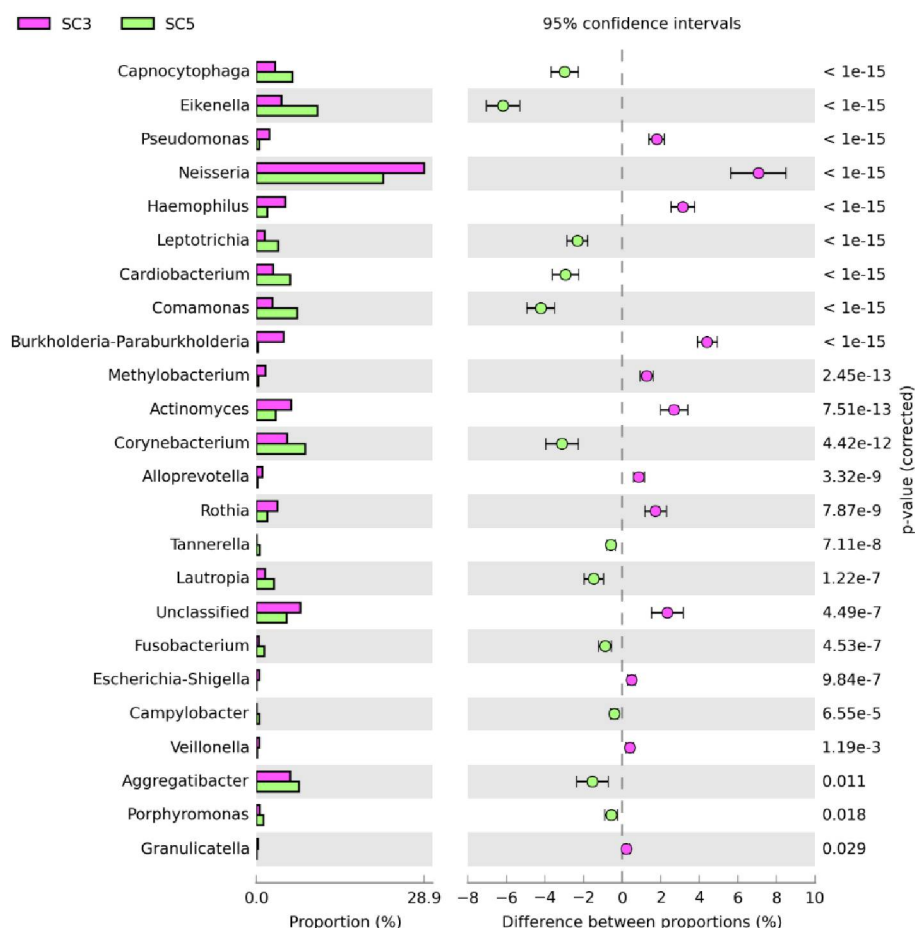


Figura 10. Gêneros significativamente diferentes na sua abundância entre a terceira e quinta coletas na voluntária 1. Comparação pelo teste de *qui* quadrado ($P < 0.05$) com posterior teste de correção de Bonferroni. SC3 = coleta 3; SC5 = coleta 5.

Mudanças na proporção das bactérias encontradas no biofilme da coleta 2 (após *washout*) e coleta 3 (após uso do dentifrício com 1,5% de arginina) foram observadas. Os gêneros *Corynebacterium*, *Porphyromonas*, *Leptotrichia*, *Fusobacterium* e *Streptococcus* apareceram em maiores quantidades na coleta 2, enquanto que *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Eikenella*, *Rothia* e *Actinomyces* foram encontrados em maior quantidade na coleta 3 (Figura 11).

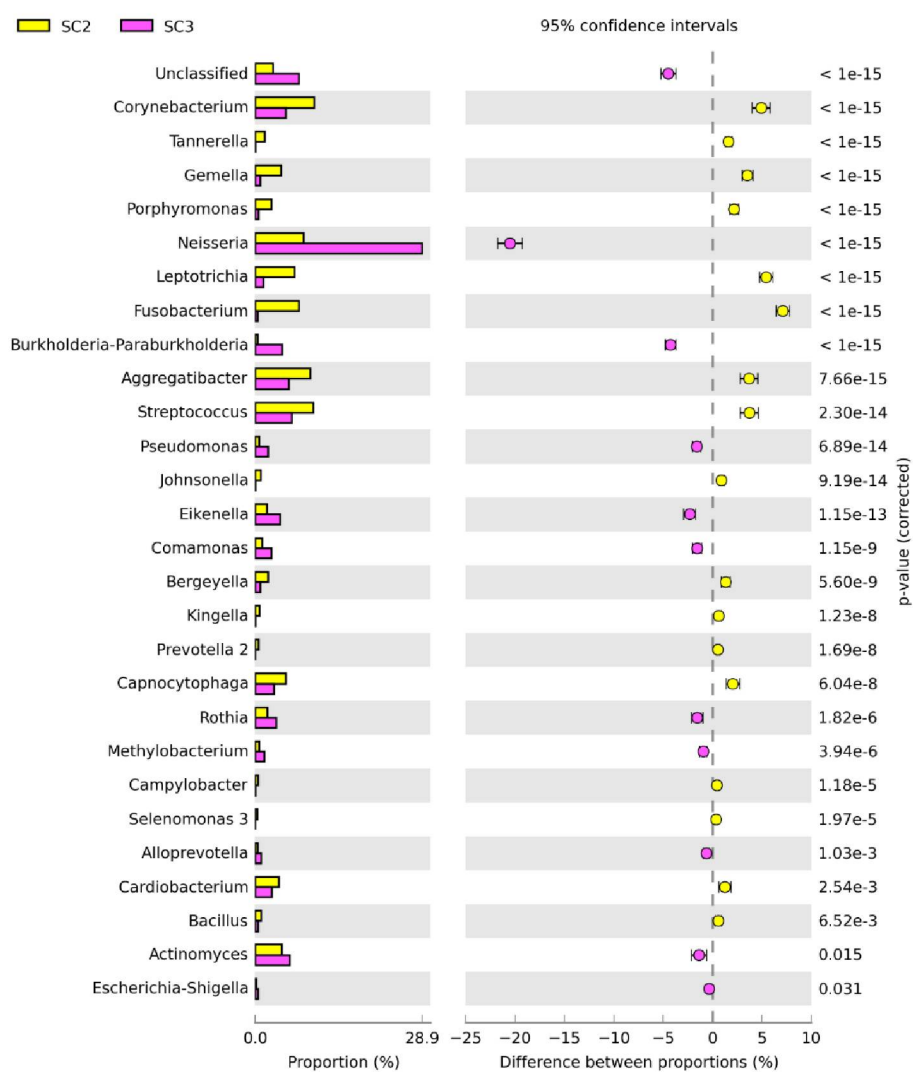


Figura 11. Gêneros significativamente diferentes na sua abundância entre a segunda e terceira coletas na voluntária 1. Comparação pelo teste de *qui* quadrado ($P < 0.05$) com posterior teste de correção de Bonferroni. SC2 = coleta 2; SC3 = coleta 3.

Da coleta 4 (após *washout*) para coleta 5 (após uso do dentífrico fluoretado), os gêneros que apresentaram diminuição foram *Haemophilus*, *Fusobacterium*, *Neisseria* e *Streptococcus*. O gênero *Actinomyces* e *Rothia*, entretanto, mostraram-se em maior quantidade na coleta 5 quando comparado com a 4 (Figura 12).

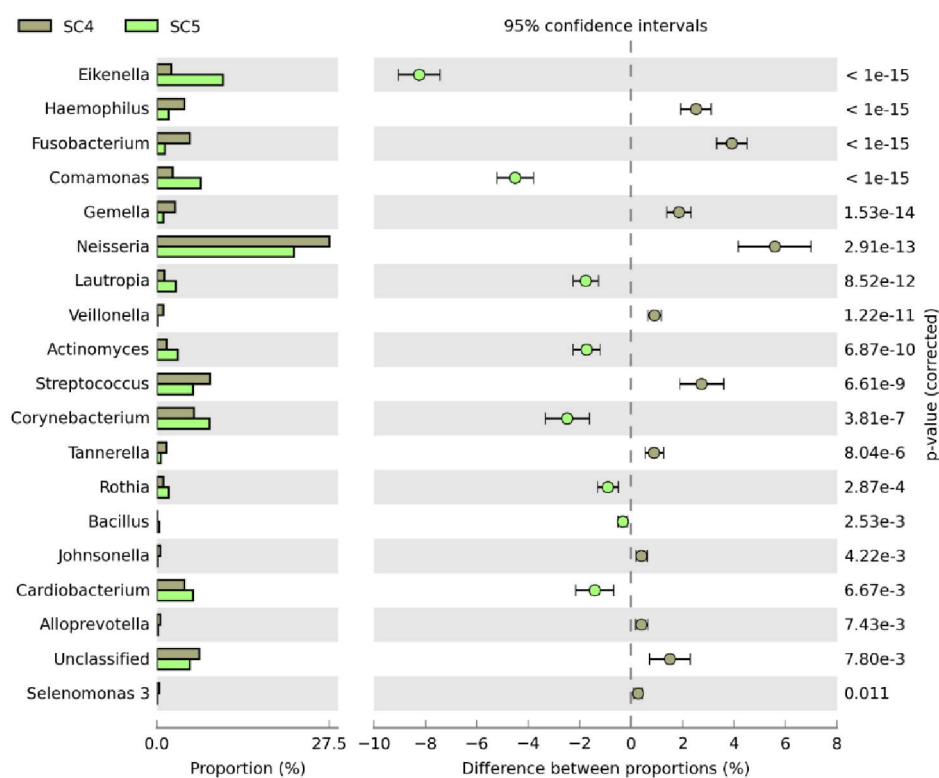


Figura 12. Gêneros significativamente diferentes na sua abundância entre a quarta e quinta coletas na voluntária 1. Comparação pelo teste de *qui* quadrado ($P < 0.05$) com posterior teste de correção de Bonferroni. SC4 = coleta 4; SC5 = coleta 5.

