



LIVIA HELENA TERRA E SOUZA

**EFEITO DO INTERVALO DE TEMPO ENTRE AS EXPOSIÇÕES À
SACAROSE NA DESMINERALIZAÇÃO DO ESMALTE E NA
COMPOSIÇÃO DO BIOFILME DENTAL**

**PIRACICABA
2012**



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

LIVIA HELENA TERRA E SOUZA

**EFEITO DO INTERVALO DE TEMPO ENTRE AS EXPOSIÇÕES À
SACAROSE NA DESMINERALIZAÇÃO DO ESMALTE E NA
COMPOSIÇÃO DO BIOFILME DENTAL**

Orientador: Prof. Dr. Jaime Aparecido Cury

Co-Orientadora: Profa. Dra. Livia Maria Andaló Tenuta

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA À
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA
UNICAMP PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRA
EM ODONTOLOGIA, NA ÁREA DE CARIOLOGIA

**Este exemplar corresponde à versão final
da Dissertação defendida pelo aluno,
e orientada pelo Prof. Dr. Jaime Aparecido Cury**

Assinatura do Orientador

PIRACICABA, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
JOSIDELMA F COSTA DE SOUZA – CRB8/5894 - BIBLIOTECA DA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNICAMP

So89e Souza, Livia Helena Terra e, 1986-
Efeito do intervalo de tempo entre as exposições à sacarose na desmineralização do esmalte e na composição do biofilme dental / Livia Helena Terra e Souza. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2012.

Orientador: Jaime Aparecido Cury.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Esmalte dentário. 2. Desmineralização do dente. I. Cury, Jaime Aparecido, 1947- II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para a Biblioteca Digital

Título em Inglês: Interval of Sucrose Exposure, Biofilm Composition and Enamel Demineralization

Palavras-chave em Inglês:

Dental enamel

Tooth demineralization

Área de concentração: Cariologia

Titulação: Mestra em Odontologia

Banca examinadora:

Jaime Aparecido Cury [Orientador]

Livia Maria Andaló Tenuta

Cecilia Pedroso Turssi

Carolina Patrícia Aires

Data da defesa: 05-12-2012

Programa de Pós-Graduação: Odontologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 05 de Dezembro de 2012, considerou a candidata LÍVIA HELENA TERRA E SOUZA aprovada.

Livia M. A. Tenuta

Profa. Dra. LÍVIA MARIA ANDALÓ TENUTA

Cecilia Pedroso Turssi

Profa. Dra. CECILIA PEDROSO TURSSI

Carolina Patrícia Aires

Profa. Dra. CAROLINA PATRÍCIA AIRES

À minha família alicerce do meu existir.

Ao Gustavo pelo amor, presença incondicional e companheirismo durante todos estes anos.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço a **Deus**, a **Jesus**, aos **espíritos protetores** que sempre me acompanham e me orientam nos momentos de dúvida, angústia dando-me suporte espiritual e paz nos momentos difíceis. Obrigada pela oportunidade de realizar mais este trabalho.

Aos meus pais, **Lucas Souza e Olívia Terra Gomes e Souza**, a quem devo esta oportunidade maravilhosa de estar na Terra e por sempre me orientarem nesta jornada de melhoramento do espírito. Agradeço a educação que me foi dada e todas as oportunidades que me foram proporcionadas. Enfim, a todo amor recebido. Obrigada por sempre acreditarem em mim e por tornarem meus sonhos realidade.

À minha irmã, **Lidiege** pela serenidade e paz transmitida a mim sempre. Pelo amor e carinho dados ensinando-me e reforçando o significado da palavra irmandade.

Ao meu amor, **Gustavo** pela inspiração, pela força, pelo carinho, pela companhia por todos os momentos inesquecíveis proporcionados. O meu companheiro de jornada eterna.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador, **Prof. Dr Jaime Aparecido Cury** agradeço pela oportunidade de formação em mais esta etapa da minha vida acadêmica, pelas diretrizes durante todo o planejamento e execução do trabalho. Sem o seu conhecimento, competência e disponibilidade este trabalho não seria o mesmo.

A minha co-orientadora, **Profa. Dra. Livia Maria Andaló Tenuta** pela dedicação e competência durante todo esse tempo.

AGRADECIMENTOS

Ao Magnífico Reitor da Universidade Estadual de Campinas, **Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa**.

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

À **Profa. Dra. Renata Cunha Matheus Rodrigues Garcia**, Coordenadora Geral da Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas.

À **Profa. Dra. Cíntia Pereira Machado Tabchoury**, Coordenadora do Programa de Pós- Graduação em Odontologia da FOP-UNICAMP, pela contribuição durante o curso de mestrado.

Às **Profas. Dras. Marinês Nobre dos Santos Uchôa e Cíntia Pereira Machado Tabchoury** pelas sugestões e contribuições na fase de pré-qualificação.

Aos **Profs. Drs. Pedro Rosalen, Cíntia Pereira Machado Tabchoury e Wander José da Silva** pelas considerações e contribuições realizadas no exame de qualificação.

À Profa **Dra Altair A. Del Bel Cury** por sua dedicação durante a pesquisa.

Ao **Prof. Dr. Wander José da Silva** pela coordenação e colaboração na análise microbiológica dessa pesquisa.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Odontologia pelo constante aprendizado.

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

À Sta. Tamires Munerato, estagiária do Laboratório de Bioquímica da FOP-UNICAMP e à Juliana Nunes Botelho, aluna de doutorado do PG-Odontologia (área de Cariologia) da FOP-UNICAMP, pela análise dos polissacarídeos dessa pesquisa.

À técnica do laboratório de Prótese Parcial Removível da FOP-UNICAMP, **Gislaine Regiane Alves Pittom** pela prontidão em ajudar, eficiência e solicitude.

Às funcionárias da Pós-Graduação **Érica Sinhoretti** e **Raquel Marcondes**, por todas as orientações e atenção.

Às amigas e colegas de pós-graduação **Amanda Falcão**, **Althea Ratti**, **Karla Cook**, **Nádia Masson**, **Ana Flávia Bissoto** e **Renata Cerezetti** pelas discussões científicas, pelos ensinamentos, pela companhia e experiências compartilhadas.

Aos amigos e colegas de pós-graduação, **Sandro Kussano** e **Danilo Catani** pelos ensinamentos e pela amizade construída.

Aos voluntários que participaram desta pesquisa pela cooperação, dedicação e amizade.

À **FAPESP**, pela concessão da bolsa de mestrado (processo 2009/12.092-1) sem a qual a realização desse trabalho não seria possível.

O grande homem

Mantém o seu modo de pensar independentemente da opinião pública.
É tranqüilo, calmo, paciente, não grita e nem se desespera.
Pensa com clareza, fala com inteligência, vive com simplicidade.
É do futuro, e não é do passado.
Sempre tem tempo.
Não despreza nenhum ser humano.
Causa a impressão dos vastos silêncios da natureza: o Céu.
Não é vaidoso.
Como não anda à cata de aplausos, jamais se ofende.
Possui sempre mais do que julga merecer.
Está sempre disposto a aprender, mesmo das crianças.
Vive dentro do seu próprio isolamento espiritual, aonde não chega nem o louvor nem a censura.
Não obstante, seu isolamento não é frio: Ama, Sofre, Pensa, Compreende.
O que você possui: dinheiro, posição social, nada significa para ele.
Só lhe importa o que você é.
Despreza a opinião própria, tão depressa verifica o seu erro.
Não respeita usos estabelecidos e venerados por espíritos tacanhos.
Respeita somente a Verdade.
Tem a mente de homem e coração de menino.
Conhece-se a si mesmo, tal qual é, e conhece a Deus.

Celso Charuri

RESUMO

A sacarose é considerada o mais cariogênico dos carboidratos da dieta e o efeito dos intervalos de tempo entre as exposições diárias deve ser considerado, porém faltam estudos experimentais em humanos para comprovar sua importância, sendo este o objetivo deste estudo. Assim, foi conduzido um estudo *in situ*, cego em relação ao examinador, e cruzado em quatro fases e o fator em estudo foi o intervalo entre as exposições à sacarose a 20% usada na frequência de 8x/dia. Os grupos experimentais testados incluíam nenhuma solução (controle) e os intervalos de 15, 45 e 90 minutos entre as exposições à sacarose. Quinze voluntários adultos usaram um dispositivo palatino de acrílico contendo quatro blocos de esmalte dental humano, com dureza de superfície pré-determinada e os tratamentos com sacarose foram feitos extra-bucalmente. Uma semana antes do início e durante todo o experimento os voluntários usaram dentífrício não fluoretado. Na manhã do 15º dia de cada fase o biofilme formado sobre dois blocos foi coletado para a análise microbiológica e de polissacarídeos e aquele formado sobre os outros dois blocos para análise inorgânica do biofilme quanto as concentrações de Ca, P_i e F no fluido e parte sólida do biofilme. A dosagem de Ca e P_i no fluido e porção sólida do biofilme foi realizada utilizando reagentes colorimétricos. Para a dosagem de F no fluido e porção sólida do biofilme, foi utilizado um eletrodo específico para o íon, adaptado para microanálise. Na análise microbiológica foram analisados os microrganismos totais, estreptococos do grupo mutans, *Actinomyces viscosus* e lactobacilos. As unidades formadoras de colônias (UFC) foram contadas e os resultados expressos como UFC/mg de peso úmido do biofilme dental. Os polissacarídeos extraídos foram dosados por método colorimétrico. Após a coleta do biofilme, os blocos de esmalte foram removidos dos dispositivos e foi determinada sua a desmineralização por meio da dureza de superfície e do esmalte seccionado. Foi utilizada análise de variância para o efeito dos tratamentos e teste de Tukey, quando o efeito foi significativo, para comparação entre os grupos. Os resultados mostraram que houve uma perda de dureza maior nos grupos de intervalo de 45 e 90 minutos quando comparados com os grupos de intervalo de 15 e controle. Entretanto, para as concentrações de F, Ca e P_i na parte sólida do biofilme dental não houve diferença, mas no fluido houve para maior concentração de Ca no intervalo de 90 minutos. Houve um aumento gradativo na concentração de

polissacarídeos extra e intracelulares quanto maior o intervalo. Já para as contagens de microrganismos, em relação a lactobacilos houve diferença entre o grupo controle e os grupos de intervalo testados, mas estes não se diferenciaram entre si. Para os microrganismos totais, estreptococos do grupo mutans e *Actinomyces viscosus* não houve diferença entre os grupos. Conclui-se que o intervalo de tempo entre as exposições diárias à sacarose deve ser considerado nas orientações dietéticas, pois intervalo mais longo mudou a composição do biofilme dental formado e provocou maior desmineralização do esmalte.

Palavras-chave: Sacarose; Biofilme dentário; Desmineralização do dente; Esmalte dentário;

ABSTRACT

Sucrose is considered the most carcinogenic carbohydrate of the diet and the effect of the interval of the exposure frequencies must be considered, however there is a lack of experimental studies in humans in order to prove its importance, which is the main objective of this study. Therefore, an *in situ* study was performed, blind in relation to the examiner, and crossover in four phases. The studied factor was the interval between the exposures to 20% sucrose used at a frequency of 8x/day. The experimental groups included no solution of exposure (control), and intervals of 15, 45, 90 minutes among the exposures to sucrose. Fifteen adult volunteers used an acrylic palatal appliance containing four blocks of human enamel, with pre-established surface hardness. The sucrose treatments were made extra-orally. The volunteers used non fluoride toothpaste a week before and during the experimental phases. In the morning of the 15th day of each phase, the biofilm formed on the blocks was collected and weighed. The biofilms formed over 2 blocks, anterior left and posterior right of the appliance were collected for microbiological and polysaccharide analyses. The biofilm from the other two blocks was collected for the inorganic analysis of the concentrations of Ca, P_i and F in the fluid and the solid parts of the biofilm. The determination of Ca and P_i in the fluid and solids of the biofilm was conducted using colorimetric reagents. For the determination of F in the fluid and solids of the biofilm, an inverted F electrode, adapted for microanalysis, was used. Total microorganisms, mutans streptococci, *Actinomyces viscosus* and lactobacillus were analyzed. The colony forming units (UFCs) were counted and the results expressed as UFC/ mg of wet weight of the dental biofilm. The polysaccharides extracted were determined by a colorimetric method. After biofilm extraction, the enamel blocks were removed from the appliances and their demineralization was determined by means of the surface and cross-sectional hardness. Analysis of variance was used for the effect of the treatments, and the Tukey test was used, when the effect was significant, for comparing the groups. The results showed that there was greater loss of hardness in the 45 and 90 minute intervals. However, there was no difference in the concentrations of F, Ca and P_i in the solid part of the biofilm, but in the fluid, a higher concentration of Ca was found in the 90 minute interval. There was a gradual

increase in the concentration of intra and extracellular polysaccharides the longer the interval. As for the microorganism counting, relating to lactobacillus, difference was found between the control group and the interval groups tested, but these did not differ among each other. There was no difference between groups referring to mutans streptococci and *Actinomyces viscosus*. It is concluded that the interval of time between the same daily frequencies of exposure to sucrose must be considered in dietetic orientations, since longer intervals change the composition of the dental biofilm formed, causing higher enamel demineralization.

Key-words: Sucrose: Plaque plaque: Tooth demineralization: Dental enamel

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

®	Marca Registrada
EM	Estreptococos do Grupo Mutans
PIC	Polissacarídeo Intracelular
PECS	Polissacarídeo Extracelular Solúvel
PECI	Polissacarídeo Extracelular Insolúvel
GTFs	Glucosiltransferase
FTF	Frutosiltransferase
PDS	Perda da Microdureza Superficial
Ca	Cálcio
F	Flúor
P _i	Fosfato inorgânico
NaF	Fluoreto de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
µg	Micrograma
Ppm	Partes Por Milhão
Mg	Miligrama
mEq/L	Mol equivalente por litro
µg F/mL	Micrograma de Flúor por Mililitro
TISAB	<i>Total Ionic Strength Adjustor Buffer</i> (Tampão De Ajuste De Força Iônica e pH)
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Médias, desvios padrão e n da concentração de íon flúor (F), cálcio (Ca) e fósforo (Pi) no fluido do biofilme dental de acordo com os grupos de tratamentos.	39
TABELA 2	Médias, desvios padrão e n da concentração do íon flúor (F), cálcio (Ca) e fósforo (Pi) na parte sólida do biofilme dental de acordo com os grupos de tratamentos.	40
TABELA 3	Médias, desvios padrão e n da concentração de polissacarídeos (mg/g) em função dos grupos de intervalos de tempo testados entre as exposições à sacarose e para o grupo controle.	41
TABELA 4	Médias, desvios padrão e n da contagem (UFC/mg de peso úmido de biofilme) de microrganismos totais, estreptococos do grupo mutans, lactobacilos e <i>Actinomyces viscosus</i> em função dos grupos de tratamentos testados.	42
TABELA 5	Médias, desvios padrão e n da porcentagem de perda de dureza de superfície (% PDS) e área da perda de dureza do esmalte (ΔS) em função dos grupos de tratamentos testados.	43

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** Fluxograma do experimento. **27**
- FIGURA 2** Esquema de corte, polimento e análise de microdureza inicial de superfície para seleção dos blocos de esmalte. **29**
- FIGURA 3** Diagrama de um corpo de prova mostrando como foi seccionado o bloco dental (I), e as impressões realizadas no bloco (II) e suas disposições (III). **37**

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISTA DA LITERATURA	4
2.1 Cárie	4
2.2 Biofilme	6
2.2.1 Íons do Biofilme	8
2.2.2 Íons no Fluido do Biofilme	8
2.3 pH e a cárie dentária	11
2.4 Sacarose	13
2.4.1 Fatores Relacionados à Cariogenicidade da Sacarose	15
2.4.2 Produção de polissacarídeos	15
2.4.3 Concentração de sacarose	17
2.4.4 Frequência de exposição à sacarose	18
2.4.5 Intervalo de tempo entre as exposições à sacarose	22
3. PROPOSIÇÃO	25
4. MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 Delineamento Experimental	26
4.2 Preparo dos Blocos Dentais	27
4.3 Fase Clínica	30
4.4 Confeção dos Dispositivos Intrabucais	30
4.5 Utilização do Dispositivo Intrabucal	31
4.6 Coletas do Biofilme Dental	31
4.7 Análise Microbiológica e de Polissacarídeos	32
4.8 Análise da Composição Inorgânica do Biofilme	33
4.8.1 Coleta do Biofilme	33
4.8.2 Extração do Fluido do Biofilme	34
4.8.3 Extração de cálcio e fósforo inorgânico da parte sólida do Biofilme	34
4.8.4 Dosagem cálcio e fósforo inorgânico no fluido e parte sólida do biofilme	34
4.8.5 Dosagem do íon flúor no fluido e parte sólida do biofilme	35
4.9 Determinação da Desmineralização	35
4.9.1 Análise da Dureza de Superfície do Esmalte	35
4.9.2 Análise da Área de Perda de Dureza do Esmalte	36
4.10 Análise Estatística	37
5. RESULTADOS	39
6. DISCUSSÃO	44
7. CONCLUSÃO	48
REFERÊNCIAS	49
Anexo 1 – Parecer de aprovação do comitê de ética em pesquisa	56
Anexo 2 – Termo de consentimento livre e esclarecido	57
Anexo 3 – Instruções aos voluntários	59

1. INTRODUÇÃO

A cárie dental é uma doença multifatorial e biofilme-açúcar dependente, sendo que o acúmulo de biofilme dental e a exposição a açúcares são considerados, respectivamente, fatores necessários e determinantes para a manifestação da doença (Fejerskov & Manji, 1990). Entre os fatores relacionados à etiologia da cárie dentária, os carboidratos da dieta desempenham um papel importante no seu desenvolvimento (Gustafsson *et al.*, 1954; Bowen, 2002; Zero, 2004). A incorporação de carboidratos fermentáveis como a sacarose à dieta provocou um aumento na experiência de cárie (Rugg - Gunn & Murray, 1983) de humanos. Entre estes carboidratos, a sacarose é considerada o açúcar mais comum presente na dieta moderna (Zero *et al.*, 2004) e seu papel no desenvolvimento da desmineralização do esmalte tem sido demonstrado (Cury *et al.*, 2000).

