



KARLA EVELYN COOK

**“EFEITO DE HIDROLISADOS DE AMIDO DE DIFERENTES  
EQUIVALENTES DE DEXTROSE NA ACIDOGENICIDADE DO  
BIOFILME E DESMINERALIZAÇÃO DENTAL”**

PIRACICABA

2013





UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

KARLA EVELYN COOK

**“EFEITO DE HIDROLISADOS DE AMIDO DE DIFERENTES  
EQUIVALENTES DE DEXTROSE NA ACIDOGENICIDADE DO  
BIOFILME E DESMINERALIZAÇÃO DENTAL”**

Orientadora: Profa. Dra. Cínthia Pereira Machado Tabchoury

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 pela aluna Karla Evelyn  
Cook, e orientada pela Profa. Dra. Cínthia P.  
Machado Tabchoury

---

Assinatura do Orientador

PIRACICABA

2013

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

C771e Cook, Karla Evelyn, 1987-  
Efeito de hidrolisados de amido de diferentes equivalentes de dextrose na acidogenicidade do biofilme e desmineralização dental / Karla Evelyn Cook. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Cíntia Pereira Machado Tabchoury.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Cárie dentária. 2. Placa dentária. 3. Cárie radicular. I. Tabchoury, Cinthia Pereira Machado, 1969- II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para a Biblioteca Digital

**Título em Inglês:** Effect of starch hydrolysates with different dextrose equivalent on biofilm acidogenicity and dental demineralization

**Palavras-chave em Inglês:**

Dental caries

Dental plaque

Root caries

**Área de concentração:** Cariologia

**Titulação:** Mestra em Odontologia

**Banca examinadora:**

Cíntia Pereira Machado Tabchoury [Orientador]

Carolina Patrícia Aires

Wander José da Silva

**Data da defesa:** 28-02-2013

**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 28 de Fevereiro de 2013, considerou a candidata KARLA EVELYN COOK aprovada.

*Cynthia Machado Tabchoury*  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. CINTHIA PEREIRA MACHADO TABCHOURY

*Carolina Patrícia Aires*  
\_\_\_\_\_

Profa. Dra. CAROLINA PATRÍCIA AIRES

*Wander José da Silva*  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. WANDER JOSÉ DA SILVA

*Aos meus pais, pelo amor incondicional  
e pela forte base que sempre me apoiou.  
Ao meu marido, pela paciência e dedicação,  
indispensáveis para a realização deste sonho.*

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha orientadora, **Profa. Dra. Cíntia Pereira Machado Tabchoury**, pelo voto de confiança desde o início, pela paciência, incentivo, dedicação, sempre com muita competência. Agradeço por todos os ensinamentos, que tanto contribuíram para meu crescimento pessoal e intelectual.

Ao **Prof. Dr. Jaime Aparecido Cury**, pelas indispensáveis contribuições e diretrizes durante todo o planejamento e execução do trabalho.

À **Profa. Dra. Altair Antoninha Del Bel Cury**, por toda contribuição para melhor execução deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Wander José Silva**, pelo tempo, atenção e toda ajuda dedicada a este trabalho.

## 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 Junior**.

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 orientação e contribuição na minha formação durante o curso de mestrado.

À **Profa. Dra. Lívia Maria Andaló Tenuta**, pelos ensinamentos que tanto contribuíram na minha formação acadêmica.

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

À **Alhetha Ratti**, pela amizade, companheirismo e indispensável colaboração nas análises de pH do biofilme nos dois experimentos.

Ao **Jerônimo Ribeiro Junior** e **Tamires Munerato**, estagiários do Laboratório de Bioquímica Oral da FOP-UNICAMP, pela ajuda técnica e amizade.

À técnica do laboratório de Prótese Parcial Removível, **Gislaine Piton**, pela presteza, sempre disponível a ajudar.

À **Ana Flávia Calvo, Alhethea Ratti, Amanda Falcão, Constanza Fernandez, Danilo Catani, Juliana Botelho, Lívia Helena T. e Sousa, Nádia Masson, Renata Cerezetti, Sandro Kusano, Tarcísio Leitão, e aos demais colegas do curso de pós-graduação em Odontologia**, pela amizade, companheirismo e agradável convivência.

Aos **voluntários** que participaram desta pesquisa, pela colaboração, cooperação e dedicação, indispensáveis para a realização deste trabalho.

À **Corn Products do Brasil**, por gentilmente ceder os hidrolisados de amido utilizados para os experimentos in vivo e in situ.

À **FAPESP** (processo 2009/13149-7) e ao **CNPq**, pela concessão da bolsa de mestrado, sem as quais a realização desse trabalho não seria possível.

## RESUMO

Subprodutos da hidrólise do amido, de diferentes equivalente de dextrose (ED), que é uma medida do seu poder redutor, têm sido largamente utilizados pela indústria de alimentos devido às suas propriedades. Embora o amido seja considerado não cariogênico ou levemente cariogênico, os hidrolisados de amido são capazes de levar a uma substancial queda no pH do biofilme dental, sugerindo desta forma um potencial cariogênico. No entanto, nenhum estudo comparou o efeito de hidrolisados de amido de diferentes EDs na desmineralização dental. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de hidrolisados de amido de diferentes EDs na desmineralização do esmalte e dentina in situ, assim como na acidogenicidade do biofilme dental formado in vivo e in situ. O estudo in vivo teve delineamento cruzado, com 6 fases experimentais e 12 voluntários. Os voluntários interromperam a higiene nos dentes posteriores por 3 dias, enquanto realizaram 5 bochechos diários com um dos seguintes tratamentos: água purificada (controle negativo); sacarose; glicose; hidrolisado de amido ED 5; hidrolisado de amido ED 20; hidrolisado de amido ED 40. As soluções de tratamento foram preparadas na concentração de 20%. No quarto dia de cada fase, o pH do biofilme dental formado in vivo foi avaliado no tempo zero (baseline) e após 5, 15, 30 e 60 min da realização de bochecho com a respectiva solução de tratamento. O experimento in situ teve delineamento cruzado e boca-dividida quanto aos tratamentos e foi conduzido em 3 fases experimentais de 14 dias. Quatorze voluntários adultos usaram dispositivo palatino contendo 8 blocos dentais, sendo 2 blocos de esmalte e 2 blocos de dentina de cada lado do dispositivo. Os voluntários foram submetidos aos seguintes tratamentos: água purificada (controle negativo), amido 2%, sacarose 10%, hidrolisado de amido ED 5 10%, hidrolisado de amido ED 20 10% e hidrolisado de amido ED 40 10%. As soluções foram extra-oralmente gotejadas sobre os blocos 8 x/dia. No 15<sup>o</sup> dia, a acidogenicidade do biofilme foi determinada (no tempo zero e 5 min após exposição às respectivas soluções daquela fase) e os blocos dentais foram coletados para análise da dureza de superfície e do bloco