A análise de componentes principais (PCA) da voluntária 2 mostrou a diferença na biodiversidade entre as coletas. O eixo PC1 explicaria 73,7% das mudanças nas comunidades bacterianas a nível de gênero ao longo do tempo avaliado (Figura 13). No PCA é possível observar como a comunidade da coleta 1 está próxima da comunidade da coleta 6, ou seja, os tratamentos não causaram grandes variações que perdurassem até após o último período de *washout*. Ainda, observa-se que da coleta 2 para coleta 3 (após uso de dentifrício fluoretado), a biodiversidade bacteriana encontrada foi bastante diferente, mostrando que o dentifrício com 1450 ppm de flúor foi capaz de modificar a microbiota existente. O mesmo é observado comparando a biodiversidade das coletas 4 e 5 (após uso de dentifrício contendo 1,5% de arginina), em que houve grande modificação da comunidade encontrada.

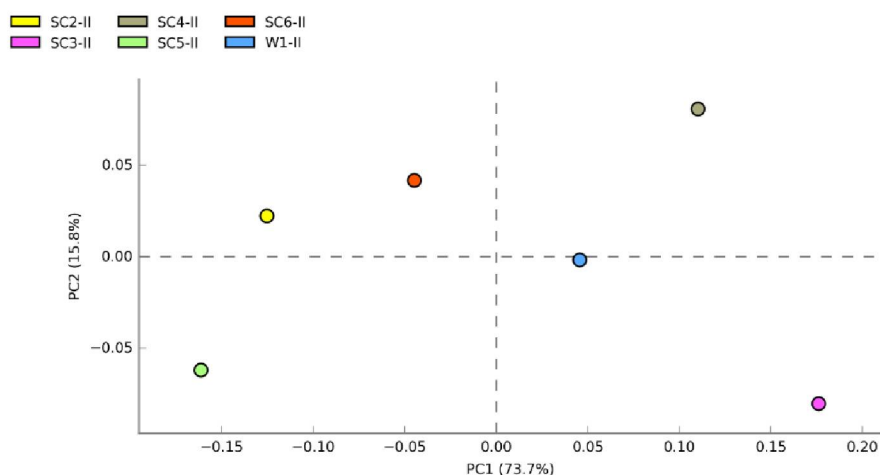


Figura 13. Análise de componentes principais (PCA) dos gêneros das comunidades bacterianas. A figura foi construída empregando o método de distância Bray-Curtis e representa a distância filogenética entre amostras, ou seja, um resumo da composição bacteriana de cada amostra. Cada ponto na figura representa uma coleta. W1 = coleta 1; SC2 = “sample collection” 2.

Ainda, após o primeiro período de tratamento, em que a voluntária utilizou dentifrício fluoretado, a quantidade de *Fusobacterium*, *Prevotella* e *Campilobacter* foram maiores que as observadas após o uso de dentifrício com 1,5% de arginina. Após o uso da arginina, *Leptotrichia* e *Corynebacterium* foram os que mais aumentaram se comparado a coleta após o uso do dentifrício fluoretado, tendo o gênero *Actinomyces* apresentado aumento, também, significativo (Figura 14).

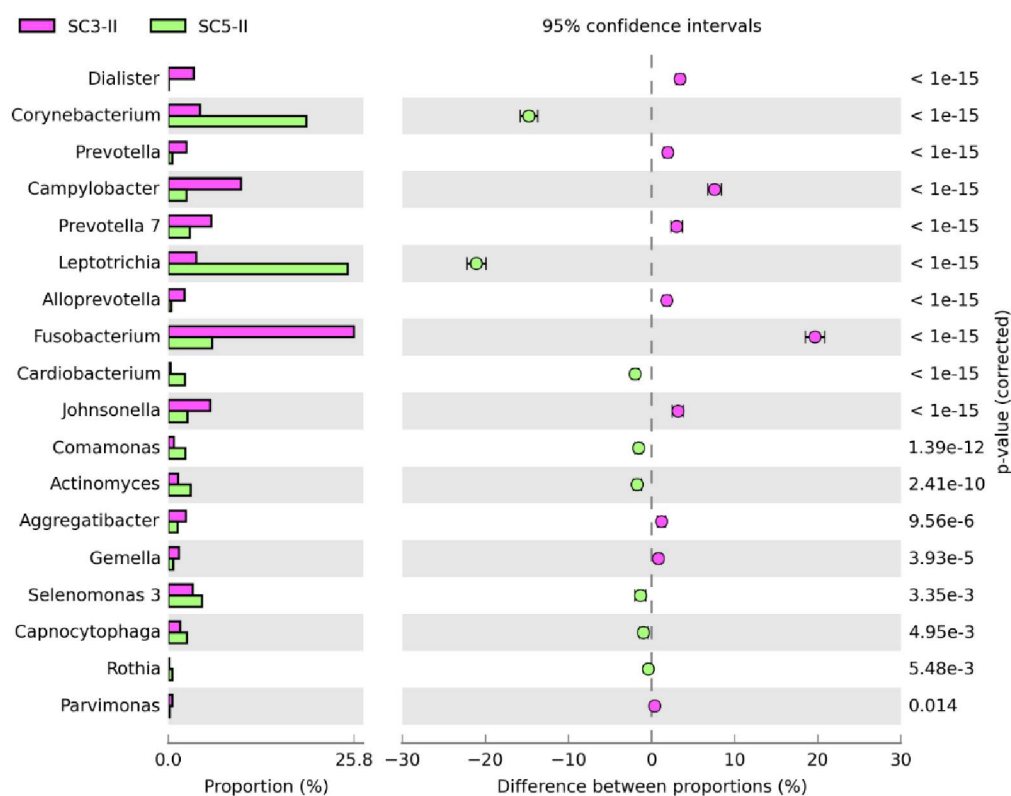


Figura 14. Gêneros significativamente diferentes na sua abundância entre a terceira e quinta coletas na voluntária 2. Comparação pelo teste de *qui* quadrado ($P < 0.05$) com posterior teste de correção de Bonferroni. SC3 = coleta 3; SC5 = coleta 5.

Da coleta 2 (após o primeiro período de *washout*) para a coleta 3 (utilização do dentífrico com 1450 ppm de flúor), verifica-se que houve mudança significativa *Corynebacterium*, *Fusobacterium* e *Streptococcus*. A quantidade de *Streptococcus* encontrada após o uso de dentífrico fluoretado foi menor, assim como de *Corynebacterium*, *Actinomyces*, e *Haemophilus*, mostrando que o dentífrico fluoretado teve influência sobre a composição microbiana. Já *Fusobacterium* e *Prevotella* aumentaram em quantidade (Figura 15).

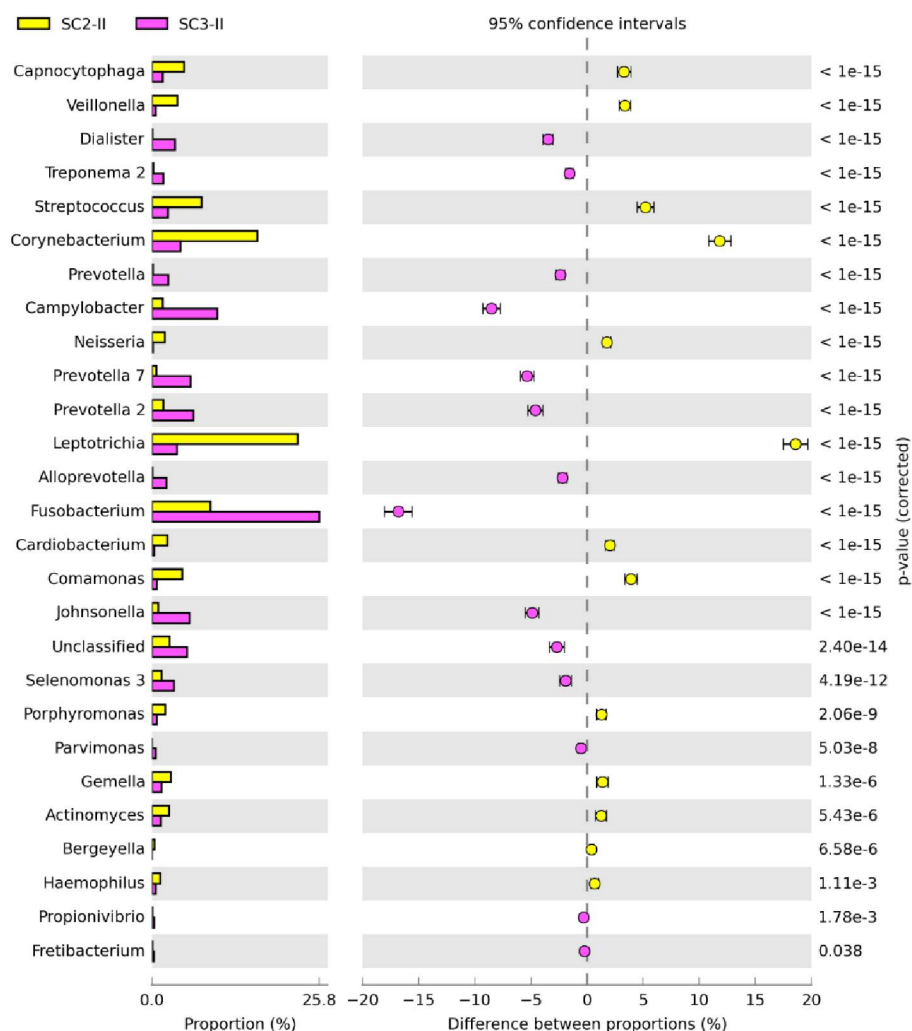


Figura 15. Gêneros significativamente diferentes na sua abundância entre a segunda e a terceira coletas na voluntária 2. Comparação pelo teste de *qui* quadrado ($P < 0.05$) com posterior teste de correção de Bonferroni. SC2 = coleta 2; SC3 = coleta 3

Analisando a proporção bacteriana encontrada entre as coletas 4 (após o período de *washout* entre os tratamentos) e 5 (após o uso de dentifrício com 1,5% de arginina), observou-se redução na quantidade de *Streptococcus*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas* e *Haemophilus*, enquanto que *Actinomyces*, *Corynebacterium*, *Leptotrichia* e *Rothia* aumentaram (Figura 16).