A fermentação de carboidrato pelas bactérias no biofilme dental provoca queda de pH (Bradshaw & Marsh, 1998), o que altera o equilíbrio da microbiota no biofilme dental. Em 1998, Bradshaw & Marsh demonstraram que sucessivas quedas de pH *in vitro* promoveram alteração na microbiota. Em condições de elevada acidez, existe maior prevalência das bactérias acidúricas, enquanto que nas condições de neutralidade de pH, as bactérias com potencial de indução à cárie dental, estão presentes, porém em menor proporção quando comparadas à comunidade microbiana total. Uma maior concentração da microbiota total em relação às bactérias com potencial de indução à cárie torna os processos de desmineralização e remineralização dental equilibrado (Marsh, 2003). O aumento na disponibilidade de carboidratos fermentáveis faz o biofilme permanecer por mais tempo sob baixo pH (Bradshaw *et al.*, 1989). Assim, ocorre a inibição do crescimento de espécies ácido-sensíveis e a seleção de espécies acidúricas, como o estreptococos do grupo mutans e de lactobacilos (Fejerskov, 1997). A queda do pH do biofilme dental o torna subsaturado em relação ao esmalte dental, aumentando a solubilidade do mesmo (Larsen, 1990).

Além de promover a queda do pH no biofilme tanto quanto seus monossacarídeos constituintes glicose e frutose, a sacarose também é substrato para a síntese de polissacarídeos extracelulares insolúveis (Newbrum, 1967) que compõem a

matriz do biofilme. Esses polissacarídeos são sintetizados pela ação enzimática de glucosiltransferases produzidas por estreptococos do grupo mutans que hidrolisam as moléculas de sacarose e polimerizam moléculas de glicose, formando glucanos insolúveis com ligação α (1 \rightarrow 3) (Rölla, 1989). Três tipos de glucosiltransferases são produzidos pelos estreptococos do grupo mutans (Kuramitsu, 2003): gtfB, que sintetiza polissacarídeos extracelulares insolúveis, gtfC, que sintetiza polissacarídeos solúveis e insolúveis e gtfD, que sintetiza polissacarídeos e extracelulares solúveis (Wenham Hennessey e Cole, 1979; Hamada & Slade, 1980 e Bowen, 2002).

Os polissacarídeos insolúveis promovem a aderência dos estreptococos do grupo mutans à superfície dental (Rölla, 1989), resultando num maior acúmulo de biofilme (Carlsson e Egelberg, 1965). Além de causar a aderência microbiana à superfície dental, os polissacarídeos modificam estruturalmente o biofilme dental, tornando-o mais poroso e facilitando a difusão de substratos ácidos para a superfície dental (Dibdin & Shellis, 1988). Aires *et al.* (2006) demonstraram que o aumento da concentração de sacarose também promove maior concentração de PEC, menor concentração inorgânica e maior perda mineral do esmalte. Cury *et al.* (2000), Tenuta *et al.* (2006), Vale *et al.* (2007) e encontraram que a sacarose difere estatisticamente da glicose+frutose quanto à desmineralização do esmalte e PEC, mas não quanto a F, Ca e P_i. A composição bioquímica do biofilme formado após 28 dias *in situ* na presença de sacarose e de seus monossacarídeos constituintes, glicose e frutose, os quais são fermentáveis, porém não atuam como substrato para a síntese de PEC, demonstrado por Cury *et al.* (2000) em relação ao controle um aumento significativo na concentração de polissacarídeos insolúveis no grupo sacarose.

Embora a sacarose tenha maior poder cariogênico que outros açúcares da dieta, sua cariogenicidade depende de alguns fatores como frequência de uso e concentração. Quanto ao tempo de formação do biofilme, tem sido mostrado que alterações na composição bioquímica e microbiológica do biofilme ocorrem após 3 dias, precedendo a desmineralização do esmalte (Vale *et al.*, 2007). Com relação à concentração, a partir de 5% a sacarose muda a composição do biofilme e provoca lesões de cárie no esmalte (Aires

et al., 2006). Em termos da frequência de uso de sacarose 2x/dia altera a composição do biofilme (Ccahuana-Vásquez *et al.*, 2007).

Entretanto, além da concentração e frequência de uso de sacarose, os intervalos de exposição à sacarose também devem ser considerados para a cariogenicidade. O estudo de Bowen *et al.* (1983) com animais de laboratório mostrou que ratos submetidos a 17 exposições diárias de sacarose com intervalos de 10 e 20 minutos apresentaram 50% menos lesões cariosas do que aqueles sujeitos a mesma frequência, porém com intervalos de 40 e 60 minutos.

Tendo em vista que o poder cariogênico da sacarose com relação ao intervalo de tempo de frequência, ainda não foi estabelecido em humanos o objetivo do presente estudo foi avaliar *in situ* a importância do intervalo de tempo entre as exposições à sacarose na composição do biofilme dental formado e na desmineralização do esmalte.

2. REVISTA DA LITERATURA

Essa revista da literatura foi dividida em tópicos e não teve como objetivo esgotar o assunto do ponto de vista cronológico, mas sim descrever os artigos mais relevantes para o melhor entendimento sobre o assunto dessa dissertação.

2.1 Cárie

2.2 Biofilme

2.2.1 Íons do Biofilme

2.2.2 Íons no Fluido do Biofilme

2.3 pH e a cárie dentária

2.4 Sacarose

2.4.1 Fatores Relacionados à Cariogenicidade da Sacarose

2.4.2 Produção de polissacarídeos

2.4.3 Frequência de exposição à sacarose

2.4.4 Concentração de sacarose

2.4.5 Intervalo de exposição à sacarose

2.1 Cárie

A cárie dentária apresenta ainda uma alta prevalência, sendo considerado um problema de saúde pública (Tagliaferro *et al.*, 2008). Nas últimas três décadas, observou-se declínio na prevalência da doença em nível mundial. Porém, essa diminuição é bastante heterogênea. Apesar dos avanços relacionados à prevenção da doença cárie, persiste um quadro de polarização na distribuição da doença. Esse quadro deve-se pelas precárias condições de vida a que é submetida grande parcela da população, configurando um perfil de estratificação social (Noro *et al.*, 2009). Cerca de 70% dos países do mundo atingiram a meta estabelecida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para o ano 2000: índice de dentes permanentes obturados, perdidos e cariados (CPOD) menor ou igual a 3 aos 12 anos de idade (Nishi *et al.*, 2002). No Brasil, destacam-se os últimos levantamentos de saúde

bucal que mostraram uma queda de aproximadamente 20% na prevalência de cárie dentária em crianças de 12 anos de idade (Brasil, 2010).

Embora tenha havido um decréscimo na cárie dental, inclusive no Brasil, grupos de crianças continuam apresentando alta atividade da doença (Hausen, 1997 e Hausen *et al.*, 2000). Dye *et al.* (2007) apresentaram um acompanhamento transversal com análise das tendências para algumas variáveis de medidas do estado de saúde bucal em pessoas com idade entre 2 anos e 60 anos, classificados por status sócio-demográficos e hábitos como fumar, no período do final dos anos 1980 nos Estados Unidos. Dados da Saúde Nacional e do terceiro Nutrition Examination Survey (NHANES III), 1988-1994 e do NHANES 1999-2004 foram usados. Essas fontes de dados foram projetadas para fornecer informações sobre a saúde e o estado nutricional da população civil não institucionalizada nos Estados Unidos. Informações coletadas a partir do exame de saúde bucal feitos em ambos os períodos de pesquisa foram utilizados para apresentar as estimativas de prevalência e de análises de tendências. As variáveis consideradas neste trabalho foram: cárie dentária, selantes dentais, trauma incisal, saúde periodontal, visitas ao dentista, a percepção do estado de saúde bucal, a retenção de dente e o edentulismo. Concluíram que para a maioria dos americanos, o estado de saúde bucal melhorou desde 1988-1994. A cárie dentária diminuiu na dentição permanente para os jovens, adolescentes e nos adultos. Entre os idosos, a prevalência de cárie radicular diminuiu, mas não houve mudança na prevalência de cárie coronal. No entanto, a prevalência de cárie dentária na dentição decídua para jovens com idade entre 2-5 anos aumentou de 1988-1994 para 1999-2004. Caracterizando desta forma a cárie como uma das doenças bucais relacionadas com o biofilme dental que continuam a afetar a maioria da população mundial.

A cárie dentária é uma doença de carácter multifatorial, cuja manifestação clínica é um processo patológico que ocorre na superfície do dente por meses ou anos, a partir da interação entre bactérias bucais e constituintes da dieta, com a superfície dental (Bowen, 2002). Uma dieta rica em carboidratos modifica as proporções de microrganismos acidogênicos e acidúricos que causa aumento de quedas de pH e do potencial cariogênico (Van Houte, 1994). Esses microrganismos aderidos formam um biofilme patogênico levando a perda de minerais do esmalte (Marsh, 1994). O desequilíbrio entre os processos

de desmineralização e remineralização no esmalte leva ao desenvolvimento da cárie (Clarkson e McLoughlin, 2000).

2.2 Biofilme

O biofilme é definido com uma comunidade microbiana ligada a uma superfície, o qual é espacialmente organizado em uma estrutura tridimensional e incluído em uma matriz de material extracelular derivada do metabolismo das células e do meio ambiente (Marsh, 2004). Como já mencionado a cárie dental é uma doença biofilme açúcar dependente e a presença de carboidratos fermentáveis provenientes da dieta são fatores chave envolvidos na sua iniciação e progressão. O acúmulo deste biofilme é um fator necessário e a exposição a açúcares é um fator determinante para a manifestação da cárie (Fejerskov & Manji, 1990).

As bactérias do biofilme, através da fermentação de carboidratos, aumentam a concentração de lactato (Bradshaw *et al.*, 1989) nesse ambiente, reduzindo, assim, o pH do meio (Bradshaw & Marsh, 1998). Segundo Marsh (2004), a queda de pH altera a homeostasia microbiana do biofilme dental, podendo promover seleção microbiana, fato observado por Marsh (1991), sugerindo que frente ao estresse provocado pela queda do pH no biofilme dental há seleção de espécies de microrganismos com maior habilidade em responder às alterações nas condições ambientais.

Bradshaw & Marsh (1998) demonstraram que quando da ausência de repetidas quedas de pH, as bactérias com potencial de indução de cárie dental estão presentes no biofilme dental, porém, em proporções muito menores quando comparadas à comunidade microbiana total presente naquele ambiente, o que permite que os processos de desmineralização e remineralização dentais estejam em equilíbrio. Entretanto, quando há um aumento na disponibilidade de carboidratos fermentáveis, o biofilme permanece mais tempo sob pH baixo. Nessa situação, ocorre inibição do crescimento de espécies ácido-sensíveis e seleção de espécies acidúricas, como estreptococos do grupo mutans e lactobacilos. Essa redução no pH do biofilme dental o torna subsaturado em relação ao esmalte dental, aumentando a solubilidade do mesmo e alteração na microbiota.

No estudo de Tenuta *et al.* (2003) foram avaliados a composição do biofilme dentário na progressão de cárie e o efeito de alguns fatores salivares. Desta forma, foi realizado um estudo *in situ*, cruzado, no qual foram determinados o fluxo salivar, a capacidade tampão e os níveis de estreptococos do grupo mutans na saliva de 13 voluntários. Durante três períodos distintos de quatro, sete e dez dias, eles utilizaram um dispositivo palatino contendo quatro blocos de esmalte bovino, gotejaram uma solução de sacarose a 20% dez vezes por dia e utilizaram um dentífrício não fluoretado. Em todos os períodos houve acúmulo de biofilme dentário e um alto desafio cariogênico. Os estreptococos do grupo mutans, cálcio e polissacarídeos extracelulares insolúveis (PECI) foram quantificados no biofilme formado sobre os blocos após cada período. A desmineralização do esmalte foi avaliada pela porcentagem de perda da microdureza de superfície (%PDS) em relação aos valores iniciais. Houve desmineralização do esmalte em todos os períodos avaliados ($p < 0,05$) e a %PDS aumentou com o tempo de uso (de 13,8 para 48,3%). As concentrações de cálcio e fosfato no biofilme dentário não foram diferentes entre os tempos experimentais, mas houve correlação negativa significativa entre a concentração de cálcio e %PDS e correlação positiva significativa entre a concentração de fosfato e %PDS. Os fatores salivares avaliados inicialmente e os níveis de estreptococos do grupo mutans no biofilme não apresentaram correlação estatisticamente significativa com a %PDS. Os resultados mostraram que a desmineralização do esmalte depende do tempo e está mais relacionada com a composição de biofilme dentário formado do que com os fatores salivares estudados.

O tempo de formação do biofilme dental foi investigado por Vale *et al.* (2007) em um estudo *in situ*, que avaliou a composição microbiológica e bioquímica do biofilme dental formado na presença de sacarose ou glicose + frutose em diferentes tempos, com a finalidade de observar a dinâmica de maturação do biofilme e sua relação com a desmineralização do esmalte. Doze voluntários adultos utilizaram em 3 fases cruzadas de 14 dias, um dispositivo intra-oral palatino contendo 6 blocos de esmalte dental humano, os quais foram expostos 8 vezes ao dia aos seguintes tratamentos: água destilada e deionizada (T1), solução de glicose 10% + frutose a 10% (T2) ou solução de sacarose a 20% (T3). O biofilme foi coletado após 3, 7 e 14 dias de formação e avaliado quanto à composição

microbiológica e bioquímica. As variáveis bioquímicas avaliadas foram Ca, F, Pi, polissacarídeos intra (PIC) e extracelulares (PEC) no biofilme. Nos espécimes dentais, a perda mineral do esmalte seccionado longitudinalmente foi determinada. Maior desmineralização foi encontrada nos blocos submetidos ao T3 do que nos tratados com T1 e T2 ($p < 0,05$), sendo a perda mineral considerada significativa a partir de 7 dias ($p < 0,05$). As concentrações de F, Ca e Pi no biofilme dental foram menores no T2 e T3 do que no T1 ($p < 0,05$), sendo que para F e Ca não houve diferença entre os tempos ($p > 0,05$) e para Pi, 7 e 14 dias mostraram maiores concentrações que no biofilme de 3 dias ($p < 0,05$). As concentrações de PIC foram significativamente maiores no T2 e T3 do que no T1 ($p < 0,05$), havendo um aumento com 7 e 14 dias, enquanto as de PEC foram maiores no T3 do que no T1 e T2 ($p < 0,05$), não mostrando diferença entre os tempos.

2.2.1 Íons do Biofilme

A cárie dental é um processo dinâmico que depende das condições existentes na interface esmalte/biofilme dental. O pH e composição inorgânica do biofilme dental irão estabelecer condições de subsaturação ou supersaturação que favorecem processos de desmineralização ou remineralização nas superfícies dentais (Tenuta e Cury, 2004).

Os íons cálcio (Ca), fosfato (Pi) e flúor (F) são fundamentais, por manterem o equilíbrio mineral entre os dentes e o ambiente bucal. Podem ser armazenados no biofilme como depósitos minerais ou ligados à parede de células bacterianas ou a proteínas. Grupamentos aniônicos presentes nas superfícies da parede celular bacteriana e proteínas permitem a ligação de íons Ca, aos quais se ligam os íons F. Os íons Pi são encontrados apenas nos depósitos minerais. F também está presente nesses depósitos. Ou seja, o biofilme funciona como um reservatório (Pearce, 1998; Gao *et al.*, 2001).

2.2.2 Íons no Fluido do Biofilme

O fluido do biofilme, fase aquosa livre, separado dos componentes microbianos por centrifugação, apresenta composição diferente da saliva. Podem ser encontrados nessa

porção do biofilme: enzimas oriundas de bactérias e do hospedeiro, fatores de defesa hospedeiro, específicos como: IgA, IgG e complementos e produtos ácidos do metabolismo bacteriano. O fluido do biofilme sem desafio cariogênico apresenta-se supersaturado em relação aos íons cálcio, fosfato e flúor que compõem o dente (Moreno & Margolis, 1988; Rankine *et al.*, 1985).

Margolis & Moreno (1988) realizaram um estudo comparando a composição orgânica e inorgânica do fluido do biofilme, de indivíduos sem cárie e susceptíveis à cárie, em que os voluntários ficaram sem escovar os dentes durante 48 h antes da coleta do biofilme. Os resultados mostraram que o fluido do biofilme é supersaturado em relação ao esmalte, apresentando-se mais saturado em indivíduos sem cárie, sugerindo um maior potencial de remineralização. Essa diferença de saturação pode estar relacionada a diferenças de pH e a produção de NH_3 , que podem refletir na composição de diferentes espécies de microrganismos.

Kashket & Yaskell (1990) estudaram o papel do cálcio e do fosfato da matriz extracelular na regulação da desmineralização frente a desafios cariogênicos. Adaptaram o modelo de Brudevold *et al.* (1984), utilizando soluções de sacarose a 5 e 10% e incluindo a análise inorgânica da matriz do biofilme. Neste trabalho foi demonstrado que os íons presentes na matriz do biofilme provêm principalmente do substrato dental, pois a concentração na saliva é muito inferior, e quando o esmalte foi substituído por blocos de acrílico, a concentração iônica da matriz caiu drasticamente. A diferenciação da fração iônica da concentração total de cálcio e fosfato sugeriu que parte dos íons se complexa a macromoléculas, podendo precipitar novamente na forma de mineral quando um equilíbrio for atingido.

Kashket & Yaskell (1992a) estudaram o efeito da administração de soluções com crescentes concentrações de lactato de cálcio no desafio cariogênico com solução de sacarose 10%. Avaliaram a perda mineral pela penetrabilidade ao iodo (ΔIp), o pH do biofilme, e a composição inorgânica do biofilme. Cinco voluntários usaram dispositivos palatinos cobertos com placa-teste de estreptococos do grupo mutans (IB-1600) bochecharam 15 mL de sacarose a 10% (controle), ou sacarose com lactato de cálcio a 50, 100 ou 150 mM. Nos grupos testados para as concentrações de 100 ou 150 mM a

desmineralização foi reduzida para aproximadamente 35%, embora o pH do biofilme não tenha sido afetado. A desmineralização parece parar quando 100 mM de lactato de cálcio é bochechado 1 min. após o bochecho de sacarose, reduzindo em 55% a desmineralização. Quando o lactato, administrado 15 minutos antes do bochecho da sacarose, a desmineralização é reduzida em torno de 25%, compatível com a rápida difusão do cálcio para o biofilme. A realização do bochecho com lactato de cálcio 50 mM 15 min. após o bochecho com sacarose foi capaz de cessar a desmineralização, sem alterar o pH do biofilme, pois alterou o equilíbrio da reação ao aumentar a concentração do cálcio na matriz, as concentrações de P_i permaneceram inalteradas. Quando o lactato de cálcio foi utilizado 15 min. antes da solução de sacarose, as concentrações de 100 e 150 mM foram capazes de reduzir a perda mineral, mas de modo menos eficiente do que quando utilizadas 15 min depois. O lactato de cálcio 50 mM, devido principalmente o rápido *clearance* salivar, não teve efeito protetor. Os resultados demonstraram um efeito protetor do esmalte em concentrações relativamente baixas de lactato de cálcio. Este trabalho confirmou o papel do grau de saturação dos íons na fase fluida do biofilme na regulação da desmineralização dental.