seccionado longitudinalmente. No experimento in vivo, todos os tratamentos, com exceção da água, causaram significativa queda de pH após 5 minutos de bochecho, sem diferença estatística entre os hidrolisado de amido. Aos 30 min, não foram encontradas diferenças estatísticas entre os tratamentos contendo carboidratos, os quais alcançaram os níveis basais aos 60 min. No experimento in situ, todos os hidrolisados de amido levaram a quedas no pH do biofilme. Quanto à perda mineral, os hidrolisados de ED 20 e 40 causaram perdas significativamente maiores que os grupos água e amido, tanto em esmalte quanto em dentina, no entanto menores que as da sacarose. Concluindo, os hidrolisado de amido são capazes de induzir desmineralização dental em esmalte e dentina, efeito este que depende do seu equivalente de dextrose.

**Palavras-chave:** cárie dentária, placa dentária, cárie radicular.

## ABSTRACT

Byproducts of starch hydrolysis, with different dextrose equivalent (DE) numbers, which is a measure of its reducing power, have been widely employed by food industry due to their properties. Even though starch is considered non or slightly cariogenic, starch hydrolysates are able to lead to a substantial drop in the biofilm pH, suggesting a cariogenic potential. However, no study compared the effect of starch hydrolysates with different DEs on dental demineralization. Thus, the objective of this work was to evaluate the effect of starch hydrolysates with different DEs on enamel and dentin demineralization in situ, as well as the acidogenicity of dental biofilm formed in vivo and in situ. The in vivo study had a crossover design, with 6 experimental phases and 12 volunteers. The volunteers refrained from oral hygiene of the posterior teeth for 3 days, while rinsed 5 x/day with one of the following treatments: purified water (negative control); sucrose, glucose, starch hydrolysate DE 5, starch hydrolysate DE 20, starch hydrolysate DE 40. The solutions were prepared at 20%. On the 4<sup>th</sup> day of each phase, the pH of the biofilm formed in vivo was evaluated at time zero (baseline) and after 5, 15, 30 and 60 min of the rinsing with the respective treatment solution. The in situ experiment had a crossover and split-mouth design, regarding the treatments, and was carried out in 3 experimental phases of 14 days. Fourteen volunteers wore a palatal device containing 8 dental slabs, 2 enamel and 2 dentine slabs on each side of the device. The volunteers were submitted to the following treatments: purified water (negative control), 2% starch, 10% sucrose, 10% starch hydrolysate DE 5, 10% starch hydrolysate DE 20 and 10% starch hydrolysate DE 40. The solutions were extra-orally dripped over the slabs 8 x/day. On the 15<sup>th</sup> day, the biofilm acidogenicity was measured (baseline and 5 min after exposure to the respective solutions of that phase) and the dental slabs were collected for determination of surface and cross-sectional hardness. In the in vivo experiment, all treatments, except water, caused significant pH drops 5 min after rinsing, with no statistical difference among the starch hydrolysates. At 30 min, no statistically significant

differences were found among the carbohydrate-containing treatments, which reached baseline pH values at 60 min. In the in situ experiment, all starch hydrolysates lowered the biofilm pH. Regarding mineral loss, the starch hydrolysates DEs 20 and 40 caused significantly higher losses than water and starch, either to enamel or dentine, however lower than sucrose. In conclusion, the starch hydrolysates are capable of inducing enamel and dentine demineralization, which depends on their dextrose equivalent.

**Key-words:** dental caries, dental plaque, root caries.

## **SUMÁRIO**

|                                 |           |
|---------------------------------|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b>            | <b>1</b>  |
| <b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> | <b>3</b>  |
| <b>3. PROPOSIÇÃO</b>            | <b>10</b> |
| <b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b>    | <b>11</b> |
| <b>5. RESULTADOS</b>            | <b>25</b> |
| <b>6. DISCUSSÃO</b>             | <b>32</b> |
| <b>7. CONSIDERAÇÕES GERAIS</b>  | <b>38</b> |
| <b>8. CONCLUSÃO</b>             | <b>39</b> |
| <b>REFERÊNCIAS</b>              | <b>40</b> |
| <b>APÊNDICES</b>                | <b>47</b> |
| <b>ANEXO</b>                    | <b>59</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

O amido é o principal carboidrato na dieta humana e durante o preparo dos alimentos, a sua molécula pode sofrer alterações pelo calor e força mecânica, o que permitiria maior ação da  $\alpha$ -amilase salivar, iniciando a digestão deste carboidrato ainda na cavidade oral e disponibilizando moléculas menores para a metabolização pelos microrganismos do biofilme dental (Grenby, 1997; Lingstrom *et al.*, 2000; Ettinger, 2005). Em relação à cárie dental, o amido é considerado não-cariogênico para esmalte (Firestone *et al.*, 1982; Ribeiro *et al.*, 2005; Thurnheer *et al.*, 2008) ou levemente cariogênico para dentina (Lingstrom *et al.*, 1994; Aires *et al.*, 2008) quando consumido como a única fonte de carboidrato da dieta. Por outro lado, Grenby (1997) relatou aumento do risco de cárie no indivíduo quando o amido consumido sofreu algum tipo de processamento, como cozimento.