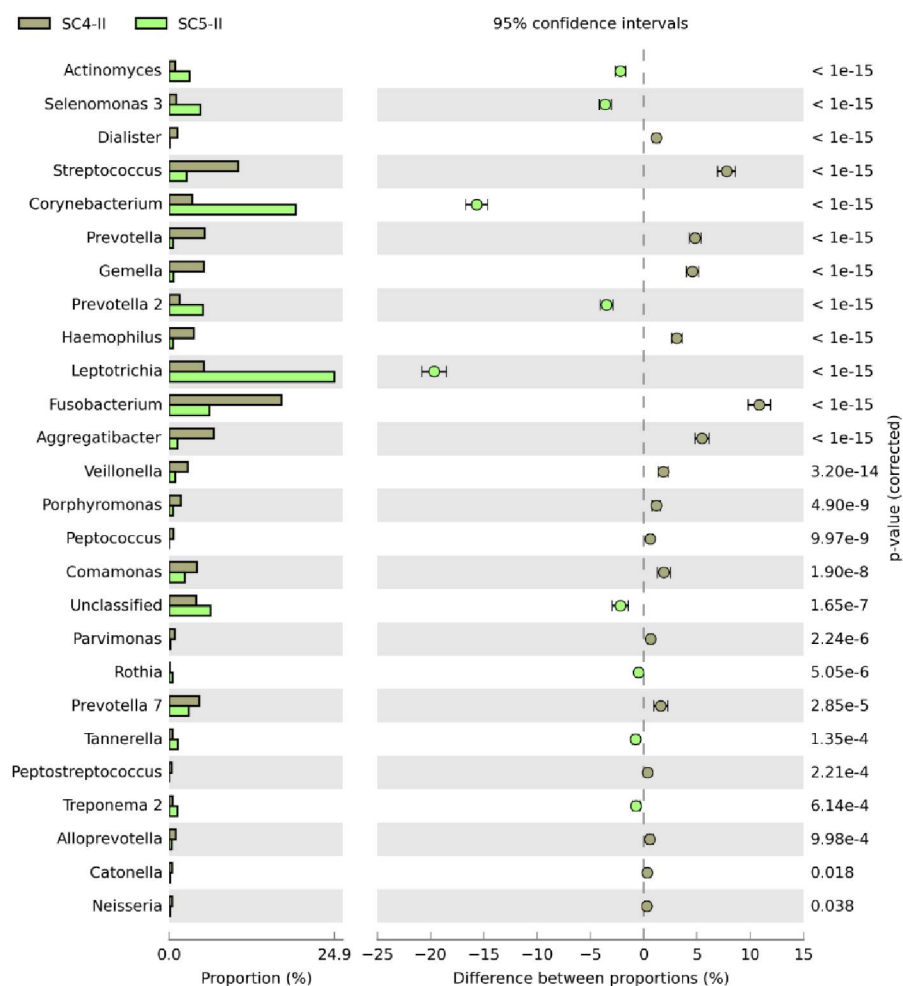


Figura 16. Gêneros significativamente diferentes na sua abundância entre a quarta e quinta coletas na voluntária 2. Comparação pelo teste de *qui* quadrado ($P < 0.05$) com posterior teste de correção de Bonferroni. SC4 = coleta 4; SC5 = coleta 5.

Na análise de componentes principais (PCA) referentes as amostras de biofilme da voluntária 3, observou-se diferenças das comunidades bacterianas e o eixo PC1 (tratamento) explica os 54,3% de mudança de gêneros bacterianos (Figura 17). Dentre as voluntárias, este foi o que apresentou menos variabilidade na diversidade bacteriana. Mesmo assim, é clara a diferença entre a primeira e segunda coletas (após *washout*), diferença semelhante a encontrada entre a segunda e terceira coletas (após uso de dentifrício fluoretado). A menor diferença foi observada entre a quarta (após *washout* entre os tratamentos) e quinta (após uso de dentifrício com 1,5% de arginina) coletas.

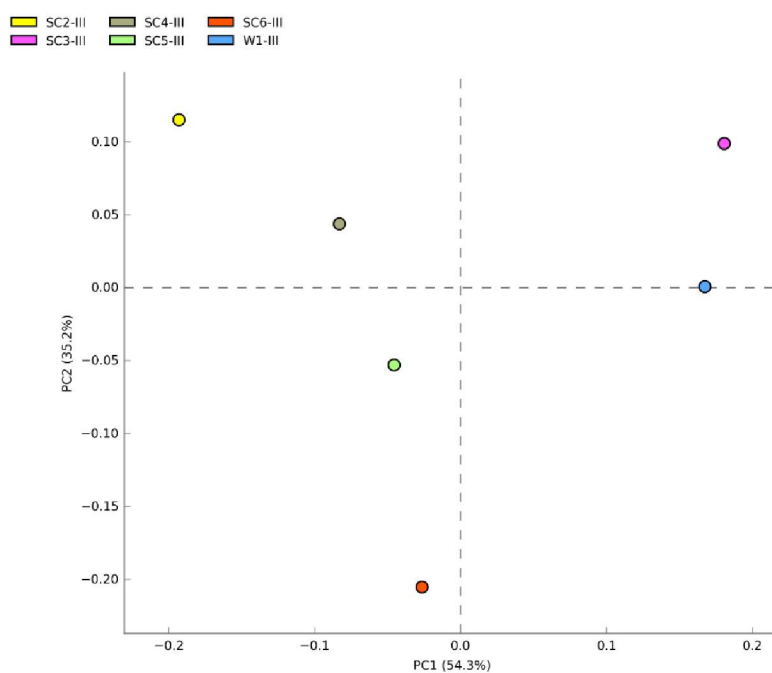


Figura 17. Análise de componentes principais (PCA) dos gêneros das comunidades bacterianas. A figura foi construída empregando o método de distância Bray-Curtis e representa a distância filogenética entre amostras, ou seja, um resumo da composição bacteriana de cada amostra. Cada ponto na figura representa uma coleta. W1 = coleta 1; SC2 = "sample collection" 2...

Após o uso de dentifrício fluoretado, foi observado que a composição do biofilme apresentou quantidades maiores de *Actinomyces* e *Fusobacterium* (coleta 3), enquanto que após o uso do dentifrício com 1,5% de arginina (coleta 5) a composição do biofilme apresentou maiores quantidades de *Streptococcus*, *Neisseria* e *Haemophilus* (Figura 18).

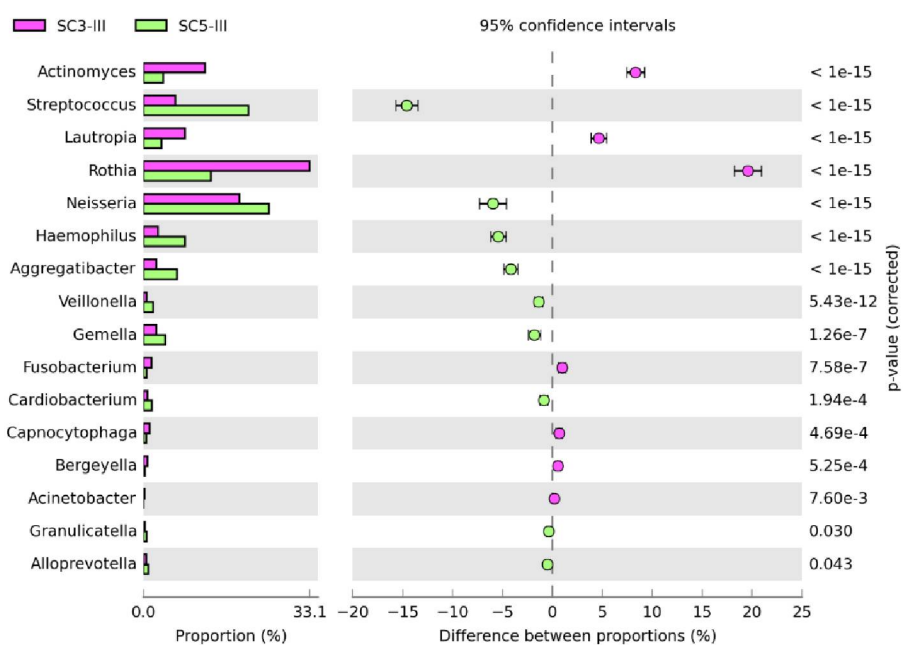


Figura 18. Gêneros significativamente diferentes na sua abundância entre a terceira e quinta coletas na voluntária 3. Comparação pelo teste de *qui* quadrado ($P < 0.05$) com posterior teste de correção de Bonferroni. SC3 = coleta 3; SC5 = coleta 5.

A diferença de proporção de gêneros bacterianos encontrada entre as coletas 2 (após *washout*) e 3 (após uso do dentifrício fluoretado) mostra que houve aumento de *Actinomyces* e *Rothia*, e diminuição de *Neisseria*, *Streptococcus*, *Porphyromonas* e *Haemophilus* (Figura 19).