Tenuta *et al.* (2006) realizaram um estudo cujo objetivo foi avaliar a concentração dos íons cálcio (Ca), fósforo inorgânico (Pi) e fluoreto (F) no fluido do biofilme, onde ocorrem as trocas iônicas entre o biofilme e o mineral do dente, bem como sua cinética após a ingestão de açúcar ou após a interrupção dos desafios cariogênicos. Dezesesseis voluntários utilizaram durante três fases cruzadas de 15 dias, um dispositivo palatino contendo 8 blocos de esmalte humano, que foram expostos 8 vezes ao dia a água destilada deionizada (controle), solução de glicose a 10% + frutose a 10% (GF) ou solução de sacarose a 20% (S). Após 14 dias os tratamentos com o grupo controle ou os carboidratos foram invertidos. As variáveis analisadas foram acidogênese do biofilme (pH), Ca, Pi e F no fluido e no biofilme total (após 10 h de jejum, 5 min após desafio acidogênico para solução de glicose a 20% ou após a inversão dos tratamentos), e PEC insolúveis e polissacarídeo intracelular (PIC) no biofilme total. O pH do biofilme em repouso foi significativamente menor e a concentração de PIC significativamente maior ($p < 0,05$) para os grupos GF e S em comparação com o grupo controle. Após o desafio cariogênico, uma

diminuição significativa ($p < 0,05$) no pH foi observada para todos os grupos, sem diferença entre o pH 5 min. para os grupos GF e S ($p > 0,05$). As concentrações de Ca, Pi e F no biofilme total foram menores para os grupos GF e S do que para o grupo controle ($p < 0,05$), mas esse efeito não foi observado no fluido. Após o desafio cariogênico, Ca aumentou e Pi diminuiu significativamente no fluido ($p < 0,05$), mas o F não se alterou ($p > 0,05$). Ca, Pi e F no biofilme total aumentaram significativamente 24 h após a suspensão do tratamento com GF ($p < 0,05$), e o mesmo efeito foi observado para o Ca após a suspensão do tratamento S, mas essas alterações não foram observadas no fluido ($p > 0,05$). A concentração de PEC insolúveis foi significativamente maior para o grupo S em relação aos demais grupos ($p < 0,05$). Os resultados sugerem que as mudanças induzidas pela sacarose ou seus monossacarídeos constituintes no biofilme total não se refletem no fluido do biofilme.

2.3 pH e a cárie dentária

A queda do pH no meio bucal, causada pela fermentação de carboidratos pelas bactérias, é o mecanismo central para o desenvolvimento da cárie dentária. Um pH abaixo de 5,5 e de longa duração causa a desmineralização da superfície de esmalte dental. Estas condições também alteram o equilíbrio da microbiota no biofilme dental, promovendo a seleção microbiana (Marsh, 1991). A sobrevivência microbiana em meio ácido depende da habilidade de uma célula em manter a homeostase intracelular de pH. Os mecanismos nos quais os estreptococos do grupo mutans se diferenciam são: extrusão de prótons via ATP – sintase translocadora de prótons associada à membrana ($H^+/ATPase$); e efluxo do produto ácido final. Desta forma, as bactérias cariogênicas são acidogênicas, porque produzem ácidos, e acidúricas, pois sobrevivem em ambiente ácido (Hamada & Slade, 1980).

Stephan, em 1940, demonstrou que o consumo de carboidratos provoca queda do pH no biofilme dental, que alcança o nível mínimo cerca de 10 min. após sua ingestão e volta ao normal, vagarosamente, após cerca de 60 min., e toda vez que há o consumo de carboidratos, o processo se repete. O pH cai abaixo do nível crítico, quando ocorre a desmineralização, de 15 a 20 min. Assim, o consumo freqüente de alimentos cariogênicos durante o dia provoca quedas freqüentes do pH, ocorrendo o processo de desmineralização

várias vezes ao dia (Loesche, 1985). Essa dieta leva ao aumento das proporções de estreptococos do grupo mutans e lactobacilos, com concomitante queda dos níveis de estreptococos oralis, que inclui os estreptococos sanguis, estreptococos oralis, e estreptococos mitis (De Stoppelar *et al.*, 1970).

Cury *et al.* (2001) investigaram a relação entre exposição à sacarose, níveis de estreptococos do grupo mutans e cárie dental. Voluntários adultos participaram neste estudo cruzado realizado em 4 fases de 28 dias cada. Doze voluntários utilizaram dispositivos intra-bucais palatinos contendo blocos de esmalte dental humano e gotejaram solução de sacarose 20% sobre os blocos dentais de 0 a 8 vezes/dia. Após cada fase, as unidades formadoras de colônias (UFC) foram contadas e a desmineralização foi avaliada através da dureza da lesão do esmalte. A frequência do uso de sacarose não teve efeito estatisticamente significativo nos níveis de estreptococos do grupo mutans. Nos testes de dureza, diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação à área de perda mineral somente foram observadas quando exposição à sacarose foi de 8 vezes/dia. Resultados similares foram obtidos quando a dureza da lesão de cárie foi avaliada a cada distância da superfície do esmalte.

McNeill & Hamilton em 2003 determinaram a tolerância ácida de biofilmes de estreptococos do grupo mutans crescidos por 1 até 7 dias, assim como verificaram a capacidade destes biofilmes de 2 e 5 dias, crescidos em baixos valores de pH 5,5, em induzir uma resposta à tolerância ácida, que poderia aumentar os índices de sobrevivência em valores letais de pH 3,5. Os biofilmes mais antigos foram mais resistentes ao pH letal por 2 h, tendo um índice de sobrevivência das células de 41,8% no biofilme de 1 dia e 63,9% nas células do biofilme de 7 dias. A incubação dos biofilmes por 2 e 5 dias em pH 5,5 por períodos maiores de 6 horas induziu uma forte resposta à tolerância ácida que aumentou a sobrevivência durante a subsequente exposição aos valor letal de pH 3,5.

A cavidade bucal abriga vários genótipos de estreptococos do grupo mutans, que podem apresentar propriedades de virulência distintas. Assim, em 2011, Arthur *et al.* publicaram um estudo sobre a diversidade e virulência de genótipos de *S. mutans* isoladas in vivo sob condições controladas de altos desafios cariogênicos. Este estudo avaliou a diversidade genotípica de estreptococos do grupo mutans isolados

de biofilme dental formado *in vivo* sob exposição à sacarose. Doze voluntários bochecharam, 8X/dia, por 3 dias água destilada ou solução de sacarose. Amostras de saliva e biofilme foram coletadas e os estreptococos do grupo mutans foram genotipados por PCR. Genótipos identificados no biofilmes foram avaliados quanto à sua capacidade em baixar o pH através da glicólise e a sua capacidade de viver em meio ácido e a atividade da F-ATPase. Genótipos isolados cultivados apenas na presença de sacarose apresentaram maior acidogênese do que aqueles cultivados apenas na presença de água. Os biofilmes formados na presença de sacarose foram mais acidúricos após 30 e 60 minutos de incubação em pH 2,8 e 5,0. O resultados sugerem que os biofilmes formados em condições de alta cariogenicidade podem abrigar genótipos de estreptococos do grupo mutans mais acidúricos e acidogênicos.

2.4 Sacarose

Entre os carboidratos, a sacarose é considerada o açúcar mais comum presente na dieta moderna (Zero, 2004), e seu papel no desenvolvimento da desmineralização tem sido demonstrado (Cury *et al.*, 2000). Em roedores a formação volumosa de biofilme nas superfícies dentais lisas, necessária para indução de cárie nessas superfícies, é associada especificamente à sacarose como substrato, o mesmo pode ser verdadeiro para as superfícies dentais lisas em humanos (Carlsson, 1965).

Rölla *et al.*(1985) relataram em seus estudos que a sacarose é conhecida por possuir um maior potencial para induzir cáries do que a glicose e a frutose, apesar do fato dos monossacarídeos causarem uma alta ou maior produção de ácido *in vitro* pelos microrganismos do biofilme dental. É suposto que a cariogenicidade da sacarose é principalmente associada com a alta energia de sua hidrólise, a qual pode ser utilizada pela bactéria para síntese de glucanos extracelulares. Os polissacarídeos produzidos *in vitro* na presença da sacarose resultam em um grande acúmulo de placa, um fenômeno que por si só pode causar aumento na cariogenicidade (Cury *et al.*, 2000; Tenuta *et al.*, 2003).

A incorporação de carboidratos fermentáveis (sacarose, glicose e frutose) à dieta de determinados grupos populacionais provocou um aumento na experiência de cárie

quando comparado ao período em que esses carboidratos não estavam presentes na dieta (Rugg-Gunn & Murray, 1983). Brudevold *et al.* (1984) encontraram que soluções a 5% de sacarose, frutose e glicose causaram significativa perda mineral quando comparados com maltose e lactose.

Em uma revisão de literatura sobre o papel do açúcar na cárie dentária, Zero, em 2004, comentou que inúmeras evidências comprovam o papel dos açúcares na etiologia da cárie dentária e sua importância como principal substrato proveniente da dieta. Enquanto alguns carboidratos surgem como pequenos modificadores do potencial acidogênico da dieta, a sacarose possui especial importância, como o único substrato capaz de gerar a síntese de glucanos extracelulares. Os glucanos insolúveis podem aumentar o acúmulo de estreptococos mutans em superfícies lisas do dente e aumentam a virulência pelo aumento da porosidade do biofilme, resultando em uma maior produção de ácido, principalmente na interface com a estrutura dentária.

A combinação de sacarose com amido pode ser mais cariogênica do que a sacarose sozinha, e Ribeiro *et al.* (2005) avaliaram *in situ* os efeitos desta associação quanto à acidogênese, composição bioquímica e microbiológica do biofilme dental, bem como na desmineralização do esmalte. Durante duas fases de 14 dias cada, 15 voluntários utilizaram dispositivos palatinos contendo blocos de esmalte decíduo humano, que eram submetidos extra-oralmente a quatro grupos de tratamento: água (controle negativo, T1); amido 2% (T2); sacarose a 10% (T3) e amido de 2% combinado com sacarose a 10% (T4). As soluções foram gotejadas sobre os blocos 8x por dia. A maior perda mineral foi observada para associação de amido à sacarose. Além disso, esta associação resultou na maior quantidade de lactobacilos no biofilme formado. Os resultados sugerem o amido adicionado à sacarose aumenta o potencial cariogênico. Em conclusão, os resultados do estudo *in situ* indicam que a adição de amido acentua potencial cariogênico da solução de sacarose. Uma vez que estes resultados foram obtidos por exposição do biofilme dental a 2% de amido solúvel e sacarose a 10%.

2.4.1 Fatores Relacionados à cariogenicidade da sacarose

2.4.2 Produção de polissacarídeos

A sacarose tem um papel fundamental no desenvolvimento de cárie de superfície lisa e proximal devido à sua habilidade de produzir polissacarídeos extracelulares solúveis na presença de estreptococos do grupo mutans, aumentando a aderência do biofilme à estrutura do esmalte (Burt, 1993). As bactérias bucais são submetidas a contínuos ciclos de fartura e escassez de carboidratos. Consequentemente, a microbiota adaptou-se para armazenar os carboidratos durante sua exposição a essas fontes de energia. Isso ocorre para evitar os efeitos letais do aumento de intermediários glicolíticos intracelulares e para prover uma fonte de carbono e energia para o período seguinte de carência. A estratégia mais comum é armazenar estes carboidratos na forma de polissacarídeos intracelulares (PIC) (Tanzer *et al.*, 1976), e muitas espécies de estreptococos bucais podem sintetizar polímeros tipo o glicogênio (1,4 α glucano), apesar de que outros polímeros podem também se formar (Newbrum, 1967).

A maioria das matrizes dos biofilmes são ricas em polissacarídeos, e os biofilmes dentais não são exceção, cerca de 40% do peso seco do biofilme dental é composto por polissacarídeos (Paes Leme *et al.*, 2006). Os polissacarídeos podem ser solúveis ou insolúveis; podem ser metabolizados por outras bactérias, enquanto os outros são de uma contribuição importante para a integridade estrutural do biofilme dental e podem consolidar a ligação da bactéria ao biofilme. Esses polissacarídeos formados são glucanos ou frutanos sintetizados pela ação enzimática de glucosiltransferases (GTFs) e frutosiltransferase (FTF), respectivamente. As GTFs podem ser divididas em grupos dependendo da produção de um dextrano solúvel (as GTF-S sintetizam glucanos com ligações α (1-6), ou de algum glucano insolúvel (as GTF-I sintetizam predominantemente polímeros α (1-3). São produzidas por estreptococos do grupo mutans que hidrolisam as moléculas de sacarose e polimerizam moléculas de glicose, formando glucanos insolúveis com ligação α (1-3) (Rölla, 1989). Três tipos de glucosiltransferases são produzidas por estreptococos do grupo mutans (Kuramitsu, 2003): *gtfB* e *gtfC* codificam enzimas que produzem glucanos

insolúveis em água, consistindo primeiramente de ligações α , 1-3 , as quais contribuem para adesão das células, formação e estruturação da placa, sendo essenciais para o início da formação da lesão cariiosa. Em contraste, o gene *gtfD* codifica uma enzima responsável pela formação de glucanos, principalmente com unidades de glicose α (1-6), que é muito mais solúvel em água. (Wenham Hennessey & Cole, 1979; Hamada & Slade, 1980; Bowen, 2002).

Os polissacarídeos produzidos a partir da sacarose são solúveis e apresentam estrutura complexa. Esses compostos promovem a aderência bacteriana à superfície dental e contribuem para a conformação estrutural do biofilme, aumentando a quantidade e também a porosidade do biofilme formado. O aumento da porosidade permite que açúcares difundam-se para porções mais profundas do biofilme, resultando em valores mais baixos de pH, decorrente da atividade catabólica dos microrganismos cariogênicos Dibdin & Shellis (1988). A relação entre PECs e desmineralização tem sido demonstrada através de estudos *in situ* (Pecharki *et al.*, 2005; Ribeiro *et al.*, 2005; Paes Leme *et al.*, 2006; Aires *et al.*, 2006).

Os PICs são moléculas de alto peso molecular, derivados de carboidratos usados como reserva energética dos microrganismos, durante períodos de limitação nutricional na cavidade bucal (Tanzer *et al.*, 1976). Dessa forma, os PICs prolongam a exposição das superfícies dentais aos ácidos orgânicos e mantêm o pH baixo na matriz do biofilme e, conseqüentemente promovendo um aumento na cariogenicidade desses biofilmes. Assim há evidência de que PECs e PICs influenciam a cariogenicidade do biofilme dental por ao menos duas formas: (1) PECs promovem a aderência de microrganismos bucais incluindo estreptococos, lactobacilos e actinomyces (Bowen, 2002) e acúmulo na superfície dental, causando mudanças bioquímicas e estruturais na matriz do biofilme; (2) PICs mantêm níveis baixos de pH durante períodos de privação de nutrientes provenientes da dieta, que poderiam resultar na seleção de microrganismos cariogênicos (Paes Leme *et al.*, 2006); (3) protegem os microrganismos de antimicrobianos e outras agressões do meio e (4) atuam como reserva de energia (Koo *et al.*, 2009).

2.4.3 Concentração de sacarose

Tehrani *et al.*, 1983 investigaram os fatores referentes aos carboidratos envolvidos na cárie, se a frequência ou a concentração de consumo. Encontrou que a frequência de desafios cariogênicos com sacarose tem maior relevância, mas que a quantidade do açúcar também interfere na perda mineral, pois com dois desafios com soluções de sacarose 1 e 5% (a cada 45 min.), apenas a maior concentração causou perda mineral.

Pecharki *et al.*, (2005) avaliaram *in situ* o efeito do ferro (Fe) cocrystalizado com sacarose (Fe-sacarose) na acidogênese, composição química e microbiológica do biofilme dentário formado e na desmineralização do esmalte. Durante duas fases de 14 dias cada, 16 voluntários usaram um dispositivo palatino contendo dois grupos de três blocos de esmalte humano. Cada grupo de três blocos foi submetido a um dos tratamentos: água destilada e deionizada (T1) solução de sacarose a 20% (T2) solução de sacarose a 20% mais 18 µg Fe/mL (T3) solução de sacarose a 20% mais 70 µg Fe/mL (T4). As soluções foram gotejadas sobre os blocos oito vezes por dia e os voluntários utilizaram dentifício fluoretado. O biofilme formado sobre os blocos foi analisado quanto à acidogênese no 13º dia de experimento (antes e 5 minutos após o gotejamento da solução) com microeletrodo. A quantidade de biofilme formada sobre os blocos e a contagem de lactobacilos foi significativamente menores no grupo T1, em comparação aos demais grupos, que não diferiram entre si. As populações de estreptococos mutans dos grupos T3 e T4 foram semelhante a do grupo T1. Já o grupo T2 apresentou contagem maior que os grupos T1 e T4, mas não foi diferente do grupo T3. Os grupos T2, T3 e T4 apresentaram concentrações de cálcio significativamente menores e de polissacarídeos insolúveis significativamente maiores que o grupo T1. Houve menor desmineralização no grupo T4 do que no T2. O grupo T1 apresentou menor perda de dureza superficial que o grupo T4, mas a perda mineral não foi diferente. Os autores concluíram que o Fe diminuiu a desmineralização do esmalte, provavelmente por reduzir a população de estreptococos mutans no biofilme formado.