Os hidrolisados de amido, como as maltodextrinas e xaropes de glicose, resultam da hidrólise enzimática ou ácida do amido (Moynihan, 1998; Moore *et al.*, 2005), processo que pode ser controlado, permitindo prever a proporção de glicose (dextrose), maltose, maltotriose, oligossacarídeos e polissacarídeos no produto final (Grenby & Mistry, 2000). Desta forma, o equivalente de dextrose (ED) destes produtos é a medida de seu poder redutor, usado para distinguir entre os diferentes hidrolisados gerados. Entretanto, não há ainda um consenso quanto à classificação dos produtos da hidrólise do amido; Kearsley & Dziedzic (1995) denominam de maltodextrinas os hidrolisados de ED inferior a 20, xarope de glicose aqueles de ED entre 20 e 75 e simplesmente hidrolisados de amido aqueles com ED superiores a 75. Já na Legislação Brasileira de alimentos, maltodextrina é uma subclassificação de oligossacarídeos com grau de polimerização maior que 10 (Henriques, 2007).

Hidrolisados de amido de diferentes EDs têm sido largamente utilizados pela indústria de alimentos, devido às diferentes características que estes produtos adquirem

com o processo. Eles inibem a cristalização, controlando o ponto de congelamento, agem na viscosidade, consistência, estabilidade e volume, facilitam a reconstituição de alimentos desidratados (Levine, 1998, Moore *et al.*, 2005) e servem de substitutos das gorduras (Cummings & Stephen, 2007). Não são utilizados como adoçantes, pois são virtualmente insípidos e inodoros, mas podem ser utilizados no incremento calórico de alimentos, sem alteração das características sensoriais (Levine, 1998). Podem fazer parte de alimentos, como por exemplo, fórmulas infantis, bebidas esportivas, refrigerantes, sobremesas, suplementos para condições especiais, como diabetes, desnutrição, entre outros (Moynihan, 1998, Cummings & Stephen, 2007).

A acidogenicidade de hidrolisados de amido de forma isolada ou presente em alimentos tem sido relatada (Abelson, 1989; Moynihan *et al.*, 1996a; Moynihan *et al.*, 1996b; Al-Khatib *et al.*, 2001) e foi observado que estes produtos podem ser metabolizados no biofilme dental, levando a quedas de pH. Em relação à cárie dental, trabalho prévio (Papa *et al.*, 2010) mostrou que fórmula infantil à base de soja contendo apenas hidrolisado de amido como fonte de carboidrato levou à significativa desmineralização do esmalte dental decíduo, assim como resultou em queda de pH do biofilme semelhante àquela do grupo controle positivo (sacarose). No entanto, o hidrolisado de amido presente não estava identificado quanto ao seu ED e a fórmula infantil avaliada continha vários outros ingredientes, os quais poderiam interferir nos resultados obtidos. Em acréscimo, considerando a maior expectativa de vida da população e também um maior número de dentes e superfícies de dentina radicular expostas na cavidade bucal destes indivíduos (Jones, 1995; Curzon & Preston, 2004), torna-se importante também avaliar a ação dos hidrolisados em dentina, substrato dental com mineral mais solúvel que o do esmalte e desta forma mais susceptível à desmineralização (Hoppenbrouwers *et al.*, 1987). Assim, o presente estudo tem como objetivo avaliar a cariogenicidade de hidrolisados de amido de diferentes EDs na desmineralização do esmalte e dentina, assim como a acidogenicidade do biofilme dental formado *in vivo* e *in situ*.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. AMIDO E HIDROLISADOS DE AMIDO

A principal fonte de energia para o metabolismo celular humano é o amido (Whistler & BeMiller, 1999; Ettinger, 2005). Entretanto, raramente ele é consumido cru, necessitando de alguma modificação física e/ou química que permita sua digestibilidade, como por exemplo, o cozimento, gelatinização ou a hidrólise. As fontes vegetais mais comumente utilizadas para extração do amido são o milho, batata, trigo, arroz e mandioca (Kearsley & Dziedzic, 1995; Marchal *et al.*, 1999). O processamento do amido, além de atender a demanda da indústria de alimentos e farmacêutica, também confere valor agregado às fontes vegetais, aumentando seu valor comercial. Nos Estados Unidos, por exemplo, o processo de hidrólise é o destino de cerca de 50% do amido produzido no país (Surmely *et al.*, 2003). A hidrólise do amido pode ser enzimática ou ácida. O processo enzimático permite a produção de vários subprodutos numa mesma linha de produção, entre polímeros de alto peso molecular e pequenas unidades de glicose, devido à característica das enzimas de quebrar ligações específicas, permitindo a produção de hidrolisados com perfil de açúcares desejado. Há disponível comercialmente uma grande variedade de enzimas, sendo necessário então, avaliar a fonte vegetal do amido para escolher a enzima mais adequada devido ao custo elevado do processo (Surmely *et al.*, 2003). Já a hidrólise ácida tem como maior vantagem o seu baixo custo quando comparada à hidrólise enzimática. Entretanto, a qualidade do hidrolisado é inferior, pois a quebra do amido ocorre em pontos aleatórios da molécula, produzindo polímeros de tamanhos variados, impossibilitando um controle fino do processo (Palmer, 1970; Surmely *et al.*, 2003). Também há significativa formação de sal durante a neutralização da reação, além do maior gasto de energia, pois a solução deve ser aquecida sob alta pressão. Se o processo de hidrólise for completo, ou seja, se todas as ligações glicosídicas da molécula de amido forem rompidas, resulta em uma solução contendo apenas monômeros de glicose, produto conhecido como xarope de glicose (Surmely *et al.*, 2003).