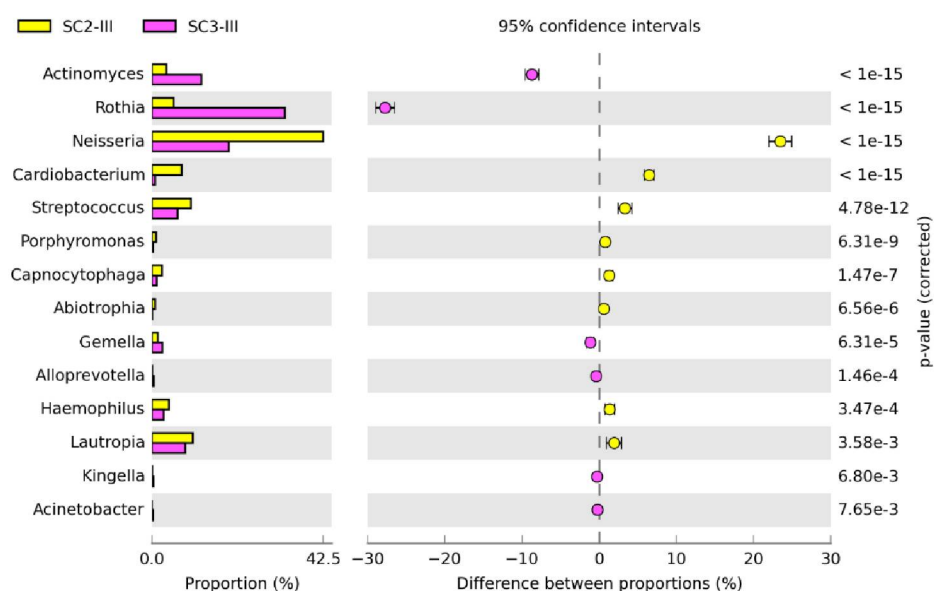


Figura 19. Gêneros significativamente diferentes na sua abundância entre a segunda e terceira coletas na voluntária 3. Comparação pelo teste de *qui* quadrado ($P < 0.05$) com posterior teste de correção de Bonferroni. SC2 = coleta 2; SC3 = coleta 3.

Já na coleta 4 (após *washout* entre tratamentos), a proporção de *Neisseria* foi maior que a encontrada na coleta 5 (após uso de dentifrício com 1,5% de arginina), enquanto que o gênero *Streptococcus* e *Rothia* foram encontrados em maior quantidade na coleta 5. Nesse voluntário, após o uso de dentifrício contendo arginina, o gênero *Streptococcus* apresentou aumento, enquanto que nos outros voluntários esse gênero diminuiu (Figura 20).

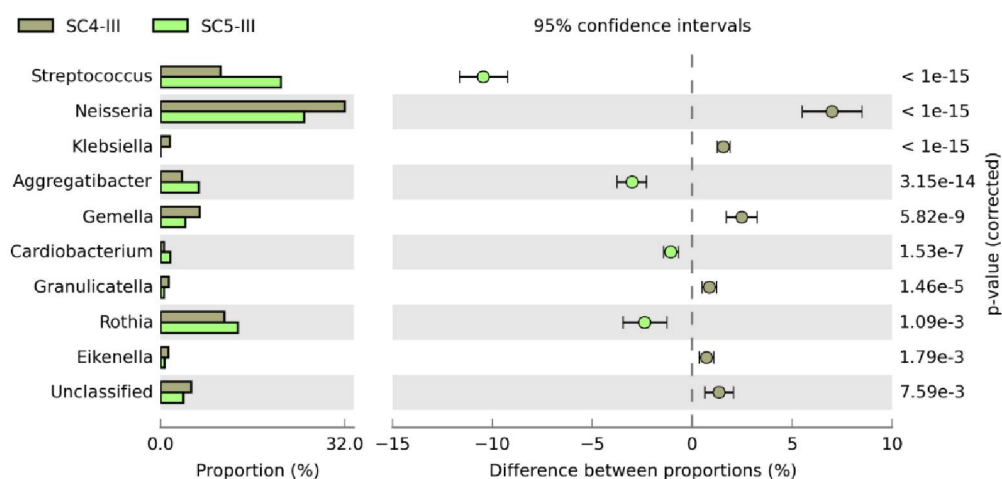


Figura 20. Gêneros significativamente diferentes na sua abundância entre a quarta e quinta coletas na voluntária 3. Comparação pelo teste de *qui* quadrado ($P < 0.05$) com posterior teste de correção de Bonferroni. SC4 = coleta 5; SC5 = coleta 5.

O quadro 1 resume os gêneros encontrados em maiores quantidades entre as coletas:

	ANTES DO TRATAMENTO COM ARGININA	APÓS TRATAMENTO COM ARGININA	ANTES DO TRATAMENTO COM FLÚOR	APÓS TRATAMENTO COM FLÚOR
VOLUNTÁRIA 1	<i>Neisseria</i> (8%) <i>Corynebacterium</i> (9%) <i>Streptococcus</i> (10%) <i>Aggregatibacter</i> (9%) <i>Captocytophaga</i> (5%) <i>Haemophilus</i> (4%) <i>Leptotrichia</i> (7%) <i>Fusobacterium</i> (7%)	<i>Neisseria</i> (29%) <i>Corynebacterium</i> (5%) <i>Streptococcus</i> (7%) <i>Aggregatibacter</i> (6%) <i>Captocytophaga</i> (3%) <i>Haemophilus</i> (5%) <i>Leptotrichia</i> (1%) <i>Fusobacterium</i> (0%)	<i>Neisseria</i> (26%) <i>Corynebacterium</i> (6%) <i>Streptococcus</i> (9%) <i>Aggregatibacter</i> (7%) <i>Captocytophaga</i> (6%) <i>Haemophilus</i> (4%) <i>Leptotrichia</i> (4%) <i>Fusobacterium</i> (5%)	<i>Neisseria</i> (21%) <i>Corynebacterium</i> (8%) <i>Streptococcus</i> (6%) <i>Aggregatibacter</i> (7%) <i>Captocytophaga</i> (6%) <i>Haemophilus</i> (2%) <i>Leptotrichia</i> (4%) <i>Fusobacterium</i> (2%)
VOLUNTÁRIA 2	<i>Fusobacterium</i> (16%) <i>Leptotrichia</i> (5%) <i>Corynebacterium</i> (3%)	<i>Fusobacterium</i> (6%) <i>Leptotrichia</i> (25%) <i>Corynebacterium</i> (18%) <i>Streptococcus</i> (3%)	<i>Fusobacterium</i> (9%) <i>Leptotrichia</i> (22%) <i>Corynebacterium</i> (16%) <i>Streptococcus</i> (8%)	<i>Fusobacterium</i> (26%) <i>Leptotrichia</i> (4%) <i>Corynebacterium</i> (4%)

	<i>Streptococcus</i> (10%) <i>Prevotella 7</i> (4%) <i>Capnocytophaga</i> (4%) <i>Campylobacter</i> (3%) <i>Aggregatibacter</i> (6%)	<i>Prevotella 7</i> (3%) <i>Capnocytophaga</i> (3%) <i>Campylobacter</i> (2%) <i>Aggregatibacter</i> (1%)	<i>Prevotella 7</i> (1%) <i>Capnocytophaga</i> (5%) <i>Campylobacter</i> (2%) <i>Aggregatibacter</i> (3%)	<i>Streptococcus</i> (2%) <i>Prevotella 7</i> (6%) <i>Capnocytophaga</i> (1%) <i>Campylobacter</i> (10%) <i>Aggregatibacter</i> (2%)
VOLUNTÁRIA 3	<i>Neisseria</i> (30%) <i>Rothia</i> (11%) <i>Streptococcus</i> (10%) <i>Leutropia</i> (3%) <i>Haemophilus</i> (8%) <i>Actinomyces</i> (5%) <i>Aggregatibacter</i> (3%) <i>Gemella</i> (6%) <i>Cardiobacterium</i> (1%)	<i>Neisseria</i> (26%) <i>Rothia</i> (14%) <i>Streptococcus</i> (20%) <i>Leutropia</i> (4%) <i>Haemophilus</i> (8%) <i>Actinomyces</i> (4%) <i>Aggregatibacter</i> (7%) <i>Gemella</i> (4%) <i>Cardiobacterium</i> (2%)	<i>Neisseria</i> (43%) <i>Rothia</i> (5%) <i>Streptococcus</i> (9%) <i>Leutropia</i> (10%) <i>Haemophilus</i> (4%) <i>Actinomyces</i> (4%) <i>Aggregatibacter</i> (3%) <i>Gemella</i> (1%) <i>Cardiobacterium</i> (7%)	<i>Neisseria</i> (18%) <i>Rothia</i> (33%) <i>Streptococcus</i> (6%) <i>Leutropia</i> (8%) <i>Haemophilus</i> (3%) <i>Actinomyces</i> (13%) <i>Aggregatibacter</i> (3%) <i>Gemella</i> (2%) <i>Cardiobacterium</i> (1%)

Quadro 1: Gêneros bacterianos encontrados antes e depois dos tratamentos

Gêneros bacterianos como *Actinomyces*, *Fusobacterium*, *Gemella* e *Prevotella* estão relacionados com doença periodontal (MOORE; MOORE, 1994). Mudanças nesses gêneros bacterianos foram encontradas após utilização tanto de flúor quanto de arginina. Além disso, gêneros como *Actinomyces* e *Neisseria* estão associados ao metabolismo de arginina (NASCIMENTO; BURNE, 2014). Na voluntária 1, *Neisseria* apresentou significativo aumento após a utilização de arginina. Porém, esse gênero teve significativa redução após tratamento com flúor na voluntária 3. *Actinomyces* apresentou aumento após o uso de flúor na voluntária 3, mas não mostrou mudança significativa após o uso de arginina.

6. DISCUSSÃO

Neste trabalho, buscamos analisar as possíveis diferenças na biodiversidade bacteriana do biofilme dental existentes entre os tratamentos com dentifrício contendo 1,5% de arginina e 1450 ppm de flúor e um dentifrício contendo 1450 ppm de flúor.

Há 40 anos estudos microbiológicos sobre o metabolismo oral de arginina vêm sendo realizados (NASCIMENTO; BURNE, 2014), porém, apenas recentemente a arginina está sendo adicionada a dentifrícios como forma de controlar a cárie dental. Zheng *et al.* (2017) observaram que houve redução do gênero *Streptococcus* após a utilização de dentifrício contendo 8% de arginina durante 2 semanas, enquanto que os gêneros *Porphyromonas* e *Actinomyces* não sofreram alteração. Neste trabalho, além de testarmos o dentifrício contendo 1,5% de arginina, observamos aumento do gênero *Streptococcus* em uma das voluntárias após o uso de dentifrício contendo arginina. Além disso, houve redução na quantidade de *Streptococcus* após a utilização de dentifrício fluoretado, nas três voluntárias, mostrando que esse dentifrício influenciou a composição microbiana do biofilme.