Aires *et al.* (2006) avaliaram a relação entre concentração de sacarose potencial cariogênico, em um estudo *in situ* cruzado duplo cego, com a participação de 12 voluntários adultos. Os participantes usaram aparelhos palatinos removíveis com quatro blocos de esmalte humano, fixados 1 mm abaixo do nível da resina acrílica e protegidos por uma tela plástica para acúmulo de biofilme dentário. O estudo avaliou a resposta obtida pela aplicação extrabucal dos tratamentos (água destilada e deionizada – controle, solução de sacarose a 1%, 5%, 10%, 20% ou 40%) oito vezes por dia. Em cada uma das 3 fases experimentais, dois tratamentos foram testados. Os resultados mostraram que os menores níveis de pH após 5 minutos de exposição à sacarose foram obtidos com as soluções a 10, 20 e 40%. A concentração encontrada com a solução a 5% foi estatisticamente diferente somente da solução a 40%. As concentrações de cálcio e fósforo no grupo controle e sacarose a 1% não diferiram entre si, mas foram estatisticamente superiores do que os outros tratamentos. A concentração de polissacarídeos insolúveis foi estatisticamente menor no grupo controle do que nos outros grupos. A %PDS nos grupos controle e sacarose a 1% não foram diferentes entre si, mas foram significativamente menores do que as observadas com as outras concentrações de sacarose. A partir da concentração de 5% não foi observada diferença entre os grupos quanto à porcentagem de perda de dureza superficial. Os autores concluíram que a concentração de sacarose limiar para formação de um biofilme dentário com propriedades de acidogênese e composição bioquímica capaz de promover a cárie dentária é ao redor de 5%.

2.4.4 Frequência de exposição à sacarose

Um dos estudos clássicos que enfatizaram a importância da frequência do consumo de carboidratos fermentáveis na indução de cárie foi o de Gustafsson *et al.* (1954) na Suécia, com 436 pacientes com problemas psiquiátricos, internados no Hospital de Vipeholm, em Lund, participaram de experimento para estudar a ocorrência de cárie. Este estudo iniciou em agosto de 1945 e terminou sua fase experimental em junho de 1951. Realizado em 4 etapas, a primeira iniciada em 1945, denominada de Fase Preparatória, em 1946 aconteceu a segunda etapa na qual houve a Administração de Vitaminas aos

Pacientes, na terceira e quarta fases ocorridas entre 1947 – 1949 o Estudo Carboidrato I e 1949 – 1951 o Estudo Carboidrato II nos quais foram ministrados de fato os carboidratos segundo as quantidades e frequências testadas. Para este estudo os pacientes foram divididos em sete grupos sendo G1: Controle, Sem açúcar; G2: Sacarose em solução nas refeições; G3: Pão e doces: 355 g com 50 g/dia nas refeições; G4: 64 g chocolate líquido entre refeições dadas em 4 porções; G5: 22 Caramelos sendo 70 g/dia divididos em 2 porções entre refeições; G6: 8 Toffes totalizando 40 g/dia durante as refeições e entre as refeições; G7: 24 Toffes ao longo do dia. O estudo de Vipeholm demonstrou que era possível aumentar o consumo de açúcar de 30 para 330 g com pequeno aumento de cárie de 0,27 para 0,43 desde que o açúcar adicional fosse consumido durante as refeições.

A frequência está diretamente relacionada com o desenvolvimento da cárie (Konig *et al.*, 1968; Bowen *et al.*, 1980). Konig *et al.* (1968) realizaram um estudo no qual ratos foram alimentados por uma máquina que dispensava a dieta 580 (67% de sacarose) nos horários programados, desta forma foram ministradas 12, 18, 24 ou 30 vezes por dia. Os resultados mostraram uma correlação positiva entre a frequência de alimentação e a incidência de cárie. Bowen *et al.* (1980) realizaram um estudo também em ratos com uma máquina que dispensava a dieta em horários programados para verificar a cariogenicidade de vários alimentos. Os ratos receberam a dieta básica através de intubação gástrica. Concluíram que o número de lesões desenvolvidas estavam diretamente relacionadas à frequência de consumo de sacarose.

Cury *et al.* (1997) avaliaram a composição do biofilme dentário de acordo com a exposição à sacarose. Doze voluntários participaram de um estudo *in situ* cruzado, feito em quatro fases distintas de 28 dias, nas quais um aparelho de acrílico palatino foi construído para cada voluntário. Em cada dispositivo foram fixados quatro blocos de esmalte humano com uma tela plástica fixada sobre eles na resina acrílica. Durante as fases, os voluntários gotejaram uma solução de sacarose a 20%, variando o número de aplicações por dia (zero, duas, quatro e oito), utilizaram dentifício sem flúor e beberam água com 0,7 ppm de flúor. Após cada fase, foram determinadas as concentrações de flúor, cálcio, fósforo e carboidratos totais no biofilme dentário. Os resultados mostraram que aplicações frequentes de sacarose reduziram significativamente as concentrações de flúor, cálcio e fósforo no biofilme, mas

aumentaram a concentração de carboidratos álcali-solúveis. Além disso, os dados sugeriram que a cariogenicidade do biofilme dentário formado na presença de sacarose não pode ser atribuída somente à sua alta porosidade, mas a baixa concentração inorgânica também seria importante.

Em um estudo semelhante, Cury *et al.* (2000) realizaram um estudo *in situ* para verificar a composição bioquímica e a cariogenicidade do biofilme dental formada na presença de sacarose ou de glicose + frutose. Doze voluntários utilizaram dispositivos acrílicos contendo 4 blocos de esmalte durante 28 dias, protegidos com tela plástica para acúmulo de biofilme. Soluções de sacarose a 20% ou glicose 10% + frutose 10% foram gotejadas nos blocos 8X/dia, enquanto o grupo controle gotejava água. Os resultados mostraram que tanto a sacarose como a mistura de monossacarídeos foram mais cariogênicas que o controle. Foi observada perda da dureza de 3,3% no controle, 44,2% no grupo tratado com glicose + frutose e 73,4% no grupo tratado com sacarose. Concluíram que apesar dos resultados mostrarem que a maior cariogenicidade da sacarose se deve à alta concentração de glucanos insolúveis, a menor concentração inorgânica e de proteínas também devem ser consideradas.

Duggal *et al.* (2001) realizaram um estudo *in situ* para comparar a extensão da desmineralização do esmalte em função da frequência de consumo de sacarose e do uso de dentifrício fluoretado ou não. Oito voluntários utilizaram aparelhos inferiores removíveis, com blocos de esmalte obtidos de pré-molares humanos, previamente desmineralizados em gel e cobertos com gaze para permitir o acúmulo de biofilme dentário. Os voluntários utilizaram o aparelho continuamente por sete dias, sendo os dois iniciais sem aplicação de sacarose e os cinco subsequentes com ingestão de solução de sacarose a 12% (uma, três, cinco, sete ou dez vezes por dia), a qual era mantida na cavidade bucal por 2 minutos antes de ser engolida. Foram realizadas duas fases, sendo uma com dentifrício fluoretado e outra com dentifrício não fluoretado. Os voluntários escovaram seus dentes duas vezes ao dia, por 2 minutos, com o aparelho *in situ* (escovando todas as superfícies, exceto os blocos). Os espécimes foram removidos, seccionados e avaliados por meio de microradiografia transversa para avaliar ganho ou perda mineral. Os resultados indicaram que, mesmo quando o dentifrício fluoretado foi usado, uma desmineralização adicional não significativa foi

evidenciada com a ingestão de solução de sacarose, sete ou dez vezes por dia. Este estudo demonstrou a importância do F contido no dentifrício na re e desmineralização do esmalte após várias desafios cariogênicos *in situ*.

Em 2003, Cury *et al.* realizaram um estudo *in situ* para avaliar se as baixas concentrações de flúor, cálcio e fósforo inorgânico no biofilme dentário formado na presença de sacarose 8x/dia poderiam ser atribuídas simplesmente pela fermentação deste açúcar. Participaram deste estudo onze voluntários, em duas fases de 28 dias cada, que utilizaram dispositivos palatinos contendo seis blocos de esmalte humano, cobertos por tela plástica para acúmulo de biofilme dentário. Em cada fase foram gotejadas soluções de sacarose a 20% ou água destilada, oito vezes ao dia, sobre todos os blocos. Durante o período experimental os voluntários realizaram a higiene bucal com dentifrício sem flúor, mas ingeriram água fluoretada. Após 28 dias de cada fase, o biofilme dentário acumulado sobre dois blocos foi coletado. O tratamento foi invertido e, após um tempo adicional de 24 e 48 horas, o biofilme acumulado nos outros blocos foi coletado. As concentrações dos íons flúor, cálcio e fósforo inorgânico solúveis em ácido foram analisadas no biofilme dentário, além da concentração de polissacarídeos insolúveis. Foram observadas concentrações estatisticamente menores dos íons e uma concentração maior de polissacarídeos insolúveis no biofilme de 28 dias formado na presença de sacarose do que na sua ausência. Após a inversão do tratamento a mudança nas concentrações dos íons não foi significativa, mas a concentração de polissacarídeos insolúveis mudou significativamente. Os autores sugeriram que a mudança na concentração de flúor, cálcio e fósforo inorgânico no biofilme dentário não é devida à fermentação da sacarose.

Ccahuana-Vásquez *et al.* (2007) avaliaram na presença do uso de fluoreto, o efeito da frequência de exposição à sacarose na composição microbiológica e bioquímica do biofilme dental e sua relação com a desmineralização do esmalte dental. Dez voluntários adultos saudáveis, vivendo em uma área fluoretada, usaram dispositivos intra-buciais palatinos contendo 4 blocos de esmalte dental hígido humano, durante 3 fases experimentais de 14 dias cada. Os voluntários escovaram seus dentes usando dentifrício fluoretado, contendo 1100 ppm de F na forma de NaF, 3 vezes ao dia. Foram avaliadas as frequências de exposição à solução de sacarose 20%: 0, 2, 4, 6, 8 e 10 vezes/dia. Em cada

fase experimental, foram testadas 2 frequências (0-2, 4-6, 8-10). Ao final de cada fase experimental, o biofilme dental foi coletado, os blocos de esmalte removidos dos dispositivos. Os resultados mostraram perdas minerais (ΔZ) estatisticamente maiores que o controle ($p < 0,05$) nas frequências maiores que 6 x/dia. Porém, a quantidade de biofilme, contagens de microrganismos totais, estreptococos totais, lactobacilos e concentração de PEC aumentaram, enquanto as concentrações de F, Ca e P_i na parte sólida do biofilme diminuíram significativamente ($p < 0,05$), com frequências de exposição à sacarose menores que 6 x/dia. Assim, o F foi capaz de reduzir a perda mineral do esmalte dental quando o consumo de sacarose não for maior que 6 vezes ao dia, mas mudanças na composição bioquímica e microbiológica do biofilme dental foram observadas com menores frequências de uso.

2.4.5 Intervalo de tempo entre as exposições à sacarose

Em 1983, Bowen *et al.* estudaram o efeito dos intervalos de tempo entre as exposições da alimentação de ratos com 17 exposições cariogênicas. Além disso, foi estudada a influência dos vários intervalos entre as exposições no estabelecimento de estreptococos do grupo mutans (6715-15 resistente à estreptomina) na cavidade bucal utilizando ratos (Konig *et al.*, 1969). Os ratos Osborne – Mendel da linhagem Barrier Maintained (microbiota livre de patógenos específicos), provindos do Instituto Nacional de Saúde foram submetidos a 17 exposições diárias aos alimentos testados: biscoito de chocolate e no outro grupo o açúcar de confeitiro com intervalos de 10, 20, 40 e 60 minutos. Este estudo foi composto por dois experimentos, com 40 ratos de 23 dias, um experimento testou a cariogenicidade do biscoito de chocolate triturado e no outro o alimento cariogênico testado foi o açúcar de confeitiro. Os ratos foram alimentados por uma máquina programada de Konig-Höfer, a qual seguia a programação dos intervalos testados durante cinco semanas. O estado nutricional dos ratos era mantido por Intubação Gástrica (Gavage) com uma dieta líquida NCP # 2, 2x/dia às 10 e às 14 h com 2 mL. Os animais foram infectados bucalmente por inoculação individual com swab embebida em meio de cultura seguida de esfregaço nos dentes e na água por dois dias consecutivos. Ao

final do experimento, os animais foram sacrificados, e houve a remoção asséptica da mandíbula para quantificar estreptococos do grupo mutans. Foi determinado também o índice de cárie da mandíbula e maxila por meio da Técnica de Keyes, modificada por Larson (1981). Concluíram que os ratos, expostos 17 vezes aos alimentos testados, apresentaram 50% mais cárie do que aqueles submetidos às mesmas 17 exposições em intervalos curtos. A frequência de ingestão da sacarose afetou a habilidade dos estreptococos do grupo mutans em se estabelecer na cavidade bucal. O intervalo entre cada refeição também afetou a implantação do *S. mutans* na cavidade bucal.

Kashket & Yaskell (1992b) avaliaram a relação entre a perda mineral no esmalte bovino, a queda do pH no biofilme e a concentração de cálcio e fosfato inorgânico na matriz do biofilme após os voluntários serem expostos à sacarose. Cinco voluntários usaram dispositivos palatinos, mantidos na cavidade bucal por 120 minutos, contendo 8 blocos de esmalte bovino cujas superfícies foram cobertas com estreptococos do grupo mutans (IB 1600), foram feitos bochechos com sacarose a 5% e 10% por 1 min. Então, foram mensuradas a perda mineral, através da penetrabilidade de iodo (ΔI_p) (Brudevold *et al.*, 1984), e a queda do pH na placa nos tempos de 15, 30, 45, 60, 90 e 120 min. No grupo exposto a sacarose a 5% a desmineralização aumentou com o tempo e atingiu o máximo entre 45 e 60 min. e o biofilme manteve-se ácido (pH= 4,8). A queda de pH para solução de sacarose a 10% foi maior e permaneceu baixa, embora a perda mineral causada pela solução mais concentrada não foi o dobro da solução a 5%, indicando que outros fatores atuam na desmineralização. Os autores avaliaram também a administração de um segundo bochecho após 30 min., o pH do biofilme apresentou uma ligeira queda atingindo o valor de 3,9, enquanto para o ΔI_p não houve aumento. Quando o segundo bochecho foi realizado após 90 min., o pH do biofilme voltou a cair para 3,9, enquanto que o ΔI_p manteve-se inalterado em relação ao bochecho único. A saturação do cálcio e fosfato foi alcançada justamente quando a desmineralização chegou ao máximo, demonstrando que a saturação destes íons na matriz do biofilme tem um papel de regular a dissolução adicional do dente, desmistificando o que se acreditava anteriormente, que o mineral do dente continuaria se dissolvendo enquanto o pH permanecesse baixo. As concentrações de Ca no biofilme elevaram ao máximo (10,9 mEq/L) aos 30 min para o bochecho único com sacarose

a 5%, e então cai para 6,8 mEq/L no tempo de 120 min. A concentração P_i atinge o máximo de 12,2 mEq/L aos 60 min e mantém-se inalterada até o final do experimento. A concentração de P_i foi menor no tempo de 60 min (8,7 mEq/L) quando foi bochechado sacarose a 10%. A concentração de Ca após o segundo bochecho revelou não existir diferença dos valores obtidos para o bochecho único. Entretanto, a concentração de P_i do segundo bochecho foi aproximadamente um terço menor do que o correspondente para o bochecho único quando o segundo bochecho foi dado aos 90 min. A desmineralização parece estar limitada ao baixo pH do biofilme, portanto pelo acúmulo de altos níveis de íons minerais no biofilme. Estes resultados sugerem que o efeito na dentição será limitado quando houver o consumo de alimentos contendo carboidratos.

3. PROPOSIÇÃO

Avaliar *in situ* o efeito dos intervalos de tempo entre as exposições à sacarose na composição do biofilme dental formado e na desmineralização do esmalte.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba/Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) registrado sob o número 194/2009 (anexo I).

4.1. Delineamento Experimental

Este estudo *in situ* do tipo cruzado e cego quanto ao examinador foi realizado em quatro períodos de 14 dias (Paes Leme *et al.*, 2004), durante os quais 15 voluntários, com idades entre 22 e 30 anos, utilizaram dispositivos intrabucais palatinos contendo quatro espécimes de esmalte íntegros (dois em cada lado do dispositivo) de dureza de superfície pré-determinada, para avaliar o efeito dos diferentes intervalos de exposição à sacarose:

Grupo I: Nenhuma exposição à sacarose e a nenhuma outra solução;

Grupo II: Exposição à sacarose 20% 8 vezes ao dia com intervalos de 15 minutos entre elas;

Grupo III: Exposição à sacarose 20% 8 vezes ao dia com intervalos de 45 minutos entre elas;

Grupo IV: Exposição à sacarose 20% 8 vezes ao dia com intervalos de 90 minutos entre elas.

Em cada fase grupos de voluntários utilizaram os tratamentos determinados. O primeiro grupo de tratamento para cada voluntário foi determinado por meio de sorteio, de modo tal que ao final de todos os cruzamentos, todos os voluntários foram submetidos a todos os tratamentos (Figura 1). Uma semana antes de iniciar no experimento os voluntários utilizaram dentifrício não fluoretado (lead in). Também foi estabelecido um intervalo de sete dias entre cada fase experimental (wash out) (Cury *et al.*, 1997).

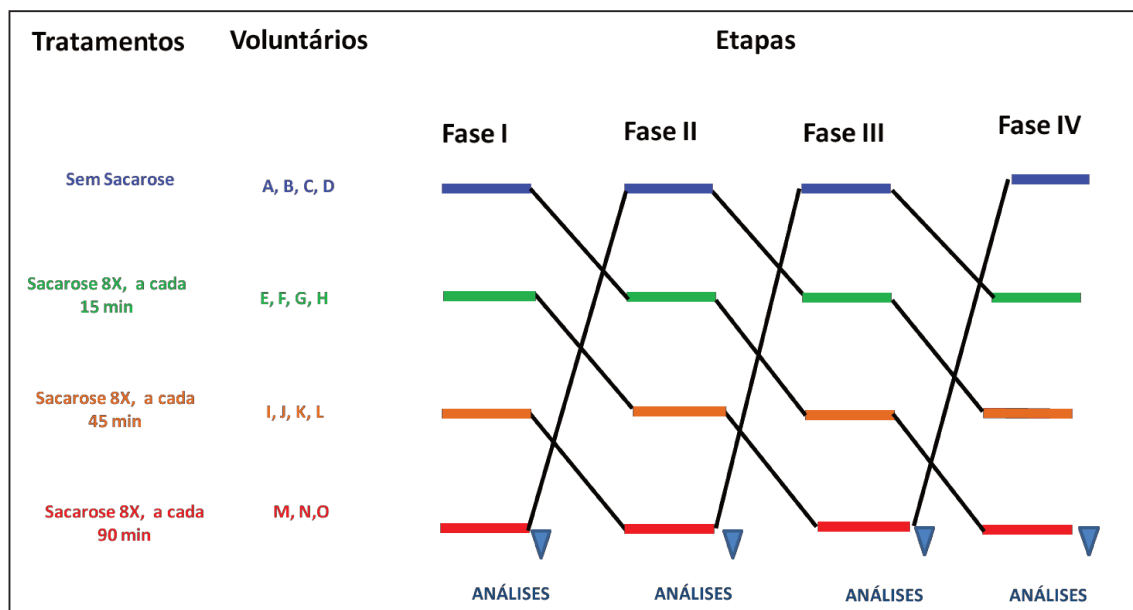


Figura 1 – Fluxograma do experimento.