Os sub-produtos da hidrólise do amido são classificados quanto ao valor de ED, que representa o seu poder redutor. Essa classificação considera a porcentagem de poder redutor comparado com a glicose (dextrose), portanto, o amido não hidrolisado tem valor de ED próximo de zero. Em contraste, se a hidrólise do amido for completa, 100% das moléculas estarão na forma monomérica, portanto, o ED será 100. O equivalente de dextrose é um valor que também se relaciona com o grau de polimerização (GP) das moléculas, segundo a equação:  $ED = 100 / GP$ , considerando que tanto o ED quanto o GP são valores médios das moléculas produzidas (Whistler & BeMiller, 1999). O GP é uma forma simplificada de descrever o conteúdo dos açúcares dos hidrolisados, que considera o número de unidades de glicose de cada polímero (Kearsley & Dziedzic, 1995). Entretanto, vale ressaltar que a fonte vegetal do amido e também o tipo de hidrólise empregada, ácida ou enzimática, vai influenciar nas características dos hidrolisados ao ponto de dois ou até três produtos com o mesmo valor de ED apresentarem perfil de açúcares completamente diferentes, e conseqüentemente, diferentes propriedades (Palmer, 1970; Kearsley & Dziedzic, 1995; Marchal *et al.*, 1999; Whistler & BeMiller, 1999). Hidrolisados de amido produzidos por hidrólise ácida, por exemplo, apresentam maior proporção de polissacarídeos de alto peso molecular que hidrolisados de amido de mesmo ED, mas hidrolisado enzimaticamente. A hidrólise enzimática, por sua vez, produz cadeias de menor peso molecular, contribuindo para a maior solubilidade (Kennedy *et al.*, 1995).

Não há consenso quanto à classificação, mas hidrolisados com ED de até 20 são comumente chamados de maltodextrinas, produtos de ED entre 20 e 75 são os xaropes de glicose, enquanto os produtos de maior ED são denominados simplesmente como hidrolisados de amido. Os produtos com ED de até 30 são mais comuns na forma de “spray dried”, processo que transforma o xarope de glicose em um pó branco. Produtos com ED entre 30 e 45 podem ser encontrados das duas formas (xarope ou em pó), enquanto que produtos com ED superior a 45 são mais comumente, mas não exclusivamente, comercializados na forma de xarope (Kearsley & Dziedzic, 1995). Para

determinação do valor de ED, há diferentes técnicas descritas, desde métodos que avaliam a viscosidade do hidrolisado (Dokic *et al.*, 2004), o ponto de congelamento (Rong *et al.*, 2009), a quantidade de pontas redutoras disponíveis (Moore *et al.*, 2005), pelo método da cromatografia líquida de alta performance (Kennedy *et al.*, 1995), entre outros.

A indústria explora as características físico-químicas dos subprodutos da hidrólise do amido, de acordo com sua necessidade. A sua ausência virtual de odor e sabor muito suave é muito útil na indústria farmacêutica como veículo para as substâncias ativas e na indústria de alimentos, pois não altera o sabor dos alimentos processados. A indústria alimentícia faz uso dos hidrolisados de amidos de diversas maneiras: utilizando-a como substituto para ingredientes mais caros, como a lactose; diminuir a compactação (perda de volume) que ocorre naturalmente nos alimentos durante o armazenamento; favorecer a reconstituição (solubilização) de alimentos desidratados; elevar o valor calórico; diminuir a doçura, melhorando a palatabilidade, adequar a viscosidade, coloração, atingir ponto de congelamento, aumentar o tempo de armazenamento, a estabilidade ao calor, entre outros (Whistler & BeMiller, 1999). Sua utilização está relacionada à extensão da hidrólise, pois hidrolisados de amido com ED próximo a 20 são levemente adocicados e mais solúveis, e aqueles de menor ED apresentam maior viscosidade, menor tendência de absorver a umidade do ar (higroscopia), o que permite sua utilização também como substituto de óleos e gorduras, diminuindo em até 96% o valor calórico dos alimentos.

A utilização dos hidrolisados de amido pela indústria de alimentos leva em consideração o ED, o GP e o peso molecular médio dos polímeros, pois todas essas características influenciam nas propriedades químicas e físicas dos produtos finais. Com intuito de diminuir a quantidade de sacarose, melhorando a palatabilidade dos refrigerantes, xarope de glicose tem sido utilizado nos EUA, preferencialmente aqueles de baixo ED. Já para o preparo de caldas para frutas enlatadas, xaropes de maiores ED são mais indicados, devido à sua maior doçura. O ponto de fervura depende diretamente do peso molecular. Xaropes de alto ED (e baixo peso molecular médio) são utilizados para

elevar o ponto de fervura e diminuir o ponto de congelamento. Sorvetes cremosos, por exemplo, necessitam de grande diminuição do ponto de congelamento. A viscosidade dos xaropes vai depender do conteúdo de sólidos e da temperatura de armazenamento, por isso é comum que o xarope cristalize quando mantido em temperatura ambiente, podendo voltar à forma líquida por simples aquecimento (Kearsley & Dziedzic, 1995).

Em geral, tanto para maltodextrinas, xaropes de glicose e hidrolisados, quanto maior o ED, menor será o peso molecular médio das cadeias de polissacarídeos; entretanto, outros fatores devem ser avaliados, como a fonte vegetal e processo de hidrólise. Mesmo assim, hidrolisados produzidos da mesma maneira, mas em épocas diferentes também podem diferir ligeiramente no valor de ED, por isso os fabricantes indicam uma margem de ED, por exemplo, se o ED deve ser 42, no rótulo constará ED entre 40 e 44 (Kearsley & Dziedzic, 1995).