Muitas espécies de *Streptococcus* são conhecidos por serem portadores do SAD (NASCIMENTO; BURNE 2014), o que explicaria o fato da quantidade desse gênero ter aumentado após a utilização de arginina na voluntária 3. Koopman *et al.* (2016) encontraram esse gênero como sendo o mais abundante após a utilização de dentifrício contendo 8% de arginina após 8 semanas. Além disso, gêneros como *Rothia*, *Porphyromonas* e *Actinomyces* também aumentaram. Nos três voluntários, foi encontrado o gênero *Rothia* em maior quantidade após a utilização do dentifrício contendo arginina. Em um voluntário o gênero *Actinomyces* também foi observado este aumento. Por outro lado, o gênero *Porphyromonas* diminuiu em dois dos três voluntários após o uso da arginina. Ainda, Koopman *et al.* (2016) observaram diminuição dos gêneros *Neisseria* e *Fusobacterium*. Um voluntário apresentou diminuição de *Neisseria*, enquanto outro apresentou aumento. Dois dos três voluntários apresentaram diminuição de *Fusobacterium* após o uso de arginina, como no estudo de Koopman *et al.* (2016).

Liu *et al.* (2012) encontraram diferenças na composição microbiana entre indivíduos portadores de doença periodontal e indivíduos saudáveis. Os gêneros encontrados em maior quantidade nos voluntários portadores de doença periodontal foram *Prevotella* e *Fusobacterium*. Dois dos três voluntários apresentaram, após a utilização de dentifrício com arginina, diminuição de *Fusobacterium*, porém, em um dos voluntários esse gênero também foi encontrado em menor quantidade após o uso do dentifrício fluoretado.

Para Fontana (2016), dentifrício fluoretado continua sendo o padrão para prevenção de cárie, pois a adição de arginina ao dentifrício não fluoretado tem o benefício anti-cárie similar ao controle fluoretado, enquanto Cummins (2013) defende que a ação do flúor e da arginina são complementares, visto que a arginina age no biofilme e o flúor age no tecido dental. Além disso, relata que a adição de 1,5% de arginina a um dentifrício contendo 1450 ppm de flúor e um composto de cálcio insolúvel aumenta sua eficiência anti-cárie quando comparado a um dentifrício com o mesmo teor de flúor.

Pouco estudos sobre o efeito de dentifrício contendo 1,5% de arginina na composição do biofilme dental estão disponíveis. Além da composição microbiana, outros aspectos têm sido investigados: papel da arginina no processo des/re, atividade enzimática da SAD quando da introdução de arginina no meio bucal, a influência da arginina sobre a biomassa do biofilme, além de alguns estudos utilizarem arginina a 8% para avaliação desses parâmetros. Aqui, priorizamos investigar os efeitos de arginina a 1,5%, pois é nessa concentração que o fabricante afirma ter efeito anti-cárie.

Uma limitação da metodologia adotada nesse estudo é a dependência da assiduidade dos voluntários que utilizaram os dentifícios, tanto no tempo de tratamento quanto no uso exclusivo do dentifrício ofertado, o que pode influenciar nos resultados. O método utilizado identifica microrganismos a nível de gênero, então a especificidade dos achados fica comprometida. Métodos como metagenoma, utilizado por Koopman *et al.* (2017), e qPCR espécie-específico, utilizado por Zheng *et al.* (2017), identificam microrganismos a nível de espécie, sendo mais indicados para esse tipo de avaliação, porém são métodos caros devido a sua alta especificidade. Além disso, seria

necessário analisar o biofilme de um número maior de voluntários para garantir resultados estatisticamente significativos.

7. CONCLUSÃO

Nas condições testadas, conclui-se que:

- Não houve um padrão de flutuação bacteriana entre os voluntários;
- Tanto o dentifrício fluoretado quanto o dentifrício contendo 1,5% de arginina tiveram influência sobre a composição microbiana do biofilme dental.

REFERÊNCIAS

ALVES, L. S.; MOURA, M. S.; GROISMAN, S.; MALTZ, M. Epidemiologia da cárie dentária. In: MALTZ, M.; TENUTA, L. M. A.; GROISMAN, S.; CURY, J. A. **Cariologia: Conceitos básicos, Diagnóstico e Tratamento Não Restaurador**. Série ABENO: Odontologia Essencial: parte clínica. São Paulo, 2016. p. 51-63.

ALVEZ, L. S.; PAROLO, C. C. F.; MALTZ, M. Tratamento não restaurador da doença cárie dentária. In: MALTZ, M.; TENUTA, L. M. A.; GROISMAN, S.; CURY, J. A. **Cariologia: Conceitos básicos, Diagnóstico e Tratamento Não Restaurador**. Série ABENO: Odontologia Essencial: parte clínica. São Paulo, 2016. p. 82-91.

ÁSTVALDSDÓTTIR, Á. *et al.* Arginine and Caries Prevention: A Systematic Review. **Caries Research**, v. 50, n. 4, p. 383-393, 2016.

BELTRÁN, É. R. *et al.* Activity and effects of urease and arginine deiminase in saliva and human oral biofilm. **Revista Facultad de Odontología Universidad de Antioquia**, v. 23, n. 2, oct. 2012.

BURNE, R. A.; MAQUIS, R. E. Alkali production by oral bacteria and protection against dental caries. **FEMS Microbiology Letters**, v. 193, p. 1-6, sep. 2000.

CANTORE, R. *et al.* *in situ* clinical effects of a new dentifrice containing 1,5% arginine and 1450 ppm fluoride on enamel Demineralization and Remineralization and plaque metabolism. **J Clin Dent**, v. 24, p. 32-44, 2013.

CAPARASO, J. G. *et al.* Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, suppl. 1, p. 4516-4522, 2011.

CAPORASO, J. G, *et al.* Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **The ISME journal**, v. 6, n. 8, p. 1621-1624, mai. 2012.

CAPORASO, J. G. *et al.* QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature Methods**, v. 7, n. 5, 335-336, may. 2010.

CHEN, Yi-Ywan M.; WEAVER, C. A.; BURNE, R. A. Dual functions of *Streptococcus salivarius* urease. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 16, p. 4667-4669, may. 2000.

CUMMINS, D. Dental caries: a disease which remains a public health concern in the 21st century. The exploration of a breakthrough technology for caries prevention. **Journal of Clinical Dentistry**, v. 24, n. Spec Iss A, p. A1-A14, 2010.

CUMMINS, D. The development and validation of a new technology, based upon 1.5% arginine, an insoluble calcium compound and fluoride, for everyday use in the prevention and treatment of dental caries. **Journal of Dentistry**, v. 41, p. S1-S11, 2013.

DAWES, C.; DIBDIN, G. H. Salivary concentrations of urea released from a chewing gum containing urea and how these affect the urea content of gel-stabilized plaques and their pH after exposure to sucrose. **Caries Research**, v. 35, n. 5, p. 344-353, sep. 2001.

DEGNAN, P. H., OCHMAN, H. Illumina-based analysis of microbial community diversity. **The ISME Journal**, v. 6, n. 1, p. 183-194, 2012.

FONTANA, M. Enhancing Fluoride: Clinical Human Studies of Alternatives or Boosters for Caries Management. **Caries Research**, v. 50, suppl 1, 22-37, apr. 2016.

GORDAN, V. V. *et al.* Could alkali production be considered an approach for caries control?. **Caries research**, v. 44, n. 6, p. 547-554, may. 2010.

GRISWOLD, A. R.; CHEN, Yi-Ywan M.; BURNE, R. A. Analysis of an Agmatine Deiminase Gene Cluster in *Streptococcus mutans* UA159. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 6, p. 1902-1904, mar. 2004.

GRISWOLD, A. R.; NASCIMENTO, M. M.; BURNE, R. A. Distribution, regulation and role of the agmatine deiminase system in mutans streptococci. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 24, n. 1, p.79-82, 2009.

GUPTA, RKr. Effect on Pellicle Proteome upon Adsorption of Salivary Peptide on Hydroxyapatite and their effects on Enamel Demineralization (2017). **Electronic Thesis and Dissertation Repository**. 5031.

HELLER, D., *et al.* Microbial Diversity in the Early In Vivo-Formed Dental Biofilm. **Appl Environ Microbiol**, v. 82, n. 6, p. 1881-1889, 2016.

HENZ, S. L., JARDIM, J. J. Tratamento não restaurador da doença cárie dentária. In: MALTZ, M.; TENUTA, L. M. A.; GROISMAN, S.; CURY, J. A. **Cariologia: Conceitos básicos, Diagnóstico e Tratamento Não Restaurador**. Série ABENO: Odontologia Essencial: parte clínica. São Paulo, 2016. p. 75-81.

HOLGERSON, P. L., *et al.* Maturation of Oral Microbiota in Children with or without Dental Caries. **PLoS One**, Doi: 10.1371/journal.pone.0128534, 2015.

IEBBA, V. *et al.* Eubiosis and dysbiosis: the two sides of the microbiota. **New Microbiologica**, v. 39, p. 1-12, 2016.

JARDIM, J. J., ALVES L. S., MALTZ, M. Tratamento não restaurador da doença cárie dentária. In: MALTZ, M.; TENUTA, L. M. A.; GROISMAN, S.; CURY, J. A. **Cariologia: Conceitos básicos, Diagnóstico e Tratamento Não Restaurador**. Série ABENO: Odontologia Essencial: parte clínica. São Paulo, 2016. p. 95-103.

KOOPMAN, J. E. *et al.* Changes in the oral ecosystem induced by the use of 8% arginine toothpaste. **Archives of Oral Biology**, v. 73, p. 79-87, 2017.