No 15º dia de cada fase, os biofilmes formados sobre os blocos foram coletados de manhã (7:00 às 8:00 h). Esses biofilmes foram analisados quanto à composição microbiológica, bioquímica e concentração inorgânica na porção sólida e fluido. Os blocos dentais foram avaliados para a determinação da perda de dureza como indicador de desmineralização.

4.2 Preparo dos Blocos Dentais

Para a realização deste trabalho foram utilizados dentes humanos terceiros molares íntegros extraídos por razões ortodônticas, mantidos em formol 2% pH 7,4, por pelo menos 30 dias após as extrações para a desinfecção antes de qualquer experimento (White, 1987). Os dentes foram doados por um cirurgião-dentista, sem possibilidade de identificação dos voluntários doadores e conseqüentemente de aplicação de termo de consentimento livre e esclarecido. Essa doação foi informada e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP.

Para obtenção dos blocos de esmalte (4x4x2 mm), os dentes foram seccionados com discos diamantados (nº 11-4243 série 15-HC-Diamond BUEHLER®) acoplados em uma cortadeira elétrica (BUEHLER ISOMET) e, a partir do terço médio coronário, os blocos

dentais foram obtidos. Após obtenção do bloco de esmalte, a superfície dentária foi planificada e polida, permitindo a determinação da dureza de superfície. Para isso os blocos foram fixados com a superfície de esmalte voltada para baixo, na porção central de um disco de resina acrílica pré-fabricada (3,0 cm de diâmetro e 8,0 mm de espessura), e então levada a uma politriz APL-4 AROTEC (modificada e contendo sistema de polimento múltiplo) com lixa de granulação 320 em baixa rotação, sob refrigeração a água, até que a espessura do bloco fosse ajustada próximo de 2 mm. Para planificações e polimento da superfície de esmalte, os blocos foram reposicionados no centro do disco de resina acrílica, com a superfície de esmalte voltada para cima, sendo esta serialmente lixada e polida com lixas de granulação 400, 600, 1200 e finalmente um disco de papel feltro (POLISHING CLOTH BUEHLER® n° 40-7618) e suspensão de diamante (BUEHLER-METAD® DIAMOND SUSPENSION 1 MICRON - WATER BASE n° 40-6530). Entre cada lixa, os blocos foram levados ao aparelho de ultra-som (THORNTON T7, 50 Watts), sob água deionizada durante dois (2) minutos. Ao final do polimento, foi utilizado no ultra-som uma solução detergente (ULTRAMET® SONIC CLEANING SOLUTION n75-500-032 BUEHLER®) diluída na proporção 20:1, em água deionizada. Finalmente, os corpos de prova foram lavados em água deionizada corrente, durante três minutos, sendo conservados em ambiente úmido a 4°C. A dureza da superfície do esmalte foi determinada para seleção dos blocos e para servir como indicador de perda mineral após o estudo *in situ*. Foi utilizado um microdurômetro Future Tech modelo FM-7 acoplado a um software FM-ARS e um penetrador tipo Knoop, com carga estática de 50 g, aplicada por 5 s. No centro de cada bloco foram realizadas 3 endentações à distância de 100 µm entre cada uma. Foram confeccionados 1000 blocos, estes foram selecionados por sua dureza através do cálculo do desvio-padrão maior do que 7,5% de sua média de dureza individual (variabilidade intra-blocos) e aqueles que apresentavam sua média individual de dureza maior ou menor do que 7,5% da média de dureza calculada. Foram selecionados 240 blocos com dureza de superfície inicial (média±DP) de $361,6 \pm 16,3 \text{ Kg/mm}^2$. Estes foram aleatoriamente alocados, de modo escalonado, entre os 4 grupos de tratamento, de modo a obter grupos homogêneos quanto à média de dureza dos blocos. Em seguida, estes grupos de 4 blocos (um de cada tratamento) foram sorteados entre os voluntários, totalizando 4 blocos para

cada tratamento por voluntário. Para aleatorização, foi utilizado o programa Excel, da Microsoft 2010. O valor de dureza inicial foi utilizado para calcular a porcentagem de perda de dureza de superfície (%PDS) após o estudo in situ (Figura 2).

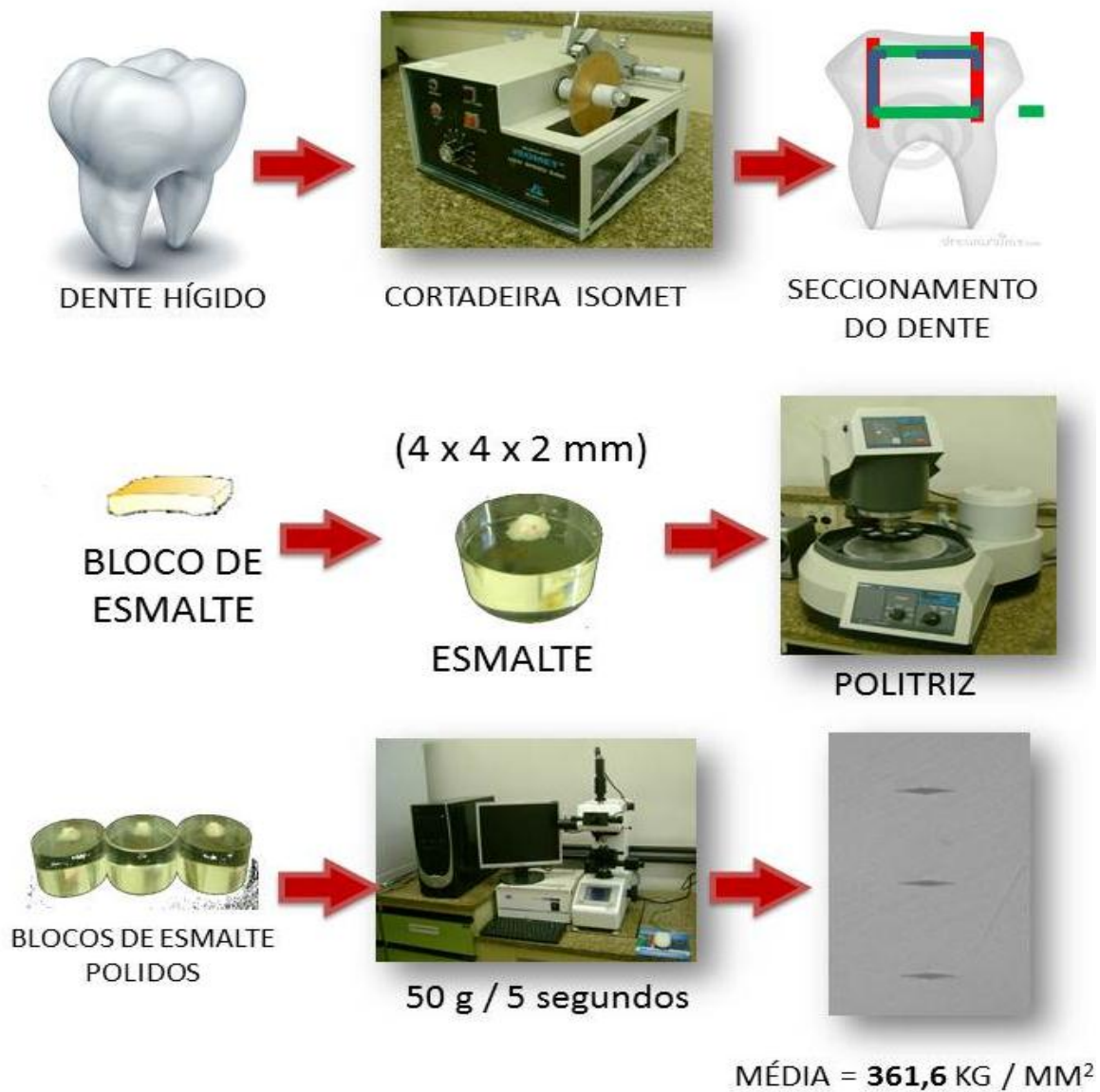


Figura 2 - Esquema de corte, polimento e análise de microdureza inicial de superfície para seleção dos blocos de esmalte.

4.3 Fase Clínica

Quinze voluntários adultos, sendo 4 do gênero masculino e 11 feminino, residentes em Piracicaba – SP, cidade que apresenta regularidade na fluoretação da água de abastecimento (0,6 a 0,8 ppm F) com idades entre 22 e 30 anos apresentavam bom estado de saúde bucal e geral participaram deste estudo realizado na Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP/UNICAMP). Os voluntários utilizaram os dispositivos diariamente inclusive para dormir, removendo-os apenas para se alimentar e mantendo-os em ambiente úmido durante as refeições.

Os critérios de exclusão adotados foram: indivíduos com atividade de cárie diagnosticada por meio de um exame clínico, indivíduos utilizando aparelhos ortodônticos fixos ou removíveis, fumantes, diabéticos, com fluxo salivar abaixo do normal ou que estejam utilizando medicamentos que interfiram no fluxo salivar e utilizado antibióticos nos dois meses anteriores à pesquisa.

Para escovação habitual dos dentes, assim como da superfície interna do dispositivo intra-bucal palatino, utilizou-se uma formulação de dentifrício não fluoretado. Para simular o desafio cariogênico foi colocada uma gota de sacarose a 20% sobre cada bloco dental (Cury *et al.*, 1997-2000; Aires *et al.*, 2006). Este procedimento foi feito 8 vezes ao dia, de acordo com os intervalos testados.

Todos os voluntários assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, no qual foram esclarecidos os objetivos, a importância e a relevância do estudo, bem como os procedimentos que seriam realizados (Anexo 2).

4.4 Confeção dos Dispositivos Intrabucais

A arcada dentária superior de cada voluntário foi moldada com hidrocolóide irreversível (alginato), obtendo-se um modelo de gesso, a partir do qual foi confeccionado o dispositivo intrabucal palatino. Este foi confeccionado em resina acrílica, para cada voluntário, no qual foram preparadas 4 cavidades com 5X5X3 mm, sendo duas de cada lado, onde foram fixados os blocos dentais. Após a fixação dos blocos de esmalte, uma tela

plástica foi fixada na resina acrílica sobre eles, deixando-se um espaço de 1 mm entre o bloco e a tela plástica para permitir acúmulo de biofilme dental (Hara *et al.*, 2003).

4.5 Utilização do Dispositivo Intrabucal

Uma semana antes de iniciar o experimento, os voluntários iniciaram o uso do dentífrico não fluoretado (lead in). Os voluntários foram orientados a usar o dispositivo continuamente, exceto durante a ingestão de algum alimento ou bebida, e nessas ocasiões o dispositivo foi mantido em um estojo plástico com gaze umedecida. O dispositivo, assim como os dentes dos voluntários foram escovados com o mesmo dentífrico não fluoretado, sendo o dispositivo acrílico palatal escovado somente entre as telas plásticas e na parte que entrava em contato com o palato do voluntário. Em horários pré-determinados segundo os grupos de intervalo testados foi gotejada a sacarose 20 %, 8 x / dia, exceto no grupo controle, que não foi exposto à sacarose. Para os demais grupos foram determinados os horários para o gotejamento da sacarose, desta forma o grupo de intervalo de 15 min.: 8:00, 8:15, 8:30, 8:45, 9:00, 9:15, 9:30 e 9:45 h, para o grupo de intervalo de 45 min.: 8:00, 8:45, 9:30, 10:15, 11:00, 11:45, 12:30 e 13:15 h e para o grupo de intervalo de 90 min.: 8:00, 9:30, 11:00, 12:30, 14:00, 15:30, 17:00 e 18:30 h. O voluntário foi orientado a remover o dispositivo e dispensar uma gota da solução de sacarose a 20% sobre cada bloco dental, deixar o dispositivo em repouso por 5 min e recolocá-lo na cavidade bucal. Os horários recomendados para a escovação foram após as principais refeições: café da manhã (entre 7:00 e 7:30 h), após o almoço (13:00 h) e após o jantar (entre 20:00 e 21:00 h). Todos os voluntários participaram de todas as fases em um dos tratamentos, sendo estabelecido um período de wash-out de sete dias entre as fases, no qual os voluntários permaneciam utilizando dentífrico não fluoretado (Anexo 3).

4.6 Coletas do Biofilme Dental

Na manhã (7:00 às 8:00 h) do 15º dia de cada fase, as telas plásticas fixadas na resina sobre os blocos dentais foram removidas com lâmina de bisturi número 15, então o

biofilme dental formado foi coletado, utilizando-se uma espátula plástica. Os biofilmes foram transferidos para tubos eppendorfs pré-pesados em balança analítica com sensibilidade de 0,01mg. Os biofilmes formados sobre 2 blocos anterior esquerdo e posterior direito do aparelho foram coletados para a análise microbiológica e de polissacarídeos e os outros 2 blocos posterior esquerdo e anterior direito para análise inorgânica do biofilme quanto às concentrações de Ca, P_i e F no fluido e parte sólida do biofilme.

4.7 Análise Microbiológica e de Polissacarídeos

Aos tubos contendo os biofilmes pesados foi adicionado 1,0 ml da solução de NaCl 0,9 % e uma suspensão homogênea foi obtida por sonicação a 7 w por 30 seg usando ponta sonicadora (Aires *et al.*, 2008). A partir desta suspensão, foram coletadas alíquotas para análise microbiológica e de polissacarídeos.

Para análise microbiológica, a suspensão foi diluída em séries decimais até 1/100.000. Uma alíquota de 60 µL das diluições foi inoculada nos meios de cultura: sangue, mitis salivarius, rogosa e CFAT. O meio Ágar Sangue foi usado para o cultivo da microbiota total (MT). O meio Ágar Mitis Salivarius contendo 0,2 unidades de bacitracina, adicionado de 15% de sacarose, foi utilizado para o cultivo de estreptococos do grupo mutans (EM) (Gold *et al.*, 1973). O meio Rogosa foi utilizado para determinar o cultivo de lactobacilos (LB) e o meio CFAT para o cultivo *Actinomyces viscosus* (AV). As placas do meio ágar sangue foram incubadas por 48 h à 37°C em estufa anaeróbica. Já as placas com os meios MSB, Rogosa, CFAT foram incubados em estufa à 37 °C e pressão CO₂ de 10%. As unidades formadoras de colônias (UFC) foram contadas e os resultados expressos como UFC/mg de peso úmido de biofilme dental.

Para extração e determinação de polissacarídeos, foi adotado o protocolo descrito por Aires *et al.* (2008). Uma alíquota de 800 µL da suspensão do biofilme sonicado foi centrifugada a 10.000 g por 5 min. a 4°C. O sobrenadante contendo polissacarídeos extracelulares solúveis (PECS) foi coletado e transferido para outro tubo denominado PECS. O precipitado foi lavado com 100 µL de solução salina, centrifugado e o

sobrenadante adicionado ao tubo PECS. Ao precipitado, foi adicionado o volume mínimo de 200 µL de NaOH 1 M para extração dos polissacarídeos extracelulares insolúveis (PECI). O tubo foi agitado em vórtex por 1 min., centrifugado e o sobrenadante foi transferido para outro tubo de microcentrifuga chamado de PECI. O precipitado foi lavado com um volume mínimo de 200 µL de NaOH 1 M, centrifugado e o sobrenadante foi adicionado ao tubo PECI. Ao precipitado residual, o volume de 200 µL de NaOH 1 M foi adicionado para extração de polissacarídeo intracelular (PIC) (Tenuta *et al.*, 2006). Este tubo foi agitado, aquecido durante 15 minutos a 100°C, centrifugado e o sobrenadante foi transferido para outro tubo chamado PIC. O precipitado foi lavado com NaOH e o PIC extraído.

Aos tubos contendo os extratos de PECS, PECI e PIC foi adicionado 3 v de etanol resfriado, agitado e após 30 min a -20°C os tubos foram centrifugados e os precipitados foram lavados duas vezes com etanol a 70%. Os polissacarídeos precipitados foram dissolvidos em NaOH 1 M e a concentração de carboidratos total foi estimada pelo método do fenol sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956) utilizando microtécnica (0,2 mL de amostra + 0,2 mL de fenol 5% + 1,0 mL de H₂SO₄). As análises foram feitas em espectrofotômetro Beckman DU-70 a 490 nm, calibrado com triplicata de padrão contendo 40 µg de glicose/0,2 mL, após ter sido comprovada a linearidade da relação quantidade de glicose (1,25 a 80 µg) e absorbância (r=0,99). Os resultados foram expressos em mg de polissacarídeos por grama de peso úmido de biofilme.

4.8 Análise da Composição Inorgânica no Biofilme

4.8.1 Coleta do biofilme

Ponteiras de 10 µL, preenchidas com óleo mineral extra-pesado (Drake Oil número 35, da PENRECO) e vedadas na extremidade, foram utilizadas e adaptadas a um tubo de microcentrifuga. As telas plásticas que recobriram os blocos de esmalte foram removidas com lâminas de bisturi nº 15 e o biofilme foi coletado com uma espátula plástica. O biofilme foi coletado de 2 blocos (posterior esquerdo e anterior direito) A

amostra imersa em óleo foi pesada para determinação do peso do biofilme coletado e centrifugada a 4°C, por 5 min a 21 000 g (Tenuta *et al.*, 2006). Após a pesagem, a ponteira adaptada a um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL foi centrifugada por 5 min, a 21000 g e 4 °C.

4.8.2 Extração do fluido do biofilme

O fluido do biofilme obtido por separação da parte sólida foi coletado com micropipetas de vidro pré-fabricadas, sob visualização com microscópio estereoscópico com aumento de 6 a 40 X. (Tenuta *et al.*, 2006)

4.8.3 Extração dos íons da parte sólida do biofilme

Após a extração do fluido, a ponteira contendo a porção sólida do biofilme, sob óleo mineral, foi seccionada em sua ponta, sendo o seu conteúdo centrifugado sobre ácido HCl 0,5 M permanecendo em agitação por 3 horas em temperatura ambiente e sob agitação para extração de íons minerais Ca, Pi e F (Cury *et al.*, 1997). Após a centrifugação, obteve-se o precipitado e sobrenadante. Os tubos foram centrifugados a 4 °C, por 5 min. à 21000 g, sendo o sobrenadante coletado para as análises dos íons.