## 2.2. CARIOGENICIDADE DO AMIDO E SEUS DERIVADOS

A relação entre o consumo de amido e o seu papel no desenvolvimento de lesões cáries ainda não está totalmente elucidado (Lingstrom *et al.*, 2000). O amido é considerado não cariogênico ou pouco cariogênico (Grenby, 1997; Lingstrom *et al.*, 2000). Esta afirmação é suportada por estudos epidemiológicos em jovens de 12 anos em diferentes países cuja alimentação se baseia no amido, demonstram que este carboidrato não é cariogênico, ou pouco cariogênico, quando o amido é consumido em 3 refeições por dia (Sreebny, 1983; van-Palenstein-Helderman *et al.*, 1996), em estudos em ratos (Thurnheer *et al.*, 2008), *in vitro* (Thurnheer *et al.*, 2008), e *in situ* em esmalte (Lingstrom *et al.*, 1994; Ribeiro *et al.*, 2005) e dentina (Lingstrom *et al.*, 1994; Aires *et al.*, 2008). Entretanto, devido às diferentes metodologias utilizadas por estes estudos e diferentes interpretações dos dados, ainda é possível questionar se esta afirmação é totalmente verdadeira. Durante a alimentação, o amido presente nos alimentos entra em contato

com a saliva, onde a enzima  $\alpha$ -amilase salivar inicia a digestão dos carboidratos ainda na cavidade oral (Ettinger, 2005). Desta forma, amidos e polímeros de glicose podem ser rapidamente quebrados em di e trissacarídeos, ficando disponíveis para bactérias orais que utilizam maltose como fonte energética (Lingstrom *et al.*, 2000). Grenby (1997) e Lingstrom *et al.* (2000) afirmam também que os amidos processados, ou seja, aqueles que sofreram cozimento ou gelatinização, comuns na dieta atual, têm maior potencial cariogênico devido à diminuição das cadeias de polissacarídeos a tamanhos que podem ser mais facilmente degradados. Ainda que trabalhos anteriores indiquem a não cariogenicidade do amido em esmalte, Aires *et al.* (2008) mostrou *in situ*, que para a dentina, essa afirmação não é verdadeira, encontrando perdas de 20% na dureza mineral de superfície provocadas pelo amido solúvel.

Atualmente, devido os avanços da indústria de alimentos, o consumo do amido processado se dá muitas vezes junto à sacarose (Lingstrom *et al.*, 2000). A sacarose é um dissacarídeo, formado por uma molécula de glicose unida a uma molécula de frutose (Nelson & Cox, 2002). A cariogenicidade da sacarose tem sido largamente estudada (Marsh, 1991; Cury *et al.*, 1997; 2000, Zero, 2004; Aires *et al.*, 2006; Paes Leme *et al.*, 2006), e é considerada o carboidrato mais cariogênico, servindo como referência aos trabalhos que visam identificar o potencial de causar desmineralização dental de outras substâncias. Já o potencial cariogênico dos hidrolisados de amido foi estudado indiretamente, pela acidogenicidade destes carboidratos no biofilme dental. O potencial acidogênico de soluções a 10% de hidrolisados de amido de variados valores de ED foi avaliado *in vitro* por Al-Khatib *et al.* (2001), que encontraram que todos os hidrolisados provocaram queda de pH no biofilme, porém a valores significativamente menores que a sacarose. Soluções a 10% de hidrolisados de amido em água, leite ou um substituto de leite à base de colágeno não diferiram no potencial cariogênico entre si, entretanto, todas foram capazes de provocar queda de pH da placa dental a valores abaixo de 5,5 (valor aproximado do pH crítico do esmalte), mostrando que não há diferença no que diz respeito ao veículo para consumo deste hidrolisado (Moynihan *et al.*, 1996a).

Em um trabalho *in vitro* utilizando biofilme monoespécie de *S. mutans*, Duarte *et al.* (2008) apontam a influência do amido quando adicionado à sacarose na composição e estrutura da matriz de polissacarídeos do biofilme dental, além de modificar a expressão genética bacteriana, podendo aumentar o potencial cariogênico do biofilme. Ainda, o efeito *in situ* da associação de amido e sacarose na desmineralização de esmalte decíduo foi avaliado por Ribeiro *et al.* (2005), sendo que o amido isolado não foi cariogênico, entretanto, a associação deste com a sacarose provocou maior perda mineral que a sacarose isoladamente, mostrando efeito sinérgico da associação.

Aires *et al.* (2008) demonstraram *in situ* que para a dentina, o amido solúvel é capaz de provocar perdas minerais, mesmo que menores que a sacarose, porém ainda importantes, considerando uma dieta baseada neste carboidrato. Entretanto, neste trabalho não foi encontrado efeito sinérgico da associação de amido com a sacarose, assim como não foi encontrado por Thurnheer *et al.* (2008) ao avaliar em biofilme multi-espécie aderidos em discos de esmalte e em modelo animal, com utilização de ratos, o papel do amido associado à glicose e sacarose. Já Ribeiro *et al.* (2005) haviam encontrado *in situ*, um aumento na cariogenicidade da sacarose quando adicionado amido, em esmalte. Aires *et al.* (2008) apontam as diferenças na evolução das lesões cariosas como principal causa desses resultados conflitantes, pois a desmineralização do esmalte se dá de forma proporcional ao tempo, enquanto que a dentina desmineraliza rapidamente na primeira semana, com diminuição da velocidade da progressão da lesão após 7 dias (Ogaard *et al.*, 1988).

Produtos da hidrólise do amido são mais comumente consumidos como ingredientes de alimentos industrializados, o que motivou pesquisas a respeito do potencial cariogênico de fórmulas infantis (Moynihan *et al.*, 1996b; Danchaivijitr *et al.*, 2006), que compararam fórmulas com lactose ou com hidrolisados de amido como fonte de carboidratos, e encontraram maior queda de pH em biofilmes expostos às fórmulas com hidrolisados de amido. Esses resultados estão de acordo com aqueles encontrados

por Papa *et al.* (2010), que avaliaram *in situ*, o potencial de queda de pH de fórmulas infantis e a influência na composição microbiológica e bioquímica do biofilme dental formado sobre esmalte decíduo. A fórmula contendo apenas hidrolisado de amido provocou maior desmineralização, devido à queda de pH provocada, que também aumentou as contagens de lactobacilos, quando comparada com a fórmula contendo lactose como fonte de carboidrato.