KRAIVAPHAN, P. *et al.* Two-year caries clinical study of the efficacy of novel dentifrices containing 1,5% arginine, an insoluble calcium compound and 1,450 ppm fluoride. **Caries Research**, v. 47, n. 6, p. 582-590, 2013.

LIU, B. *et al.* Deep Sequencing of the Oral Microbiome Reveals Signatures of Periodontal Disease. *Plos One*, v. 7, issue 5, p. 1-16, jun. 2012.

LIU, Y.; NASCIMENTO. M.; BURNE, R. A. Progress toward understanding the contribution of alkali generation in dental biofilms to inhibition of dental caries. **International Journal of Oral Science**, v. 4, p. 135-140, sep. 2012.

MARSH, P. D. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res*, v. 8, n. 2, p. 263-271, 1994.

MARSH, P. D.; DEVINE, D. A. How is the development of dental biofilms influenced by the host?. **Journal of clinical periodontology**, v. 38, n. s11, p. 28-35, feb. 2011.

MOORE, W. E. C.; MOORE, L. V. H. The bacteria of periodontal diseases. *Periodontology 2000*, v. 5, p. 66-77, 1994.

NASCIMENTO, M. M. *et al.* Correlations of oral bacterial arginine and urea catabolism with caries experience. **Oral microbiology and immunology**, v. 24, n. 2, p. 89-95, feb. 2009.

NASCIMENTO, M. M.; BURNE, R. A. Caries prevention by arginine metabolism in oral biofilms: translating science into clinical success. **Current Oral Health Reports**, v. 1, n. 1, p. 79-85, jan. 2014.

OVERMAN, P. R. Biofilm: a new view of plaque. **Journal Contemp Dent Pract**, v. 1, n. 3, p. 18-29, 2000.

PAES LEME A. F. *et al.* The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation – new insight. **Journal of Dental Research**, v. 85, n. 10, p. 878-887, 2006.

PARKS, D. H. *et al.* STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles. *Bioinformatics*, v. 30, n. 21, p. 3123-3124, 2014.

PETERSEN, P. E. *et al.* The global burden of oral diseases and risks to oral health. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 83, n. 9, p. 661-669, sep. 2005.

PETROU, I. *et al.* A Breakthrough Therapy for Dentine Hipersensitivity: How Dental Products Containing 8% Arginine and Calcium Carbonate Work to Deliver Efficient Relief of Sensitive Teeth. **The Journal of Clinical Dentistry**, v. 20, n. 1, p. 23-31, 2009.

QUINTANA, S. M. C., *et al.* Microbiota of oral cavity ecosystems. **Rev Cubana Estomatol**, v. 54, n. 1, p. 84-99, 2017.

REYES, E. *et al.* Caries-free subjects have high levels of urease and arginine deiminase activity. **Journal of applied oral science**, v. 22, n. 3, p. 235-240, mar. 2014.

SAMPAIO, B., MONTEIRO, S. F. Acquisition and maturation of oral microbiome throughout childhood: An update. **Dent Res J**, v. 11, n. 3, p. 291-301, 2014.

SANTARPIA, R. P. *et al.* A 12-week clinical study assessing the clinical effects on plaque metabolism of a dentifrice containing 1.5% arginine, an insoluble calcium compound and 1,450 ppm fluoride. **Am. J. Dent**, v. 27, n. 2, p. 100-105, apr. 2014.

SHAW, D., NAIMI-AKBAR, A., ASTVALDSDOTTIR, A. The tribulations of toothpaste trials: Unethical arginine dentifrices research. **Br Dent J**, v. 219, n. 12, p. 567-569, 2015.

SOUZA, M. L. R. *et al.* Comparing the efficacy of a dentifrice containing 1.5% arginine and 1450ppm fluoride to a dentifrice containing 1450ppm fluoride alone in the management of primary root caries. **Journal of dentistry**, v. 41, p. S35-S41, apr. 2013.

SRISILAPANAN, P. *et al.* Comparison of the efficacy of a dentifrice containing 1.5% arginine and 1450ppm fluoride to a dentifrice containing 1450ppm fluoride alone in the management of early coronal caries as assessed using quantitative light-induced fluorescence. **Journal of Dentistry**, v. 41, p. S29-S34, 2013.

Ten CATE, J. M. Review on fluoride, with special emphasis on calcium fluoride mechanisms in caries prevention. **European Journal of Oral Science**, v. 105, p. 461-465, 1997.

TENUTA, L. M. A., CURY, J. Tratamento não restaurador da doença cárie dentária. In: MALTZ, M.; TENUTA, L. M. A.; GROISMAN, S.; CURY, J. A. **Cariologia: Conceitos básicos, Diagnóstico e Tratamento Não Restaurador**. Série ABENO: Odontologia Essencial: parte clínica. São Paulo, 2016. p. 92-103.

TENUTA, L. M. A.; CURY, J. A. Formação do biofilme dental cariogênico e o desenvolvimento de lesões de cárie. In: MALTZ, M.; TENUTA, L. M. A.; GROISMAN, S.; CURY, J. A. **Cariologia: Conceitos básicos, Diagnóstico e Tratamento Não Restaurador**. Série ABENO: Odontologia Essencial: parte clínica. São Paulo, 2016. p. 28-39. a

TENUTA, L. M. A.; CURY, J. A. Interações químicas entre o dente e os fluidos bucais. In: MALTZ, M.; TENUTA, L. M. A.; GROISMAN, S.; CURY, J. A. **Cariologia: Conceitos básicos, Diagnóstico e Tratamento Não Restaurador**. Série ABENO: Odontologia Essencial: parte clínica. São Paulo, 2016. p. 17-27. b

VANWUYCKHUYSE, B. C. *et al.* Association of free arginine and lysine concentrations in human parotid saliva with caries experience. **Journal of Dental Research**, v. 74, n. 2, p. 686-690, feb. 1995.

WOLFF, M. *et al.* *in vivo* effects of a new dentifrice containing 1,5 arginine and 1450 fluoride in plaque metabolism. **J Clin Dent**, v. 24, p. 45-54, 2013.

XU, X., *et al.* Oral cavity contains distinct niches with dynamic microbial communities. **Environ Microbiol**, v. 17, n. 3, p. 699-710, 2015.

XUE, Y. *et al.* Effect of toothpaste containing arginine on dental plaque – A randomized controlled *in situ* study. **Journal of Dentistry**, v. 67, p. 88-93, 2017.

YAMASHITA, J. M. *et al.* Role of arginine and fluoride in the prevention of eroded enamel: an *in vitro* model. *Australian Dental Journal*, v. 58, p. 478-482, 2013.

YILMAZ, P. *et al.* The SILVA and "All-species Living Tree Project (LTP) taxonomic frameworks. **Nucleic Acid Research**. Doi: 10.1093/nar/gkt1209, 2013.

YIN, W. *et al.* The anti-caries efficacy of a dentifrice containing 1.5% arginine and 1450 ppm fluoride as sodium monofluorophosphate assessed using quantitative light-induced fluorescence (QLF). **Journal of Dentistry**, v. 41, p. S22-S28, 2013.

ZAURA, E. *et al.* Defining the healthy "core microbiome" of oral microbial communities. **BMC Microbiol**, v. 9, p. 259, 2009.

ZHENG, X. *et al.* Ecological Effect of Arginine on Oral Microbiota. **Scientific Reports**, v. 7, n. 7206, ago. 2017.

APÊNDICE 1 - ORIENTAÇÕES AO VOLUNTÁRIO

É de extrema importância que você, voluntário nessa pesquisa, siga todos essas orientações para que não haja interferência em nossos resultados

1. Utilize apenas as pastas de dente designadas a você em cada fase do experimento
2. Não utilize qualquer agente químico auxiliar, como enxaguatórios bucais, durante a pesquisa
3. Caso necessite utilizar qualquer agente antimicrobiano (antibióticos, antifúngicos) durante as fases da pesquisa, favor informar a equipe responsável
4. Escovar os dentes com a escova de dente e pastas fornecidas 3 vezes ao dia (após o café da manhã, almoço e jantar). Após a escovação noturna, não comer nem beber, exceto água
5. Nos dias das coletas não escovar nem passar fio dental pela manhã e nem comer ou beber (exceto água) 2h antes da coleta



APÊNDICE 2 - FICHA DE ANAMNESE

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOQUÍMICA

FICHA DE ANAMNESE – AVALIAÇÃO IN VIVO DO EFEITO DE DENTIFRÍCIOS CONTENDO 1,5% DE ARGININA SOBRE A COMPOSIÇÃO DO MICROBIOMA DENTAL

Nome:

Data de Nascimento ___/___/___ R.G. _____ Data Exp. ___/___/___ Sexo: Masc.
 Fem.

Naturalidade: _____ Estado ___ Estado Civil _____ Profissão:

Endereço:

Bairro _____ Cidade _____ Estado _____ Telefone:

Nome da Mãe:

Em caso de emergência avisar: _____ Telefone:

ANAMNESE – HISTÓRIA MÉDICA

Questionário de Saúde:

Você ou alguém da sua família tem ou teve alguma destas doenças?

Hipertensão I Sim Não Asma Sim Não Distúrbios Sanguíneos Sim Não

Diabetes Sim Não Anemia Sim Não Doença Cardíaca Sim Não

Febre Reumática Sim Não Alergia Sim Não Convulsões Sim Não

Distúrbios Renais Sim Não Artrite Sim Não Distúrbios Hepáticos Sim Não

Tuberculose Sim Não Sinusite Sim Não D.S.T. Sim Não

Hepatite Sim Não Câncer Sim Não (AIDS, Sífilis, Blenorragia...)

Distúrbios de Ouvido, Nariz ou Garganta Sim Não Distúrbios Gastrointestinais Sim Não

Outros:

Está sob cuidados médicos? Sim Não Qual o motivo? _____ Há quanto tempo?

Faz uso de alguma medicação? Sim Não Qual? _____ Há quanto tempo?