4.8.4 Dosagem de cálcio e fósforo inorgânico no fluido e na parte sólida do biofilme

A dosagem de cálcio e fósforo inorgânico (P_i) no fluido e da parte sólida do biofilme foi realizada utilizando reagentes colorimétricos, respectivamente Arsenazo III e verde de malaquita (Vogel *et al.*, 1983). O volume de fluido de biofilme misturado aos reagentes colorimétricos (aproximadamente 1 µL para o cálcio e 0,07 µL para o fósforo inorgânico) foi padronizado utilizando nanopipetas de quartzo pré-fabricadas. Para a dosagem no extrato ácido da parte sólida do biofilme, nas mesmas metodologias foram utilizadas, porém para o Ca as amostras foram neutralizadas com NaOH para evitar

interferência do pH na determinação. A dosagem colorimétrica foi feita em leitor de microplacas Multiskan Spectrum (THERMO) (Tenuta *et al.*, 2006).

4.8.5 Dosagem do íon flúor no fluido e da parte sólida do biofilme

Para a dosagem de fluoreto no fluido e da parte sólida do biofilme, foi utilizado um eletrodo específico para o íon, adaptado para microanálise. As amostras foram aplicadas na superfície do cristal sensível a fluoreto do eletrodo íon-específico, sob óleo mineral, utilizando micropipetas. Sob microscópio, um microeletrodo de referência foi colocado em contato com cada uma das amostras, fechando o circuito e permitindo a determinação da concentração de fluoreto por meio de um potenciômetro (Vogel *et al.*, 1997). As amostras foram tamponadas com TISAB III (Total Ionic Strength Adjustment Buffer) na proporção de 10 partes de amostra para 1 de TISAB III. Previamente à diluição das amostras, o operador calibrado aferiu a diluição, utilizando um padrão de concentração conhecida, tolerando um máximo de 3% de variação entre a concentração esperada e a obtida (Tenuta *et al.*, 2006). No caso da dosagem de F no extrato ácido, previamente foi realizada neutralização com NaOH e tamponamento com TISAB III. Os padrões de F com concentração conhecida foram preparados da mesma forma que as amostras.

4.9 Determinação da Desmineralização

4.9.1 Análise da Dureza de Superfície do Esmalte

Após o término de cada fase, os blocos foram reposicionados nos mesmos suportes de acrílico, e avaliados pela análise da dureza do esmalte, como descrito no item 4.2. Foram realizadas três impressões a 100 μm daquelas previamente realizadas se visíveis ou na região central dos blocos onde foram feitas as impressões iniciais. A partir das 3 impressões foi calculada uma média, a partir da qual foi determinada a porcentagem da perda de dureza de superfície (% PDS) calculada pela fórmula abaixo:

$$\%PDS = \frac{\text{Dureza inicial} - \text{Dureza Final} \times 100}{\text{Dureza inicial}}$$

4.9.2 Análise da Área de Perda de Dureza do Esmalte

Para avaliar a área de perda de dureza, os blocos de esmalte foram seccionados por corte no centro do bloco, utilizado disco diamantado de dupla face (n° 11-4243 série 15-HC Diamond BUEHLER) acoplado a uma cortadeira elétrica BUEHLER ISOMET. Então, os hemi-blocos foram embutidos com resina acrílica incolor (CLÁSSICO), utilizando uma embutidora metalográfica AROTEC PRE-3f1, padronizando 10 min. de aquecimento, 100 Kgf/cm² de pressão e 20 min. de resfriamento. Os hemi-blocos embutidos no acrílico foram posicionados e a superfície seccionada foi levada a uma politriz APL-4 AROTEC (modificada e contendo sistema de polimento múltiplo) sendo serialmente lixada e polida com lixas de granulação 400, 600, 1200 e finalmente um disco de papel feltro (POLISHING CLOTH BUEHLER® n° 40-7618) e suspensão de diamante (BUEHLER-METAD® DIAMOND SUSPENSION 1 MICRON - WATER BASE n° 40-6530). Entre cada lixa, as bases de acrílico com os hemi-blocos embutidos foram levados ao aparelho de ultra-som (THORNTON T7, 50 Watts), sob água deionizada durante dois minutos. Ao final do polimento, foi utilizado no ultra-som uma solução detergente (ULTRAMET® SONIC CLEANING SOLUTION n75-500-032 BUEHLER®) diluída na proporção 20:1, em água deionizada. Os hemi-blocos embutidos nas bases acrílicas foram levadas ao microdurômetro Future Tech para determinação da microdureza do esmalte seccionado. As impressões foram realizadas a distâncias de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200 e 300 µm da superfície externa do esmalte, sendo 14 impressões na região central do bloco dental (posição A) e 14 impressões 100 µm à esquerda (posição B) e à direita (posição C) desta região (Figura 3). As endentações foram feitas com uma ponta diamantada tipo Knoop, carga estática de 25 g durante 5 segundos (Cury *et al.*, 2000).

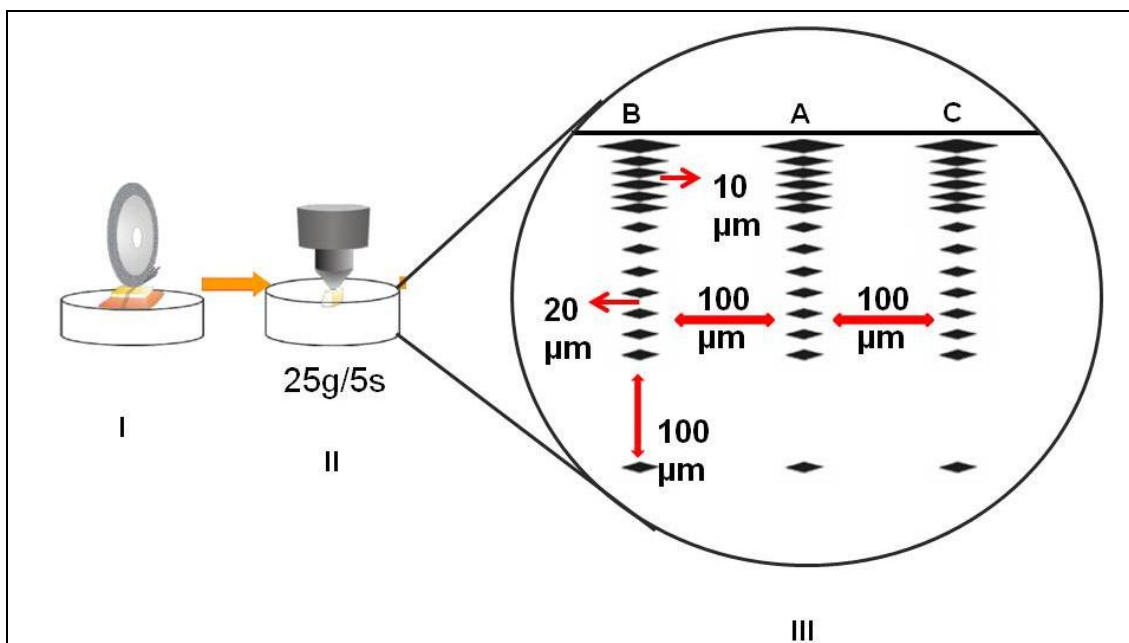


Figura 3 - Diagrama de um corpo de prova mostrando como foi seccionado o bloco dental (I), as impressões realizadas no bloco (II) e suas disposições (III).

As médias das durezas nas três posições de cada hemi bloco a cada distância da superfície do esmalte foram calculadas. A área de perda de dureza (ΔS) foi calculada por integração numérica usando a regra trapezoidal pela diferença entre a área sob a curva ($\text{kg/mm}^2 \times \mu\text{m}$) dos valores de dureza do esmalte hígido subtraído da área abaixo da curva dos valores de dureza do esmalte desmineralizado (Ana *et al.*, 2012)

4.10 Análise Estatística

Foi utilizada análise de variância para os grupos de tratamentos testados, e teste de Tukey, quando o efeito foi significativo, para comparação entre os 4 grupos. Os voluntários foram incluídos como fonte de variação (blocos estatísticos), para eliminar sua variação individual na estimação do efeito dos tratamentos. Nos testes de pressuposições da análise de variância, todas as variáveis necessitaram de transformação. Assim, para as

análises de íons no fluido, a concentração de Ca foi transformada em raiz quadrada, P_i em log base 10 e F em raiz quadrada. Para os íons na parte sólida do biofilme sofreram as seguintes transformações: o Ca em log base 10, o P_i em potência de -0,3 e o F em log base 10. Tanto para os dados obtidos na análise da concentração de polissacarídeos, quanto para os dados da microbiota, todos foram transformados em log base 10. Para a variável % PDS os dados foram transformados em raiz quadrada e o ΔS em log 10. Não foi apontado nenhum outlier. Todas as análises foram feitas utilizando-se o programa SAS System 9.2 (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA), com nível de significância de 5%.

5. RESULTADOS

Concentração de Ca, P_i e F no fluido do biofilme dental

Os resultados da tabela 1 mostram que para a concentração de Ca no fluido do biofilme houve diferença estatística entre o grupo controle e o grupo com intervalo de 90 minutos. Os grupos de intervalo de 15 e 45 minutos não se diferenciaram nem do grupo controle nem do grupo de maior intervalo. Para as concentrações do íon F e P_i no fluido do biofilme não houve diferença estatística entre os grupos de tratamentos testados.

Tabela 1. Médias, desvios padrão e n da concentração de íon flúor (F), cálcio (Ca) e fósforo (P_i) no fluido do biofilme dental de acordo com os grupos de tratamentos.

Grupos de Tratamentos	F (µM)	Ca (mM)	P_i (mM)
Controle	2,07 ± 0,78 A (8)	0,97 ± 0,79 A (8)	6,40 ± 1,85 A (8)
Sacarose 8 x /dia:			
Intervalo 15 min	2,75 ± 1,54 A (13)	2,00 ± 1,54 AB (12)	8,69 ± 4,72 A (13)
Intervalo de 45 min	2,82 ± 1,69 A (11)	1,99 ± 1,36 AB (11)	9,24 ± 5,15 A (10)
Intervalo de 90 min	2,27 ± 2,15 A (14)	3,24 ± 2,08 B (13)	9,00 ± 5,58 A (14)

Tratamentos cujas médias são seguidas por letras distintas diferem estatisticamente (p<0,05).

Concentração de Ca, P_i e F na parte sólida do biofilme dental

Os resultados da tabela 2 mostram que houve para a parte sólida do biofilme diferença estatística para a concentração do íon flúor, cálcio e fósforo entre o grupo controle e os grupos de intervalos testados, mas não houve diferença entre eles.

Tabela 2. Médias, desvios padrão e n da concentração do íon flúor (F), cálcio (Ca) e fósforo (P_i) na parte sólida do biofilme dental de acordo com os grupos de tratamentos.

Grupos de Tratamentos	F (nmol/g)	Ca (µmol/g)	P_i (µmol/g)
Controle	44,58 ± 32,03 A (8)	82,06 ± 66,89 A (8)	45,49 ± 40,08 A (8)
Sacarose 8 x /dia:			
Intervalo de 15 min	12,32 ± 6,76 B (12)	8,96 ± 4,98 B (12)	8,67 ± 3,66 B (12)
Intervalo de 45 min	12,05 ± 10,06 B (11)	7,48 ± 3,15 B (11)	8,18 ± 3,72 B (11)
Intervalo de 90 min	15,99 ± 16,17 B (14)	11,71 ± 10,53 B (14)	10,01 ± 4,27 B (14)

Tratamentos cujas médias são seguidas por letras distintas diferem estatisticamente (p<0,05).

Concentração de polissacarídeos do biofilme dental

Os resultados da tabela 3 apresentam as concentrações de polissacarídeos nos biofilmes de acordo com os grupos de tratamentos. Para a concentração de polissacarídeos extracelulares solúveis (PECS) houve diferença estatística entre os grupos de menor intervalo, controle e para o grupo com intervalo de 15 minutos, e para o grupo de maior intervalo de 90 minutos. A concentração de PECS foi maior para o grupo de intervalo de exposição à sacarose a cada 90 min., a qual diferiu estatisticamente dos grupos controle e do grupo de intervalo a cada 15 min. Com relação à concentração de PECL, a diferença foi significativamente maior para todos os grupos de exposição à sacarose ao comparar com o controle, mas eles não diferem entre si. Para PIC, foi encontrada maior concentração para o grupo de exposição à sacrose a cada 90 min., o qual diferiu estatisticamente do grupo controle, mas não em relação aos demais grupos de exposição à sacarose.

Tabela 3. Médias, desvios padrão e n da concentração de polissacarídeos (mg/g) em função dos grupos de intervalos de tempo testados entre as exposições à sacarose e para o grupo controle.

Grupos de Tratamentos	Concentração de Polissacarídeos (mg/g)		
	PECS*	PECI*	PIC*
Controle	2,80±3,17 A (8)	1,99 ± 1,57 A (8)	1,35 ± 1,24 A (8)
Sacarose 8 x /dia:			
Intervalo de 15 min	4,65 ± 5,73AB (12)	10,21 ± 11,07 B (12)	2,43 ± 1,52 AB (12)
Intervalo de 45 min	6,97 ± 5,60 BC (12)	18,22 ± 14,72 B (11)	4,01 ± 3,35 AB (12)
Intervalo de 90 min	9,87 ± 6,36 C (13)	17,46 ± 10,93 B (13)	5,69 ± 5,75 B (13)

*PECS = Polissacarídeo Extracelular Solúvel; PECI = Polissacarídeo Extracelular Insolúvel; PIC = Polissacarídeo Intracelular
 Tratamentos cujas médias são seguidas por letras distintas diferem estatisticamente (p<0,05).

Análise microbiológica do biofilme dental

Os resultados da tabela 4 mostram que só houve diferença significativa na contagem de lactobacilos entre o grupo controle e os grupos expostos à sacarose, mas não houve diferenças em relação aos intervalos testados. Quanto aos demais microrganismos analisados não houve diferença estatística entre os grupos de intervalo, nem destes para o grupo controle.

Tabela 4. Médias, desvios padrão e n da contagem (UFC/mg de peso úmido de biofilme) de microrganismos totais, estreptococos do grupo mutans, lactobacilos e *Actinomyces viscosus* em função dos grupos de tratamentos testados.

Grupos de Tratamentos	Contagem de microrganismos (UFC/mg de peso úmido de biofilme)			
	Totais ($\times 10^8$)	Mutans ($\times 10^2$)	Lactobacilos ($\times 10^4$)	Actinomyces ($\times 10^3$)
Controle	1,85 \pm 2,29 A (8)	1,48 \pm 2,21 A (8)	0,036 \pm 0,101 A (8)	22,5 \pm 63,6 A (8)
Sacarose 8 x /dia:				
Intervalo 15 min	1,00 \pm 1,05 A (12)	4,01 \pm 7,53 A (12)	71,7 \pm 210B (12)	68,8 \pm 149 A (12)
Intervalo 45 min	1,20 \pm 2,02 A (12)	10,2 \pm 29,1 A (12)	592 \pm 1430 B (12)	144 \pm 356 A (12)
Intervalo 90 min	1,28 \pm 2,54 A (13)	3950 \pm 12900 A (13)	21,8 \pm 25,2 B (13)	7,26 \pm 26,2 A (13)

Tratamentos cujas médias são seguidas por letras distintas diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

Desmineralização do esmalte

A maior desmineralização da superfície do esmalte foi encontrada para o grupo de exposição à sacarose com intervalo de 90 min., o qual diferiu estatisticamente do grupo controle e do grupo de exposição a cada 15 min. (Tabela 5). Todos os grupos expostos à sacarose diferiram estatisticamente do controle ($p < 0,05$). Com relação a área da lesão de cárie (ΔS) a maior desmineralização também foi observada para o grupo exposto à sacarose a cada 90 min., o qual do mesmo modo diferiu estatisticamente ($p < 0,05$) do grupo controle e do grupo de menor intervalo exposto à sacarose entretanto, o grupo de intervalo de exposição à sacarose a cada 15 min. não diferiu estatisticamente ($p > 0,05$) do controle (Tabela 5).

Tabela 5. Médias, desvios padrão e n da porcentagem de perda de dureza de superfície (% PDS) e área da lesão de cárie (ΔS) em função dos grupos de tratamentos testados.

Grupos de Tratamentos	Desmineralização do esmalte	
	% PDS	Delta S ($\text{kg}/\text{mm}^2 \times \mu\text{m}$)
Controle	-5,4 \pm 3,6 A (15)	1669,9 \pm 879,9 A (15)
Sacarose 8 x /dia:		
Intervalo 15 min	-37,2 \pm 25,1 B (15)	2716,8 \pm 1510,2 A (15)
Intervalo 45 min	-56,5 \pm 23,3 C (13)	5232,3 \pm 3024,1 B (13)
Intervalo 90 min	-71,1 \pm 12,7 C (14)	7388,9 \pm 3184,6 B (14)

Tratamentos cujas médias são seguidas por letras distintas diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

6. DISCUSSÃO

A importância da frequência de exposição à sacarose e da sua concentração na desmineralização do esmalte tem sido comprovada experimentalmente (Cury *et al.*, 1997, 2000, 2001; Aires *et al.*, 2006; Ccahauna-Vásquez *et al.* 2007). Também o efeito entre a concentração e frequência de exposição à sacarose na composição do biofilme tem sido estudada, dando contribuição para o entendimento de maior cariogenicidade da sacarose em comparação com os demais carboidratos da dieta (Cury *et al.*, 2000; Tenuta *et al.*, 2006a; Tenuta *et al.*, 2006b; Ribeiro *et al.*, 2005; Aires *et al.*, 2008; De Mazer Papa *et al.*, 2010). Entretanto, a importância dos intervalos de tempo entre as exposições à sacarose na composição do biofilme dental e na desmineralização do esmalte ainda não havia sido extensivamente estudada.

Os dados do presente trabalho mostram claramente que o intervalo de tempo entre as exposições diárias à sacarose é relevante em termos da desmineralização provocada no esmalte. Uma maior desmineralização, seja considerando a perda de dureza de superfície como a área de lesão de cárie, foi observada quanto maior o intervalo de tempo entre as oito exposições diárias a sacarose (Tabela 5), havendo diferença estatística entre a exposição a cada 90 minutos comparada com 15 minutos. Essa associação entre intervalos maiores de tempo de exposição à sacarose e desmineralização do esmalte poderia ter sido melhor explorada estaticamente através de análise de regressão, do que o teste de comparações múltiplas entre tratamentos ora realizados.