Além das dúvidas que ainda existem em relação à cariogenicidade do amido, pouco se conhece sobre o papel dos seus hidrolisados no desenvolvimento da cárie, pois os poucos trabalhos disponíveis que avaliaram os hidrolisados de amido isoladamente, sem outros ingredientes, testaram somente a acidogenicidade destes carboidratos (Grenby & Mistry, 2000; Al-Khatib *et al.*, 2001). Para avaliar o efeito de hidrolisados de amido *in situ* no presente trabalho, optou-se por utilizar substratos dentais extraídos de incisivos bovinos. A substituição de substratos dentais humanos em estudos de progressão e inibição da cárie tem ocorrido, principalmente devido à dificuldade de se obter dentes humanos, assim como pela maior homogeneidade de resposta do dente bovino. Estudos demonstraram que a progressão e inibição da cárie em esmalte e dentina humana é similar à do esmalte e dentina bovinos, permitindo a utilização do substrato bovino na predição do efeito *in vivo* (Mellberg 1992, Hara *et al.*, 2003, Rehder-Neto *et al.*, 2010). Ainda, é importante ressaltar que com o aumento da expectativa de vida e maior retenção dos dentes pelos indivíduos, há conseqüentemente um aumento na prevalência de cárie radicular. Desta forma, torna-se importante estudar o papel dos hidrolisados de amido também neste substrato dental. O efeito destes carboidratos na cariogenicidade tanto em esmalte quanto em dentina ainda não foi verificado na literatura, fazendo-se necessário o desenvolvimento deste trabalho.

### **3. PROPOSIÇÃO**

O objetivo deste trabalho foi avaliar a cariogenicidade de hidrolisados de amido de diferentes EDs (ou graus de hidrólise). Para tal, foram realizados 2 estudos, o primeiro in vivo, para avaliar o potencial acidogênico dos hidrolisados de amido em biofilme formado sob exposição a estes carboidratos e o segundo in situ, para avaliar a desmineralização do esmalte e dentina e acidogenicidade do biofilme dental formado nestas condições.

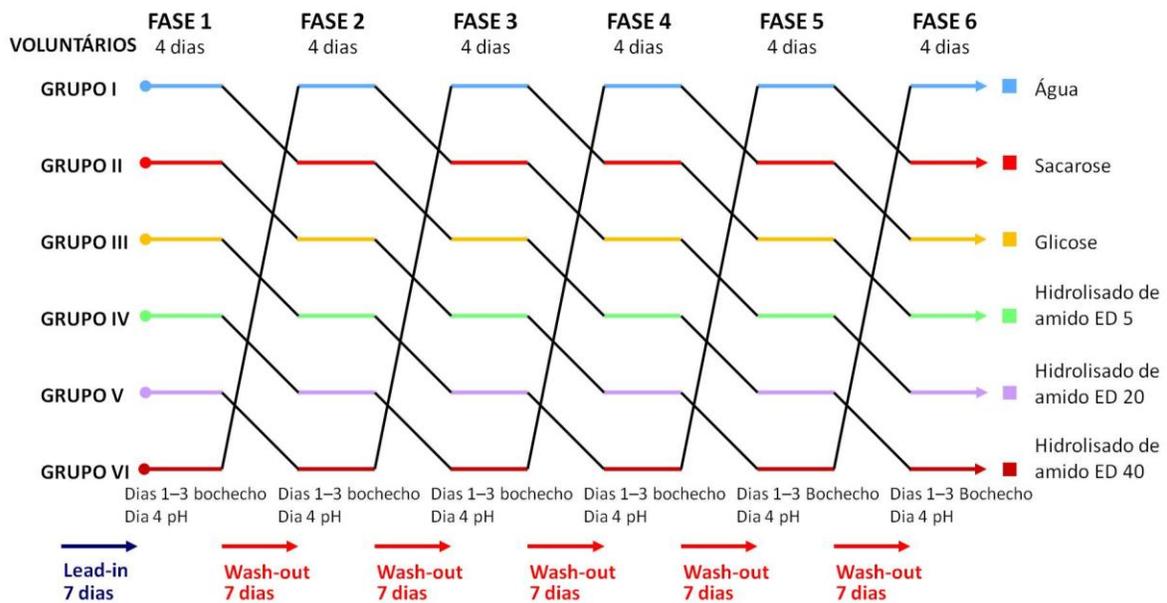
## 4. MATERIAL E MÉTODOS

A presente descrição de Material e Métodos está dividida entre os dois estudos realizados: Experimento in vivo e Experimento in situ.

### 4.1. EXPERIMENTO *in vivo*

#### 4.1.1. *Delineamento Experimental*

Foi conduzido um estudo in vivo, com desenho cruzado e cego em relação ao examinador. Doze voluntários adultos participaram neste estudo e foram submetidos aos seguintes tratamentos: água purificada (controle negativo); soluções de sacarose, glicose, hidrolisado de amido ED 5, hidrolisado de amido ED 20 e hidrolisado de amido ED 40 (Figura 1), todas na concentração de 20%. As soluções de sacarose e glicose tiveram a função de controles neste estudo. O experimento teve a duração de 6 fases experimentais de 4 dias cada, sendo que nos três primeiros dias, foi solicitado aos voluntários que bochechassem 15 mL da solução de tratamento cinco vezes ao dia, em horários pré-determinados, para estimular a formação do biofilme dental, e que não escovassem os dentes molares e pré-molares superior e inferior. No quarto dia, após jejum de 2 h, o pH do biofilme dental formado foi determinado (pH baseline) com um microeletrodo de contato acoplado a um eletrodo de referência e a um peagômetro. Logo em seguida os voluntários fizeram bochecho com a solução de tratamento da respectiva fase em que se encontravam e após 5, 15, 30 e 60 min do bochecho, o pH do biofilme foi novamente medido para avaliação da curva de queda de pH resultante de cada tratamento. Durante as fases experimentais e os intervalos de wash-out, os voluntários fizeram uso de dentifício fluoretado fornecido pelos pesquisadores e não utilizaram fio dental.