Já fez alguma cirurgia? Sim Não Qual? _____ Há quanto tempo?

É alérgico a medicamentos? Sim Não Qual? _____

Já desmaiou alguma vez? Sim Não Qual o motivo? _____

Quando se corta, a ferida sangra muito ou demora para cicatrizar? Sim Não

Fumante? Há quanto tempo? _____ Quantos cigarros por dia? _____ Ex- fumante: Há quanto tempo? _____

Está grávida? Sim Não Há quanto tempo? Está amamentando? Sim Não Há quanto tempo?

HISTÓRIA ODONTOLÓGICA

Suas gengivas sangram com facilidade? Sim Não

Sente mau hálito? Sim Não

Já teve instrução de higiene oral? Sim Não

Já levou anestesia local? Sim Não Foi tudo bem? Sim Não

Já extraiu algum dente? Sim Não Foi tudo bem? Sim Não

Já fraturou algum osso no seu rosto? Sim Não

Já teve alguma dificuldade associada ao tratamento odontológico? Sim Não

Quando foi seu último tratamento odontológico? _____

EXAME INTRAORAL

Lábios Normal

Alterado _____

Bochechas Normal

Alterado _____

Vestíbulo Normal

Alterado _____

Retromolar Normal

Alterado

Palato Normal

Alterado _____

Língua Normal

Alterado

Assoalho Bucal Normal

Alterado _____

Orofaringe Normal

Alterado _____

Aparelho ortodôntico Sim Não

Utilização de próteses Sim Não

Anotações complementares

APÊNDICE 3 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nós, Profa. Dra. Elaine Machado Benelli, Dr. Eduardo Balsanelli, Profa. Dra. Geisla Mary Silva Soares e aluna da pós-graduação em Ciências - Bioquímica Leticia Ferreira Zanlorensi, da Universidade Federal do Paraná, estamos convidando você a participar de um estudo intitulado “AVALIAÇÃO *in vivo* DO EFEITO DE DENTIFRÍCIOS CONTENDO 1,5% DE ARGININA SOBRE A COMPOSIÇÃO DO MICROBIOMA DENTAL”, ou seja, esse estudo visa verificar o efeito de pastas de dente com arginina sobre o esmalte do dente e na placa dental.

- a) O objetivo da pesquisa é verificar o efeito da adição do aminoácido arginina em pastas de dente sobre as bactérias componentes da placa dental e o impacto das propagandas sobre o consumidor.
- b) Caso você participe da pesquisa, será necessário usar três tipos de pastas de dente diferentes. No primeiro dia será coletado saliva e placa dental, entrega da escova de dentes padrão e uma pasta de dente para ser utilizada 7 dias antes de começar a fase experimental. No início do primeiro período de 3 semanas, a pasta de dente referente a essa fase será entregue e uma nova coleta de saliva e placa dental será realizada. Ao final dessa fase, coleta de saliva e placa dental será realizada. Haverá um período de 7 dias entre as duas fases, em que se utilizará a pasta de dente entregue no início e, antes do início da última fase, será coletada saliva e placa dental. Na última fase de 3 semanas, outra pasta de dentes será entregue e deverá ser usada nessa fase que, ao final, acabará com uma nova coleta de saliva e placa dental. Ao final do último período de teste, haverá uma última semana em que se utilizará a pasta entregue no começo e a última coleta de saliva e placa dental ao final dessa semana. No total serão 9 semanas de experimento e 6 visitas agendadas para coleta.
- c) Para tanto você deverá comparecer no local agendado por e-mail para avaliação clínica. Depois disso, serão entregues a escova de dente e a primeira pasta a ser usada. As coletas de saliva e placa dental serão feitas no início e fim de cada fase da pesquisa, além da coleta inicial e final. Nos dias das coletas, você será orientado a não higienizar os dentes pela manhã e não comer nem beber 2 horas antes da coleta, a fim de coletar a placa formada durante a noite.

Participante da Pesquisa e/ou Responsável Legal _____

Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE _____

Orientador _____

Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Setor de Ciências da Saúde da UFPR (CEP/SD)

Rua: Padre Camargo, 285, térreo, Alto da Glória, Curitiba/PR, CEP 80060-240

cometica.saude@ufpr.br – telefone (041) 3360-7259

- d)** É possível que você sinta desconforto/constrangimento na hora da coleta de saliva, que deverá ser cuspidada dentro de um recipiente. O desconforto gerado pela falta de higienização será minimizado agendando-se a coleta no horário mais adequado a você.
- e)** O risco relacionado ao estudo pode ser o constrangimento durante a coleta de saliva. Assim, a coleta será realizada individualmente e o pesquisador utilizará luvas de procedimento e material esterilizado.
- f)** Os benefícios esperados com essa pesquisa serão verificar se a adição desse componente em pastas de dente traz benefício para a saúde bucal, embora nem sempre você seja diretamente beneficiado por sua participação nesse estudo.
- g)** Os pesquisadores responsáveis por esse estudo poderão ser localizados: Elaine Machado Benelli, professora do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR, no telefone (41) 33611653 ou pessoalmente no endereço: Av. Francisco H dos Santos, s/n – Jardim das Américas, Centro politécnico, Setor de Ciências Biológicas – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, terceiro andar, sala 315, Curitiba/PR, CEP: 81531-990; Eduardo Balsanelli, pós-doutorando do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR, no telefone (41) 995005304 ou pessoalmente no mesmo endereço, segundo andar, laboratório do anexo, Letícia Ferreira Zanlorensi, aluna da pós-graduação em Ciências - Bioquímica, no telefone (41) 992071322 ou pessoalmente no mesmo endereço, terceiro andar, laboratório 316 e Geisla Mary Silva Soares, professora do Departamento de Estomatologia da UFPR, no telefone (41) 3360-4000 ou pessoalmente no endereço: Avenida Prof. Lothario Meissner, 3400, Jardim Botânico, Curitiba/PR, CEP 80210-170, Setor de Ciências da Saúde – Departamento de Estomatologia, sala de periodontia, térreo, ou pelos e-mails: el.benelli@yahoo.com.br, balsanelli86@gmail.com, geisla.soares@ufpr.br e leticia.zanlorensi@gmail.com para esclarecimento de dúvidas e obtenção de informação em qualquer fase da pesquisa.
- h)** A sua participação nesse estudo é voluntária e se você não quiser mais fazer parte da pesquisa poderá desistir a qualquer momento e solicitar que lhe devolvam esse Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinado.
- i)** As informações relacionadas ao estudo poderão ser conhecidas por pessoas autorizadas, os pesquisadores acima citados. No entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isso será feito sob forma codificada, para que sua identidade seja preservada e mantida sua confidencialidade.
- j)** O material obtido (amostras de saliva e placa dental) será utilizado unicamente para essa pesquisa e será destruído/descartado ao término do estudo, dentro de 2 anos após publicado.

Participante da Pesquisa e/ou Responsável Legal _____

Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE _____

Orientador _____

Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Setor de Ciências da Saúde da UFPR (CEP/SD)

Rua: Padre Camargo, 285, térreo, Alto da Glória, Curitiba/PR, CEP 80060-240

cometica.saude@ufpr.br – telefone (041) 3360-7259

- k) As despesas necessárias para a realização da pesquisa não são de sua responsabilidade e você não receberá qualquer valor em dinheiro pela sua participação.
- l) Quando os resultados forem publicados não aparecerá seu nome, mas sim um código.
- m) Se você tiver dúvidas sobre seus direitos como participante de pesquisa, você pode contatar também o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP/SD) do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, pelo telefone 3360-7259.

Eu, _____ li esse Termo de Consentimento e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual concordei em participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios da pesquisa. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem qualquer prejuízo para mim.

Eu concordo voluntariamente em participar desse estudo

Curitiba, de de

(Assinatura do participante da pesquisa ou responsável legal)

(Assinatura do pesquisador responsável)

ANEXO 1 – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

UFPR - SETOR DE CIÊNCIAS
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO PARANÁ -



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Avaliação in vivo do efeito de dentífricos contendo 1,5% de arginina sobre a composição do microbioma dental

Pesquisador: Elaine Machado Benelli

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 68313017.3.0000.0102

Instituição Proponente: Universidade Federal do Paraná

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.534.403

Apresentação do Projeto:

O presente projeto é uma pesquisa vinculada ao programa de pós-graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, tendo como participantes Leticia Ferreira Zanlorensi E Eduardo Balsanelli sob orientação da. Profa. Dra. Elaine Machado Benelli, apresenta-se aprovação em plenária departamental e colegiado de pós-graduação.

O presente pesquisa apresenta-se descrita de forma clara, coesa e pautada na literatura atual. Trata-se de uma temática relevante para a cariologia. Caracteriza-se como um modelo experimental duplo cego consistirá em dois períodos de tratamento de 14 dias, envolvendo de 6 a 8 voluntários. Os voluntários utilizarão um dispositivo intra-oral palatino contendo blocos de esmalte bovino (4 a 8). Sobre os dispositivos intra-oralis será gotejado uma solução de 10% de sacarose, 8 vezes ao dia, como desafio cariogênico. Os voluntários escovarão os dentes e o dispositivo 3 vezes ao dia, segundo orientações de Botelho et al.

(2014). Após os dois períodos de tratamento (teste e controle), a microdureza superficial e subsuperficial do esmalte será avaliada, bem como a modificação do microbioma, por meio do sequenciamento do gene 16S rDNA. O dentífrico selecionado para a fase de teste será o Colgate Neutraçúcar (1450 ppm de flúor na forma de monofluorofosfato de sódio e arginina 1,5%; Colgate-Palmolive) e para a fase de controle será manipulado dentífrico contendo 1450 ppm de flúor na forma de monofluorofosfato de sódio.

Endereço: Rua Padre Camargo, 266 - Térreo

Bairro: Alto da Glória

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-7259

CEP: 80.060-340

E-mail: cometicos.saude@ufpr.br

UFPR - SETOR DE CIÊNCIAS
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO PARANÁ -



Continuação do Parecer: 2.534.403

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo deste estudo *in situ* e *in vivo* é verificar o efeito dos dentífricos contendo 1,5 % de arginina no processo de des/remineralização e as alterações do microbioma do biofilme.