Os resultados do presente trabalho usando modelo *in situ* de longa duração estão de acordo com resultados obtidos com ratos (Bowen *et al.*, 1983) e *in situ* com modelo de placa-teste (Kashket and Yaskell, 1992b), os quais mostraram que um menor tempo de intervalo entre as exposições diárias da sacarose seria menos cariogênico que se ela fosse consumida na mesma frequência, porém em intervalos maiores.

Esses resultados podem ser explicados com relação à composição do biofilme, o desequilíbrio entre períodos de des- e remineralização do esmalte e físico-quimicamente pelo grau de saturação de Ca e P_i do fluido do biofilme, inibindo a desmineralização mesmo estando o biofilme sob baixo pH. Quando o biofilme é exposto a açúcar, há

produção de ácidos e dissolução de minerais do dente para o biofilme. O pH e concentrações de Ca e P_i no fluido do biofilme determinam a saturação desse fluido em relação aos minerais do dente. Portanto com a queda de pH o meio torna-se subsaturado em relação aos íons Ca e P_i devido a alta concentração hidrogeniônica e assim ocorre a desmineralização do esmalte. Com o aumento de Ca e P_i , o meio tende a ficar supersaturado em relação a estes íons minerais e assim mesmo estando o pH abaixo do nível crítico a perda de mineral pelo esmalte é paralisada, pois a reação tende a ocorrer no sentido de precipitação no sólido.

Os dados do presente trabalho não mostraram diferenças entre a composição microbiológica do biofilme dental e os diferentes intervalos de tempo testados entre as exposições à sacarose (Tabela 4), contrariando os dados encontrados em ratos (Bowen *et al.*, 1983). A diferença do presente trabalho e em ratos é que avaliamos o efeito na microbiota natural da cavidade bucal de humanos enquanto em ratos foi avaliado o grau de infecção por bactéria do grupo mutans inoculada na boca dos animais. Assim, é possível que os intervalos de tempo de exposição à sacarose não interfiram com a formação de uma microbiota mais complexa que é aquela formada nos biofilmes dentais em comparação com mono-espécie de mutans testado em ratos. Por outro lado, o presente trabalho confirma nossos resultados anteriores mostrando que sacarose provoca desequilíbrio de microbiota do biofilme formado com aumento de lactobacilos (Aires *et al.*, 2005; Ribeiro *et al.*, 2005; Tenuta *et al.*, 2006a; Vale *et al.*, 2007; Ccahuana-Vásquez *et al.*, 2007). Lactobacilos e bactérias do grupo mutans são selecionadas no biofilme por serem acidúricas e sobreviverem melhor em pH ácido que outras espécies bacterianas do biofilme. O intervalo de tempo entre as exposições diárias à sacarose poderia contribuir para mudar a microbiota considerando que quando o biofilme foi exposto à sacarose 8x/dia em intervalos de 15 minutos o pH hipoteticamente ficou baixo por 2 h porque quando ele começou novamente a se elevar foi feita outra exposição a sacarose. Ao contrário, quando o biofilme é exposto 8x/dia, mas a intervalos de 90 minutos o pH fica baixo por um maior período de tempo considerando a curva de Stephan que demora 30 minutos para voltar ao normal ($8 \times 30 = 240$ minutos = 4 horas). Entretanto parece que a frequência de exposição à sacarose é mais

importante que o intervalo de tempo entre as mesmas exposições para a formação de um biofilme dental cariogênico.

Entretanto, os dados do presente trabalho mostram que diferentes intervalos de tempo para uma mesma frequência de exposição à sacarose mudam a composição do biofilme em termos de polissacarídeos (Tabela 3). Assim, há uma tendência para maior concentração de PECS, PECI e PIC quanto maior o intervalo de tempo para as mesmas frequências de exposição à sacarose. Do ponto de vista estatístico, o grupo de exposição ao maior intervalo de tempo (90 min.) foi o único que diferiu do controle, assim como ele diferiu do grupo de menor intervalo quanto a PECS e PIC. Tanto os polissacarídeos extracelulares (Russel, 2009) como os intracelulares (Tanzer *et al.*, 1976) são considerados fatores de virulência dos biofilmes cariogênicos e os dados do presente trabalho mostram que um maior intervalo entre as exposições diárias a sacarose pode contribuir para formar um biofilme mais cariogênico, mudando a matriz do biofilme e intracelularmente as bactérias em termos de polissacarídeos extra e intracelulares, respectivamente. Enquanto os PEC são produzidos exclusivamente a partir da sacarose, os PIC são produzidos intracelularmente quando qualquer açúcar fermentável em excesso (fartura) é fornecido para as bactérias do biofilme dental. Assim o intervalo de exposição a outros açúcares da dieta, como glicose e frutose, deve ser considerado na cariogenicidade do biofilme dental quanto à formação de PIC dada sua importância no desenvolvimento da cárie dentária (Tanzer *et al.*, 1976).

Com relação à concentração de Ca, Pi e F nos biofilmes, o grau de saturação desses minerais no fluido dos biofilmes determinam se o esmalte vai sofrer ou não desmineralização quando o pH abaixa após a exposição a açúcar. Os dados do presente trabalho não mostram diferenças entre os intervalos de exposição à sacarose e as concentrações desses com íons, seja no fluido ou parte sólida dos biofilmes (Tabelas 1 e 2). A não diferença entre os intervalos de tempo de exposição à sacarose para as concentrações de Ca no fluido do biofilme podem ser explicadas pelo fato que os biofilmes foram coletados aproximadamente depois de 20, 17 e 13 horas da última exposição à sacarose, respectivamente para os grupos de intervalo a cada 15, 45 e 90 minutos. Se os biofilmes tivessem sido coletados imediatamente após a última exposição à sacarose para cada grupo,

provavelmente seriam encontradas diferenças, pois o grupo de intervalo de 90 minutos foi o único que diferenciou estatisticamente do controle (Tabela 3). Por outro lado, os dados do presente trabalho mostrando menores concentrações de Ca, Pi e F na parte sólida dos biofilmes expostos a sacarose em comparação ao controle confirmam nossos estudos prévios (Ccahuana-Vásquez *et al.*, 2007).

Em resumo, o presente trabalho comprova em condições próximas *in vivo* que um intervalo de tempo menor entre frequências de exposição à sacarose deve ser considerado na cariogenicidade de açúcares. A maior desmineralização do esmalte observada quanto maior o intervalo de exposição às frequências diárias a sacarose também mudou a composição do biofilme quanto aos polissacarídeos extracelulares e intracelular, explicando parcialmente os resultados obtidos. Entretanto os dados do presente trabalho não permitiram explicar se o efeito do menor intervalo de tempo entre as exposições diárias a sacarose na menor desmineralização do esmalte é devido ao maior período de tempo que o esmalte ficou em condições remineralizantes, como sugerido por Bowen *et al.* (1983), ou devido ao grau de saturação do fluido do biofilme, como sugerido por Kashket e Yaskell (1992b) quando após a primeira exposição se atingiria no fluido do biofilme uma concentração supersaturada que evitaria a desmineralização do esmalte quando das exposições subsequentes em curtos períodos de tempo.

Em conclusão, dada uma alta frequência de exposição diária a açúcar (8x/dia), intervalos de consumo mais curtos (15 min) são menos cariogênicos do que intervalos longos (90 min).

7. CONCLUSÃO

Conclui-se que o intervalo de tempo entre as exposições diárias a sacarose deve ser considerado em orientações dietéticas, pois em condição de alta frequência de exposição a esse açúcar, intervalo mais longo mudou a composição do biofilme dental formado e provocou maior desmineralização do esmalte.

REFERÊNCIAS¹

- Aires CP, Del Bel Cury AA, Tenuta LMA, Klein MI, Koo H, Duarte S, Cury JA. Effect of starch and sucrose on dental biofilm formation on root dentine desmineralization. *Caries Res.* 2008; 42: 380-6.
- Aires CP, Tabchoury CPM, Del Bel Cury AA, Koo H, Cury JA. Effect of sucrose concentration on dental biofilm formed *in situ* and on enamel demineralization. *Caries Res.* 2006; 40: 896-900.
- Ana PA, Tabchoury CP, Cury JA, Zezell DM. Effect of Er,Cr:YSGG Laser and Professional Fluoride Application on Enamel Demineralization and on Fluoride Retention *Caries Res.* 2012; 46(5): 441-51.
- Arthur RA, Del Bel Cury AA, Mattos-Graner RO, Rosalen PL, Vale GC, Paes Leme AF, et al. Genotypic and Phenotypic Analysis of *S. mutans* Isolated from Dental Biofilms Formed In Vivo Under High Cariogenic Conditions *Braz Dent J.* 2011; 22(4): 267-74.
- Bowen WH, Amsbaugh SM, Monell-Torrens S, Brunelle J, Kuzmiak-Jones H, Cole MF. A method to assess cariogenic potential of foodstuffs. *J Am Dent Assoc.* 1980; 100: 677-81.
- Bowen WH, Amsbaugh SM, Monell-Torrens S, Brunelle J. Effects of varying intervals between meals on dental caries in rats. *Caries Res.* 1983; 17: 466-71.
- Bowen WH, Do we need to be concerned about dental caries in the coming millennium? *Oral Biol Med.* 2002; 13: 126.
- Bradshaw DJ, McKee AS, Marsh PD. Effects of carbohydrates pulses and pH on population shifts within oral microbial communities *in vitro*. *J Dent Res* 1989; 68(9): 1298-302.
- Bradshaw DJ, Marsh PD. Analysis of pH-driven disruption of oral microbial communities *in vitro*. *Caries Res.* 1998; 32: 456-62.
- Brasil. Ministério da Saúde. Projeto SB Brasil 2010: Pesquisa Nacional de Saúde Bucal 2010 - Nota para imprensa. Brasília: Ministério da Saúde; 2010. Disponível em:

¹ De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseadas na norma do Internacional Committee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

<http://www.mrchip.com.br/mrchip/angelo/SBBrasil2010_Nota_Imprensa.pdf>.
Acesso: 23 maio 2011.

- Brudevold F, Attarzadeh F, Tehrani A, Van Houte J, Russo J. Development of a new intraoral demineralization test. *Caries Res.* 1984; 18: 421-9.
- Burt BA. Relative consumption of sucrose and other sugars: has it been a factor in reduce caries experience? *Caries Res.* 1993; 27 (1): 53-63.
- Carlsson J, Egelberg J. Effect of diet on early plaque formation in man. *Odontol Revy.* 1965; 16: 112-25.
- Clarkson JJ, McLoughlin J. Role of fluoride in oral health promotion. 2000; 50 (3): 119-28.
- Ccahuana-Vásquez RA, Tabchoury CPM, Tenuta LMA, Del Bel Cury AA, Vale GC, Cury JA. Effect of frequency of sucrose exposure on dental biofilm composition and enamel demineralization in the presence of fluoride. *Caries Res.* 2007; 41:9-15.
- Christian B, Evans RW. Has urbanization become a risk factor for dental caries in Kerala, India: a cross-sectional study of children aged 6 and 12 years. *Int J Paed Dent* 2009; 19: 330-7.
- Cury JA, Rebello MAB, Del Bel Cury AA. *In situ* relationship between sucrose exposure and the composition of dental plaque. *Caries Res.* 1997; 31(5): 356-60.
- Cury JA, Rebello MAB, Del Bel Cury AA, Derbyshire MTVC, Tabchoury CPM. Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in the presence of sucrose or glucose and fructose. *Caries Res.* 2000; 34: 491-97.
- Cury JA, Francisco SB, Del Bel Cury AA, Tabchoury CPM. *In situ* study of sucrose exposure, mutans streptococci in dental plaque and dental caries. *Braz Dent J.* 2001; 12: 101-4.
- Cury JA, Marques AS, Tabchoury CPM, Del Bel Cury AA. Composition of dental plaque formed in the presence of sucrose and after its interruption. *Braz Dent J.* 2003; 14: 147-52.
- De Mazer Papa AMC; Tabchoury CPM; Cury AADB; Tenuta LMA; Arthur RA; Cury JA. Effect of Milk and Soy-based Infant Formulas on In Situ Demineralization of Human Primary Enamel. *Pediatric Dentistry.* 2010; 32 (1): 35-40.
- De Stoppelaar JD, Van Houte J, Backer Dirkis O. The effect of carbohydrate restriction on the presence of *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis* and iodophilic polysaccharide-producing bacteria in human dental plaque. *Caries Res.* 1970; 4: 114-23.

- Dibdin GH, Shellis RP. Physical and biochemical studies of *Streptococcus mutans* sediments suggest new factors linking the cariogenicity of plaque with its extracellular polysaccharide content. J Dent Res. 1988; 67: 890-5.
- Dubois M, Gillis KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analyt Chem. 1956; 28: 350–6.
- Duggal M, Toumba K, Amaechi B, Kowash M, Higham S. Enamel desmineralization *In situ* with various frequencies of carbohydrate consumption with and without fluoride toothpaste. J Dent Res. 2001; 80: 1721-4.
- Dye BA, Tan S, Smith V, Lewis BG, Barker LK, Thornton-Evans G, Trends in oral health status: United States, 1988-1994 and 1999-2004. Vital Health Stat. 2007; 11(248): 1–92.
- Featherstone JD, ten Cate JM, Shariati M, Arends J. Comparison of artificial caries-like lesions by quantitative microradiography and microhardness profiles. Caries Res. 1983; 17(5):385-91.
- Fejerskov O, Manji F. Risk assessment in dental caries. In: Bader JD, ed. Risk Assessment in dentistry. Chapel Hill: University of North Carolina Dental Ecology, 1990; 17(5): 385-91.
- Fejerskov O. Concepts of dental caries and their consequences for understanding the disease. Community Dent Oral Epidemiol. 1997; 25(1): 5-12.
- Gao XJ, Fan Y, Kent RL Jr, Van Houte J, Margolis HC. Association of caries activity with the composition of dental plaque fluid. J Dent Res. 2001; 80:1834-9.
- Gold OG, Jordan HV, Van Houte J. A selective medium for *Streptococcus mutans*. Arch Oral Biol. 1973; 18(11): 1357-64.
- Gustafsson BE; Quensel CE; Swenander LL; Lundqvist C; Grahnén H; Bonow BE; Krasse B. The Vipeholm dental caries study. Acta Odontol Scand. 1954; 11: 232-364.
- Hamada S, Slade HD. Biology, Immunology, and Cariogenicity of *Streptococcus Mutans*. Microbiological Reviews. 1980; 44(2) 331-84.
- Hamilton IR Biochemical effects of fluoride on oral bacteria. J Dent Res. 1990; 69 (Spec Iss):660-7.
- Hausen H Caries prediction - state of the art. Community Dent Oral Epidemiol. 1997; 25: 87–96.
- Hausen H, Kärkkäinen S & Seppä L. Application of the high- risk strategy to control dental caries. Community Oral Epidemiol. 2000; 28: 26–34

- Hara AT; Queiroz CS, Paes Leme AF, Serra MC, Cury JA. Caries progression and inhibition in human and bovine root dentine *in situ*. *Caries Res.* 2003;37: 339-44.
- Kashket S, Yaskell T. Accumulation of enamel constituents in *Streptococcus do grupo mutans* plaque during intraoral demineralization (abstract). *Caries Res.* 1990; 24: 248 – 53.
- Kashket S, Yaskell T. Effect of timing of administered calcium lactate on the sucrose-induced intraoral demineralization of bovine enamel. *Arch Oral Biol.* 1992(a); 37: 187 – 91.
- Kashket S, Yaskell T. Limitations in intraoral demineralization of bovine enamel. *Caries Res.* 1992(b); 26: 98 – 103.
- König KG, Schmid P, Schmid R. An apparatus for frequencycontrolled feeding of small rodents and its use in dental caries experiments. *Arch Oral Biol.* 1968; 13: 13-26.
- König KG. Caries activity induced by frequency-controlled feeding of diets containing sucrose or bread to Osborne-Mendel rats. *Arch Oral Biol.* 1969; 14: 991-3.
- Koo H, Xiao J, Klein MI. Extracellular Polysaccharides Matrix — An Often Forgotten Virulence Factor in Oral Biofilm Research. *Int J Oral Sci.* 2009; 1(4): 229–34.
- Kuramitsu HK. Molecular genetic analysis of the virulence of oral bacterial pathogens: an historical perspective. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2003; 14(5): 331–44.
- Larsen MJ. Chemical events during tooth dissolution. *J Dent Res.* 1990; 69 (Spec Iss): 575-80.
- Larsen MJ, Richards A The Influence of Saliva on the Formation of Calcium Fluoride–Like Material on Human Dental Enamel *Caries Res* 2001; 35:57–60
- Larson RH. Merits and modifications of scoring rat dental caries by Keyes' method. In: Tanzer JM (ed) *Symposium on Animal Models in Cariology.* 1980. *Microbiol Abstr* 1981:195–203.
- Loesche WJ, Syed SA, Murray RJ, Mellberg JR Effect of topical acidulated phosphate fluoride on percentage of *Streptococcus do grupo mutans* and *Streptococcus sanguis* in plaque. II. Pooled occlusal and pooled approximal samples. *Caries Res.* 1975; 9:139-55.
- Loesche WJ. The rationale for caries prevention through the use of sugar substitutes. *International Dental Journal.* 1985; 35(1):1-8.
- Marsh PD. Sugar, fluoride, pH and microbial homeostasis in dental plaque. *Proc Finn Dent Soc.* 1991; 87: 515-25.
- Marsh PD. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology.* 2003; 149(2): 279–94.