**Figura 1.** Esquema ilustrativo do delineamento cruzado do experimento in vivo.

#### 4.1.2. Seleção dos Voluntários

Para o experimento in vivo, foram selecionados 12 voluntários, adultos saudáveis, de 21 a 39 anos, de ambos os gêneros (3 homens e 9 mulheres) com boa saúde geral e oral (CPOD médio de  $2,9 \pm 3,3$ ), sem lesões de cárie ativas, gengivite e periodontite, que não faziam uso de aparelho ortodôntico, não fumantes e que não tinham consumido antibióticos ou medicamentos que pudessem afetar o fluxo salivar, pelo menos 1 mês antes do início da fase experimental e durante todo o experimento. Os voluntários eram residentes de Piracicaba, SP, cidade com água de abastecimento otimamente fluoretada (0,6 a 0,8 ppm F).

Atendendo às considerações éticas, os voluntários receberam esclarecimento verbal e por escrito sobre os objetivos e procedimentos da pesquisa (Apêndice 1). Uma reunião entre os pesquisadores e voluntários foi realizada para melhor explanação sobre a pesquisa e sanar as dúvidas. Aqueles que estavam de acordo, assinaram um Termo de

Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice 2), aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - FOP-UNICAMP (Anexo) e atendendo à Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional da Saúde.

#### *4.1.3. Preparo das Soluções de Tratamento*

As soluções de sacarose e glicose foram preparadas utilizando reagentes puros da marca Merck. As soluções de hidrolisados de amido foram preparadas a partir de produtos gentilmente cedidos pela indústria Corn Products, sendo que foram escolhidos hidrolisados de amido com diferentes aplicações industriais, portanto, de ED igual a 5, 20 e 40. Para o preparo das soluções de hidrolisados, água purificada foi aquecida para facilitar a dissolução dos mesmos.

#### *4.1.4. Fase Clínica*

Na primeira fase experimental, os voluntários foram casualizados em relação aos grupos de tratamentos descritos abaixo e depois seguiram a ordem dos tratamentos conforme o delineamento descrito na Figura 1.

- Água purificada (controle negativo)
- Solução de sacarose 20%
- Solução de glicose 20%
- Solução de hidrolisado de amido ED 5 20%
- Solução de hidrolisado de amido ED 20 20%
- Solução de hidrolisado de amido ED 40 20%

No estudo in vivo, foram realizadas 6 fases experimentais, cada uma com duração de 4 dias cada. Neste período, os voluntários interromperam a escovação dos dentes posteriores (molares e pré-molares) superiores e inferiores. Durante os três primeiros dias, os voluntários fizeram 5 bochechos diários em horários pré-determinados (8 h, 10 h, 14 h, 16 h e 18 h) com as soluções de tratamento e duração de 15 s (Del Bel Cury *et al.*, 1994; Rebelo Vieira *et al.*, 2002). Diariamente foram entregues frascos com 15 mL da solução de tratamento da respectiva fase. Em cada horário de bochecho era utilizada uma solução de tratamento nova, que era descartada após o bochecho. No quarto dia, pela manhã, após aproximadamente 12 h do último bochecho, e em jejum de pelo menos 2 horas (Rebelo Vieira *et al.*, 2002), o pH do biofilme no tempo zero (baseline) foi determinado e logo em seguida os voluntários realizaram bochecho durante 1 min com a solução de tratamento da respectiva fase experimental, aguardaram mais 4 min, sendo que o pH do biofilme foi novamente determinado após 5, 15, 30 e 60 min do bochecho. O pH foi mensurado nos mesmos locais em cada intervalo de tempo. Para isso, foi utilizado microeletrodo de contato (Beetode<sup>®</sup> MEPH3L, WPI, USA) acoplado a um eletrodo de referência (Orion Res Inc, modelo 900100) e a um peagômetro (Procyon Inst Cient SA 720). Uma ponte salina foi estabelecida entre o eletrodo de referência e o dedo do voluntário, usando uma solução de KCl 3 M (Lingström *et al.*, 1994). O microeletrodo foi calibrado com soluções padrões de pH 4,0 e 7,0 antes da avaliação de cada voluntário, assim como entre as medidas, quando necessário. A média de pH dos dois locais de avaliação, superior e inferior, foi calculada para todos os voluntários e tempos. Com esses dados, foi possível determinar a curva de pH para cada solução testada.

#### *4.1.5. Análise Estatística*

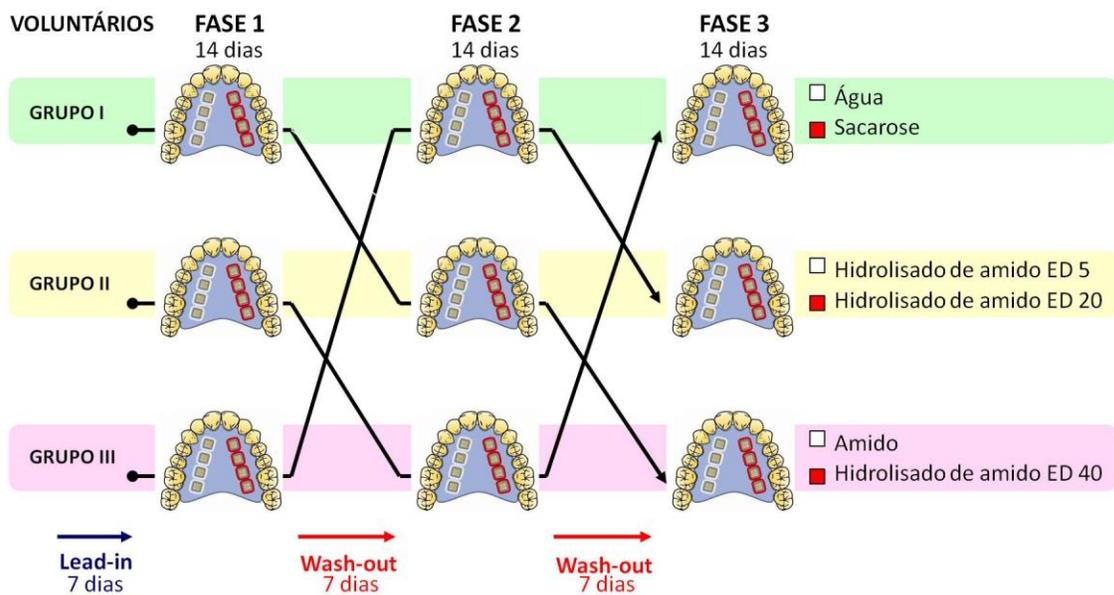
Os tratamentos foram comparados em cada tempo que o pH foi determinado pela Análise de Variância, e as diferenças estatísticas foram avaliadas pelo teste de Tukey HSD.