Objetivos secundários: Avaliar a microdureza superficial e subsuperficial do esmalte dental bovino quando submetidos a desafios cariogênicos e avaliar a variação na microbiota bucal *in situ* e *in vivo* através de cultivo microbiológico, amplificação e do sequenciamento do gene marcador 16S rDNA.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo os pesquisadores: "Os riscos da metodologia são associados ao constrangimento dos indivíduos durante a coleta da saliva." O que será minimizado com a realização de coletas individualizadas e o pesquisador utilizará luvas descartáveis e material autoclavado para evitar contaminação.

Os benefícios esperados com essa pesquisa serão verificar se a adição desse componente em pastas de dente traz real benefício para a saúde bucal e se poderia substituir as pastas de dente que contêm flúor."

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de protocolo previamente aprovado. No momento a pesquisadora encaminha relatório parcial e emenda simultaneamente, aqui transcritos.

Emenda: "Mudança no cronograma de execução. Devido ao atraso na liberação da aprovação do projeto pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, que ocorreu em 07/2017, a coleta dos dentes foi prejudicada, visto que apenas diante da aprovação a coleta seria permitida. Com isso, houve atraso no preparo dos dentes para a fase experimental. Além disso, na UFPR existem dois aparelhos para medição da microdureza, necessário para a fase pré-experimental, porém ambos estão indisponíveis ou por falta de manutenção ou por falta de peça. Com isso tivemos que procurar opções e a Universidade Positivo nos disponibilizou o microdurômetro, porém, no momento, encontra-se em manutenção para troca de peça, sem prazo definido para a chegada da peça. Outras universidades foram contatadas para verificar a possibilidade de utilização do aparelho, além de outra metodologia ter sido proposta para avaliar perda/ganho mineral dos blocos de esmalte, sem sucesso. Com isso, decidimos modificar a metodologia e excluir a parte do estudo referente à fase *in situ* e continuar *in vivo*. Para tanto, a data de previsão para início seria 02/04 e término em 02/06.

2. Alterações de materiais e métodos. Desde a elaboração do projeto, novas estratégias e avaliações foram introduzidas, como as análises que serão feitas com a saliva coletada dos

Endereço: Rua Padre Camargo, 266 - Térreo

Bairro: Alto da Glória

CEP: 80.060-340

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3360-7259

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

UFPR - SETOR DE CIÊNCIAS
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO PARANÁ -



Continuação do Protocolo: 2.534.403

voluntários, que serão para verificar atividade enzimática (uréase, arginina desaminase e lactato desidrogenase), e o acréscimo de um período de washout ao final da última fase de teste. Além disso, as coletas de biofilme e saliva foram melhor estabelecidas e o tempo do experimento aumentou devido a troca do *in situ* pelo *in vivo*. Com isso, o estudo passou de 6 semanas para 9 semanas”.

Relatório parcial: “O projeto de pesquisa “AVALIAÇÃO *in vivo* DOS EFEITOS DE DENTIFRÍCIOS CONTENDO 1,5% DE ARGININA SOBRE A COMPOSIÇÃO DO MICROBIOMA DENTAL” ainda não se iniciou devido a dificuldades encontradas na metodologia proposta. Primeiramente, enfrentamos vários empecilhos quanto a manipulação dos dentes bovinos. Após a coleta, limpeza e corte dos blocos de esmalte, encontramos dificuldade para embutir e polir esses blocos. Após o polimento, cada bloco deveria ser analisado quanto sua microdureza e na UFPR existem dois microdurômetros, o da Engenharia Mecânica, que não possui a ponteira que nós precisamos, e o da Odontologia, que estava descalibrado e sem previsão de manutenção. Com isso, conseguimos que a Universidade Positivo nos emprestasse o microdurômetro e politriz, então em dezembro/2017 conseguimos fazer o polimento e análise inicial dos blocos de esmalte.

Nossa intenção era colocar de um lado do dispositivo intra-oral palatino blocos de esmalte hígidos, e do outro lado blocos de esmalte desmineralizados. Com isso, precisaríamos fazer uma solução de desmineralização *in vitro*, a qual deveria ser testada. O teste seria seguir o protocolo e desmineralizar 3 blocos de esmalte com posterior análise da microdureza para assegurar que a desmineralização foi efetiva. Porém, o microdurômetro da Universidade Positivo encontra-se em manutenção e reposição de peças, sem data prevista. Com isso, não haveria possibilidade de seguir com essa metodologia”.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos obrigatórios foram anexados, TCLE foi readequado para a metodologia.

Recomendações:

Não há

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há.

- É obrigatório retirar na secretaria do CEP/SD uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido com carimbo onde constará data de aprovação por este CEP/SD, sendo este modelo reproduzido para aplicar junto ao participante da pesquisa.

Endereço: Rua Padre Camargo, 285 - Térreo
Bairro: Alto da Glória
UF: PR Município: CURITIBA
Telefone: (41)3363-7250

CEP: 80.060-240

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

UFPR - SETOR DE CIÊNCIAS
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO PARANÁ -



Continuação do Parecer: 2.534.409

O TCLE deverá conter duas vias, uma ficará com o pesquisador e uma cópia ficará com o participante da pesquisa (Carta Circular nº. 003/2011-CONEP/CNS).

Favor agendar a retirada do TCLE pelo telefone 41-3360-7259 ou por e-mail cometica.saude@ufpr.br, necessário informar o CAAE.

Considerações Finais a critério do CEP:

Solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios semestrais e final, sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos, através da Plataforma Brasil - no modo: NOTIFICAÇÃO. Demais alterações e prorrogação de prazo devem ser enviadas no modo EMENDA. Lembrando que o cronograma de execução da pesquisa deve ser atualizado no sistema Plataforma Brasil antes de enviar solicitação de prorrogação de prazo.

Emenda – ver modelo de carta em nossa página: www.cometica.ufpr.br (obrigatório envio)

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_108139_3_E2.pdf	01/03/2018 16:18:25		Aceito
Outros	relatorioparcial.pdf	01/03/2018 16:16:15	LETÍCIA FERREIRA ZANLORENSI	Aceito
Outros	emendaaprotocolo.pdf	01/03/2018 16:15:50	LETÍCIA FERREIRA ZANLORENSI	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_novo.docx	01/03/2018 16:15:28	LETÍCIA FERREIRA ZANLORENSI	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto_nova.pdf	01/03/2018 16:15:09	LETÍCIA FERREIRA ZANLORENSI	Aceito
Outros	declaracao_de_responsabilidade.pdf	07/07/2017 15:48:09	LETÍCIA FERREIRA ZANLORENSI	Aceito
Outros	Extrato_ata_odontologia.pdf	07/07/2017 10:54:13	LETÍCIA FERREIRA ZANLORENSI	Aceito
Outros	declaracao_de_uso_especifico_de_material.pdf	07/07/2017 10:52:31	LETÍCIA FERREIRA ZANLORENSI	Aceito
Outros	termo_de_compromisso.pdf	07/07/2017	LETÍCIA FERREIRA	Aceito

Endereço: Rua Padre Camargo, 388 - Térreo
Bairro: Alto da Glória
UF: PR Município: CURITIBA

CEP: 80.060-340

Telefone: (41)3360-7259

E-mail: cometica.saude@ufpr.br

UFPR - SETOR DE CIÊNCIAS
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO PARANÁ -



Continuação do Parecer: 2.534-403

Outros	termo_de_compromisso.pdf	10:51:56	ZANLORENSI	Aceito
Outros	termo_de_confidencialidade.pdf	07/07/2017 10:51:24	LETICIA FERREIRA ZANLORENSI	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_DETALHADO_comigido.docx	07/07/2017 09:15:35	LETICIA FERREIRA ZANLORENSI	Aceito
Outros	carta_ao_relator.pdf	07/07/2017 09:14:44	LETICIA FERREIRA ZANLORENSI	Aceito
Outros	termo_de_guarda_de_material_biologico.pdf	14/05/2017 14:35:44	LETICIA FERREIRA ZANLORENSI	Aceito
Outros	oficio.pdf	14/05/2017 14:34:26	LETICIA FERREIRA ZANLORENSI	Aceito
Outros	declaracao_de_tomar_publico_os_resultados.pdf	14/05/2017 14:33:35	LETICIA FERREIRA ZANLORENSI	Aceito
Outros	concordancia_dos_servicos_envolvidos.pdf	14/05/2017 14:32:52	LETICIA FERREIRA ZANLORENSI	Aceito
Outros	checklist.pdf	14/05/2017 14:32:19	LETICIA FERREIRA ZANLORENSI	Aceito
Outros	ata_pos_graduacao.pdf	14/05/2017 14:31:56	LETICIA FERREIRA ZANLORENSI	Aceito
Outros	ata_departamento.pdf	14/05/2017 14:31:36	LETICIA FERREIRA ZANLORENSI	Aceito
Outros	analise_de_merito.pdf	14/05/2017 14:30:35	LETICIA FERREIRA ZANLORENSI	Aceito
Outros	Notificacaopesquisador.pdf	09/05/2017 10:55:25	Glise Elisângela da Silva de Souza	Aceito
Outros	SolicitacaoPesquisadomesponsavel.pdf	09/05/2017 10:55:25	Glise Elisângela da Silva de Souza	Aceito
Outros	solicitacao_de_alteracao_de_pesquisador_responsavel.pdf	09/05/2017 10:37:30	LETICIA FERREIRA ZANLORENSI	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CURITIBA, 09 de Março de 2018

Assinado por:
IDA CRISTINA GUBERT
(Coordenador)

Endereço: Rua Padre Camargo, 285 - Térreo

Bairro: Alto da Glória

CEP: 80.060-240

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefones: (41)3360-7259

E-mail: cometica.saude@ufpr.br