- Marsh PD. Dental plaque as a microbial biofilm. *Caries Res.* 2004; 38: 204-211.
- Mattos-Graner RO, Zelante F, Line RC, Mayer MP. Association between Caries Prevalence and Clinical, Microbiological and Dietary Variables in 1.0 to 2.5-Year-Old Brazilian Children *Caries Res.* 1998; 32:319–23
- Mattos-Graner RO, Smith DJ, King WF, Mayer MP. Water-insoluble glucan synthesis by mutans streptococcal strains correlates with caries incidence in 12- to 30-month-old children. *J Dent Res.* 2000; 79:1371-7.
- McNeill K, Hamilton IR. Acid tolerance response of biofilm cells os *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiol Lett.* 2003; 221(1):25-30
- Moreno EC, Margolis HC. Composition of human plaque fluid. *J Dent Res.* 1988; 67(9): 1181-89.
- Margolis HC, Moreno EC. Composition of pooled plaque fluid from caries-free and caries-positive individuals following sucrose exposure. *J Dent Res.* 1992; 71: 1776-84.
- Newbrun E. Sucrose, the arch criminal of dental caries. *Odontol Revy.*1967; 18: 373-86.
- Nishi M, Stjernswärd J, Carlsson P, Bratthall D. Caries experience of some contries and areas expressed by significant caries index. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2002; 30(4): 296-301.
- Noro LR, Roncalli AG, Júnior FI, Lima KC. Incidência de cárie dentária em adolescentes em município do Nordeste brasileiro, 2006. *Cad Saúde Púb* 2009; 25: 783- 90.
- Paes Leme AF, Dalcico R, Tabchoury CPM, Del Bel Cury AA, Rosalen PL, Cury JA. In situ Effect of Frequent Sucrose Exposure on Enamel Demineralization and on Plaque Composition after APF application and F Dentifrice Use. *J Dent Res;* 2004 : 83(1): 71-75.
- Paes Leme AF, Koo H, Bellato CM, Bedi G, Cury JA. The Role of Sucrose in Cariogenic Dental Biofilm Formation-New Insight .*J Dent Res.* 2006; 85; 878-87.
- Paes Leme AF, Bellato CM, Bedi G, Del Bel Cury AA, Koo H, Cury JA. Effects of Sucrose on the Extracellular Matrix of Plaque-Like Biofilm Formed in vivo, Studied by Proteomic Analysis.*Caries Res.* 2008; 42: 435-43.
- Pearce E. Plaque minerals and dental caries. *N Z Dent J.* 1998; 94(415): 12-5.
- Pecharki GD, Cury JA, Paes Leme AF, Tabchoury CP, Del Bel Cury AA, Rosalen PL, et al.. Effect of sucrose containing iron (II) on dental biofilm and enamel demineralization in situ. *Caries Res.* 2005; 39(2): 123-9.

- Rankine CAN, Moreno EC, Vogel GL.: Micro –analytical determination of pH, calcium, and phosphate in plaque fluid. *J Dent res.* 1985; 64: 1275-80.
- Ribeiro CCC, Tabchoury CPM, Del Bel Cury AA, Tenuta LMA, Rosalen PL, Cury J A. Effect of starch on the cariogenic potential of sucrose. *Brit J Nutr.* 2005; 94: 44-50.
- Rölla G, Scheie AA, Ciardi JE. Role of sucrose in plaque formation. *Scand J Dent Res* 1985; 93: 105-11.
- Rölla G. Why is sucrose so cariogenic? The role of glucosyltransferase and polysaccharides. *Scand J Dent Res.* 1989; 97: 115-9.
- Rugg – Gunn AJ e Murray JJ. The role of sugar in the etiology of dental caries. The epidemiological evidence. *J Dent.* 1983; 11: 189-213.
- Russel RRB, Bacterial polysaccharides in dental plaque, in: M. Ullrich, *Current Innovations and Future Trends* (1st ed.), Bremen, Germany, 2009; 143–56
- Stephan RM. Changes in hydrogen-ion concentration on tooth surfaces and in caries lesions. *J Am Dent Assoc.* 1940; 27: 718-23.
- Svensäter G, Borgström M, Bowden GHW, Edwardsson S. The acid-tolerant microbiota associated with plaque from initial caries and healthy tooth surfaces. *Caries Res.* 2003; 37:395-403.
- Svensäter G, Larsson UB, Greif ECG, Cvitkovitch DG, Hamilton IR. Acid tolerance response and survival by oral bacteria. *Oral Microbiol Immunol.* 1997; 12:266-73.
- Tagliaferro EP, Pardi V, Ambrosano GM, Meneghim MC, Pereira AC. An overview of caries risk assessment in 0-18 year-olds over the last ten years (1997-2007). *Braz J Oral Sci* 2008; 7: 1682-90.
- Tanzer, JM.; Freedman, ML.; Woodiel, FN.; Eifert, RL.; Rinehimer, LA. Association of *Streptococcus mutans* virulence with synthesis of intracellular polysaccharide. In: Stiles, HM.; Loesche, WJ.; O'Brien, TC., editors. *Microbial aspects of dental caries.* Washington, DC: Information Retrieval; 1976; 597-616.
- Tehrani A, Brudevold F, Attarzadeh F, Van Houte J, Russo J. Enamel demineralization by mouthrinses containing different concentrations of sucrose. *J Dent Res.* 1983; 62: 1216 – 7.
- Tenuta LMA, Lima J, Cardoso C, Tabchoury CPM, Cury JA. Effect of plaque accumulation and salivary factors on enamel desmineralization and plaque composition in situ. *Pesqui Odontol Bras.* 2003; 17: 326-31.

- Tenuta LMA, Cury JA. Fluoreto: da ciência à prática clínica. In: Assed S. Odontologia para crianças e adolescentes. São Paulo, Artes Médicas. 2004
- Tenuta LMA, Ricomini AP, Del Bel Cury AA, Cury JA. Effect of sucrose on the selection of mutans streptococci and lactobacilli in dental biofilm formed in situ. *Caries Res.* 2006 (a); 40: 546-49.
- Tenuta LMA, Del Bel Cury AA, Bortolin MC, Vogel GL e Cury JA. Ca, Pi, and F in the Fluid of Biofilm Formed under Sucrose. *J Dent Res.* 2006 (b); 85: 834-8.
- Vale GC, Tabchoury CPM, Del Bel Cury AA, Arthur RA, Paes Leme AF, Cury JA. Temporal relationship between sucrose-associated change in dental biofilm composition and enamel demineralization. *Caries Res.* 2007; 41: 406-12.
- Van Houte J. Role of micro-organisms in caries etiology. *J Dent Res* 1994; 73: 672-81.
- Vogel GL, Chow LC, Brown WE. A microanalytical procedure for the determination of calcium, phosphate and fluoride in enamel biopsy samples. *Caries Res.* 1983; 17: 23–31.
- Vogel GL, Mao Y, Carey CM, Chow LC. Increased overnight fluoride concentrations in saliva, plaque, and plaque fluid after a novel two-solution rinse. *J Dent Res.* 1997; 76: 761-7.
- Wenham DG, Hennessey TD and Cole JA. Regulation of glucosyl- and fructosyltransferase synthesis by continuous cultures of *Streptococcus mutans*. *J. Gen. Microbiol.* 1979; 114:117-24.
- White DJ, Featherstone JDB: A longitudinal microhardness analysis of fluoride dentifrice effects on lesio progression in vivo. *Caries Res.* 1987; 21:502-12.
- White DJ. Reactivity of fluoride dentifrices with artificial caries I. Effects on early lesions: F uptake, surface hardening and remineralization. *Caries Res.* 1987; 21: 126-40.
- Zero DT. Sugars - The arch criminal? *Caries Res.* 2004; 38: 277-85.
- Zero DT, Van Houte J, Russo J. The intra-oral effect on enamel demineralization of extracellular matrix material synthesized from sucrose by *Streptococcus mutans*. *J Dent Res.* 1986; 65: 918-23.

Anexos

ANEXO 1 – PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**



CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "**Efeito dos intervalos de exposição à sacarose na desmineralização do esmalte e na composição do biofilme dental**", protocolo nº 194/2009, dos pesquisadores Jaime Aparecido Cury, Lívia Helena Terra e Souza e Lívia Maria Andaló Tenuta, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 19/02/2010.

The Ethics Committee in Research of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that the project "**Effect of intervals of sucrose exposure on enamel desmineralization and dental biofilm composition**", register number 194/2009, of Jaime Aparecido Cury, Lívia Helena Terra e Souza and Lívia Maria Andaló Tenuta, comply with the recommendations of the National Health Council - Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee at 02/19/2010.

Prof. Dr. Pablo Agustin Vargas
Secretário
CEP/FOP/UNICAMP

Prof. Dr. Jacks Jorge Junior
Coordenador
CEP/FOP/UNICAMP

Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição.
Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.

ANEXO 2 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Esta pesquisa intitulada “*Efeito dos intervalos de tempo entre as exposições à sacarose na desmineralização do esmalte e na composição do biofilme dental*” tem como responsável o Prof. Jaime Aparecido Cury e a aluna de mestrado Lívia Helena Terra e Souza que o convidam para participar da mesma após a apresentação do TCLE.

Justificativa para a realização da pesquisa

O intervalo de exposição a açúcar deve ser considerado na discussão do efeito da dieta no desenvolvimento de cárie, sendo necessária a realização de estudos que possam esclarecer qual o efeito dos intervalos de exposição à sacarose na desmineralização do esmalte e na composição do biofilme dental. Assim, recomendações dietéticas e ações preventivas e terapêuticas poderão ser estabelecidas para o melhor controle da cárie dental.

Objetivo da Pesquisa

Avaliar “*in situ*” o efeito do intervalo de exposição à sacarose na desmineralização do esmalte dental, por meio de análises bioquímicas, microbiológicas, de microdureza.

Procedimentos

Será realizado um estudo *in situ*, cruzado e boca-dividida, com 4 fases experimentais, do qual participarão voluntários adultos. Os mesmos utilizarão dispositivo intra-bucal contendo blocos de esmalte pré-selecionados pela dureza de superfície, sendo 2 blocos de esmalte permanente de um lado e 2 de esmalte permanente do outro lado. Os voluntários serão casualizados em 4 grupos de tratamento:

Tratamento 1: Não será utilizada sacarose (controle);

Tratamento 2: Exposição a sacarose 20%, 8 vezes ao dia com intervalos de 15 minutos entre as exposições.

Tratamento 3: Exposição a sacarose 20%, 8 vezes ao dia com intervalos de 45 minutos entre as exposições;

Tratamento 4: Exposição a sacarose 20%, 8 vezes ao dia com intervalos de 90 minutos entre as exposições

Os voluntários serão orientados a utilizar o dispositivo diariamente, inclusive para dormir e solução de sacarose a 20% será gotejada extra oralmente sobre todos os blocos 8 x/dia. A higienização será realizada com dentífrício não fluoretado durante o experimento e nos períodos de lead-in e wash-out. Ao final de cada fase, será feita a coleta do biofilme formado sobre os blocos para avaliação microbiológica e bioquímica. Para avaliação da perda mineral será determinada a dureza de superfície após o tratamento, assim como a do esmalte seccionado transversalmente.

Possibilidade de inclusão em grupo controle ou placebo

Durante o período experimental, os voluntários farão uso de dentífrício não fluoretado.

Métodos alternativos para a obtenção da informação ou tratamento

A pesquisa se propõe a estudar a composição microbiológica e o fluido do biofilme dental formado *in situ* na presença de sacarose. Este tipo de estudo tem se mostrado válido para a análise de propriedades do biofilme dental, bem como para o estudo da desmineralização do esmalte. O acúmulo de grande quantidade de placa dental, necessária para a extração do fluido da placa a ser analisado, associado à exposição à carboidratos fermentáveis, exige a utilização de um estudo *in situ*, para própria proteção dos voluntários. Ou seja, não há métodos alternativos.

Descrição crítica dos desconfortos e riscos previsíveis

Uma discreta halitose poderá ser observada durante o período experimental, eliminada por uma higiene bucal adequada. O uso das soluções de sacarose a 20% será apenas em gotas sobre os blocos de esmalte, não implicando em qualquer risco de aumento de cárie dental. O dispositivo intra-bucal pode causar um leve desconforto, que é, entretanto, semelhante ao desconforto causado por um aparelho ortodôntico móvel. O uso de dentífrício não fluoretado não traz risco aos voluntários pois estes realizarão a higiene dos seus dentes normalmente, 3 vezes ao dia. Durante todo o período da pesquisa, acompanhamentos semanais serão realizados, para verificar as condições do aparelho e da saúde bucal dos voluntários.

Descrição dos benefícios e vantagens diretas ao voluntário

Não há benefícios diretos para os sujeitos da pesquisa, entretanto considerando a prevalência de cárie ainda observada atualmente, principalmente em grupos vulneráveis, justifica-se a realização de mais estudos para que efeitos ainda não conhecidos que interferem nesse processo possam ser investigados, buscando uma solução para a doença. Como já descrito na Justificativa, este trabalho trará resultados inéditos com relação à microbiologia e bioquímica de formação da cárie, particularmente no estudo do biofilme dental

formado na presença de sacarose (mais cariogênico). Assim, os benefícios advindos da pesquisa estão intimamente relacionados à busca de conhecimentos para entender mais profundamente o processo de cárie, visando sua prevenção.

Forma de acompanhamento e assistência ao sujeito

Os pesquisadores envolvidos na pesquisa estarão à disposição dos voluntários para ajuste no aparelho intra-bucal a fim de minimizar qualquer desconforto, bem como para sanar quaisquer dúvidas.

Forma de contato com os pesquisadores e com o CEP

O voluntário poderá encontrar os professores em suas salas ou ainda no Laboratório de Bioquímica. Também estão disponíveis os seguintes telefones: 19 2106-5303 (Laboratório de Bioquímica) 19-2106-5302 (Sala do Prof. Jaime).

Garantia de esclarecimento

O voluntário receberá resposta ou esclarecimento de qualquer dúvida quanto aos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados à pesquisa. Além disso, os pesquisadores assumem o compromisso de proporcionar informação atualizada obtida durante o estudo, ainda que esta possa afetar a vontade do indivíduo em continuar participando. Qualquer dúvida ou problema com o dispositivo intrabucal, o voluntário deverá comunicar aos pesquisadores responsáveis com a maior brevidade possível.

Garantia de recusa à participação ou de saída da pesquisa

A decisão de fazer parte desta pesquisa é voluntária. O voluntário pode escolher se quer ou não participar, assim como poderá desistir de participar qualquer momento, sem qualquer punição ou prejuízo, inclusive do ponto de vista acadêmico.

Garantia de sigilo

Os pesquisadores asseguram a privacidade quanto aos dados confidenciais envolvidos na pesquisa.

Garantia de ressarcimento

Não haverá despesas previstas aos voluntários causadas pela pesquisa, mas caso haja, os voluntários serão ressarcidos, pelos pesquisadores, de eventuais despesas com o transporte alimentação para a retirada das amostras de biofilme contidas nos dispositivos.

Formas de indenização e/ou reparação de danos

Não há danos previsíveis decorrentes desta pesquisa. Entretanto, eventuais danos resultantes da participação na pesquisa são passíveis de reparação, mesmo que não previstos.

Garantia de entrega da cópia

O voluntário receberá uma cópia deste documento.

SUA ASSINATURA INDICA QUE VOCÊ LEU E ENTENDEU TODAS AS INFORMAÇÕES ACIMA E QUE DECIDIU PARTICIPAR DA PESQUISA COMO VOLUNTÁRIO.

Nome do voluntário

Assinatura do voluntário

Assinatura do pesquisador

Documento identidade: _____

ATENÇÃO: A SUA PARTICIPAÇÃO EM QUALQUER TIPO DE PESQUISA É VOLUNTÁRIA. EM CASO DE DÚVIDA QUANTO AOS SEUS DIREITOS, ESCREVA PARA O COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA FOP-UNICAMP.

Endereço: Av Limeira, 901 CEP – FOP, CEP 13.414-903 Piracicaba, SP. Fone: 19-2106-5349. e-mail: cep@fop.unicamp.br ; website: www.fop.unicamp.br/cep

ANEXO 3 – INSTRUÇÕES AOS VOLUNTÁRIOS



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

INSTRUÇÕES AOS VOLUNTÁRIOS

Orientações gerais

1. O aparelho intrabucal deve ser utilizado durante todo o dia e à noite, sendo removido da boca **apenas** durante as refeições ou quando você for comer ou beber alguma coisa.
2. Quando estiver fora da boca, **em nenhum momento o aparelho deve ser deixado à seco**. Guarde-o no porta-aparelho, com uma gaze umedecida em água.
3. Procure evitar que o dispositivo fique fora da boca por um período prolongado, restringindo-se ao tempo necessário para a alimentação.
4. Utilize apenas o(s) dentífrico(s) fornecido(s).
5. Realize a higiene bucal normalmente
6. **Não** utilize produtos para bochecho ou outros agentes tópicos de qualquer natureza na cavidade bucal durante a fase experimental.
7. **Não** beba chá preto e chá verde durante o experimento, pois eles contêm grande quantidade de flúor.
8. Quando o dentífrico (creme dental) estiver acabando, entre em contato com o pesquisador responsável para que seja reposta.

Uso do dispositivo intrabucal

1. Seu aparelho possui 4 blocos dentais.
2. O gotejamento da solução de sacarose deverá ser realizada 8 vezes ao dia, respeitando **estritamente os intervalos de 15, 45 ou 90 min., de acordo com a fase experimental**. Os horários de gotejamento estão marcados na tampa do porta-aparelho.
3. A sacarose deve estar a temperatura ambiente. Para gotejar a solução de sacarose, remova o aparelho da boca, seque com gaze a região da tela e goteje uma gota da solução sobre cada bloco, evitando tocar a ponta do conta-gotas no dispositivo para não contaminar a solução.
4. Aguarde 5 minutos e então recoloque o aparelho na boca.

5. Se acordar tarde e precisar alterar os horários de gotejamento, não há problema. Inicie os gotejamentos mais tarde, **mas matenha os intervalos e o total de 8 exposições!**
6. **O objetivo é que ocorra formação de grande quantidade de biofilme (biofilmebacteriana) sob a tela plástica; não tente remover o biofilme!**

Escovação:

1. Utilize somente creme dental fornecido.
2. Realize a escovação dos dentes 3 vezes ao dia (nem mais , nem menos) após as principais refeições: após o café (entre 7:00 e 7:30h), após o almoço (13:00h) e após o jantar (entre 20:00 e 21:00h).

Modo de escovação:

- Retire o aparelho da boca.
- Escove seus dentes e enxágüe a boca do modo como está habituado.
- Coloque mais creme dental na escova e escove o dispositivo, iniciando pela parte que entra em contato com o palato.
- Vire o dispositivo e escove a região entre os blocos e em torno da tela. Não escove sobre a tela plástica para não remover o biofilme que está se formando sob a tela. Apenas passe a espuma do creme dental sobre a tela, com a lateral da escova de dente.
- Enxágüe o dispositivo, tomando cuidado para que os jatos de água da torneira não atinjam a tela plástica de forma direta, o que pode deslocar o biofilme.

A solução deverá ser trocada às segundas, quartas e sextas-feiras. Nestes dias da semana, solicitamos a gentileza de retirar a solução de sacarose no laboratório de Bioquímica Oral.

Qualquer dúvida ou problema entre em contato pelos telefones:

2106-5303 – Laboratório de Bioquímica

2106-5393 – Sala profa. Livia

2106-5294 – Sala profa. Altair

2106-5302 – Sala profa. Jaime