Os voluntários foram considerados blocos estatísticos. Foi adotado neste estudo o nível de significância  $\alpha = 0,05$  e utilizado o Software STATISTICA, Version 10. StatSoft, Inc (2011), USA.

## 4.2. EXPERIMENTO *in situ*

### 4.2.1. Delineamento Experimental

Foi realizado um estudo *in situ*, com delineamento cruzado, cego em relação ao examinador e boca-dividida em relação aos tratamentos. O estudo foi conduzido em 3 fases experimentais de 14 dias de duração cada e 14 voluntários adultos utilizaram um dispositivo intra-oral palatino contendo 8 blocos dentais bovinos (de cada lado do dispositivo havia 4 blocos, sendo 2 de esmalte e 2 de dentina) com dureza de superfície pré-determinada. No início do experimento, os voluntários foram divididos aleatoriamente em 3 grupos (Figura 2), com os seguintes tratamentos combinados na mesma fase: água (controle negativo) e sacarose (controle positivo); hidrolisado de amido ED 5 e hidrolisado de amido ED 20; amido (controle ativo) e hidrolisado de amido ED 40. As soluções de sacarose e hidrolisados de amido foram preparadas na concentração de 10%, e a de amido a 2%. Os tratamentos foram realizados pelo gotejamento das soluções sobre os blocos dentais 8 x/dia, em horários pré-determinados. Após 5 min, os voluntários recolocaram o dispositivo na cavidade oral. A higienização oral durante todo o experimento foi realizada com dentífrício não fluoretado. No 15<sup>o</sup> dia da fase experimental, após aproximadamente 12 h do último tratamento, o pH do biofilme foi determinado no tempo zero (baseline) e após 5 min do gotejamento com as soluções daquela respectiva fase. Os blocos dentais foram coletados e analisados por dureza de superfície e do bloco seccionado transversalmente. Os resultados foram analisados estatisticamente, considerando os voluntários como unidade experimental.



**Figura 2.** Esquema ilustrativo do delineamento cruzado do experimento in situ.

#### 4.2.2. Obtenção dos Blocos Dentais

Blocos de esmalte e dentina foram obtidos a partir de incisivos bovinos, os quais permaneceram armazenados em solução de formol 2% pH 7,0 por pelo menos 30 dias para desinfecção antes de qualquer experimento (White, 1987). Em seguida, a fim de excluir os dentes que apresentassem algum defeito, os mesmos foram examinados visualmente com auxílio de lupa (aumento de 10 X) e aqueles que apresentaram fraturas, trincas ou hipoplasias não foram utilizados.

Para a confecção dos blocos dentais, foi utilizada cortadeira elétrica (Buehler-Isomet) e dois discos diamantados de dupla face (Buehler® Diamond Wafering Blade nº 11-4243 da série 15 HC) afastados por um separador de 4 mm. Os dentes foram seccionados na porção cervical, separando coroa e raiz e, em seguida, as porções coronárias foram seccionadas no sentido vertical e méso-distal, para obtenção de blocos do centro da face vestibular. As raízes foram seccionadas no mesmo sentido, e o primeiro terço foi utilizado para confecção dos blocos de dentina. Os cortes foram feitos sob

refrigeração com água purificada para evitar trincas, obtendo-se blocos com dimensões de 4 x 4 mm. A altura dos blocos foi reduzida para 2 mm pela planificação da porção dentinária interna do dente. Para isso, a face externa do bloco de esmalte e dentina foi fixada com cera pegajosa contra a superfície de um disco de resina acrílica pré-fabricada (3 cm x 8 mm), sendo a porção interna de dentina planificada com lixa de granulação 400 (Carbimet® Paper Discs – nº 30-5108-320 Buehler®) e politriz APL-4 Arotec®, verificando-se a espessura do bloco com auxílio de um paquímetro. Depois da planificação da dentina interna, o bloco de dente foi fixado no disco de resina acrílica com a superfície planificada para baixo e a superfície de esmalte/dentina externa para cima. Para os blocos de esmalte, foi utilizada lixa de granulação 400 por 5 s, seguida da lixa de granulação 600 por 5 s para possibilitar maior planificação da superfície de esmalte. Para os blocos de dentina, devido à sua menor dureza, a lixa de granulação 600 por 5 s foi suficiente para planificar a porção central dos blocos. Posteriormente, foi utilizada lixa de granulação 1200 por 2 min, para o polimento das superfícies de esmalte e dentina. A cada mudança de granulação da lixa, os blocos dentais foram lavados em ultra-som para remoção dos resíduos da lixa anterior. O ultra-polimento foi realizado com panos auto-adesivos, previamente banhados com suspensão diamantada de 1 µm por 2 min. Em seguida, os blocos dentais foram lavados em solução detergente (Ultramet®) diluída na proporção de 20:1 em água purificada, em ultra-som por 2 min. Os blocos dentais obtidos foram então armazenados em geladeira a 4°C em potes devidamente vedados, cobertos com papel absorvente, umedecido com água purificada, para evitar o ressecamento da superfície dos blocos e a ocorrência de rachaduras.

Para seleção de uma amostra homogênea de blocos de esmalte e dentina, a dureza de superfície dos blocos dentais foi determinada utilizando-se o durômetro Future Tech modelo FM-7 acoplado a um software FM-ARS e penetrador tipo Knoop, com carga de 50 g por 5 s para o esmalte (Fushida & Cury, 1999) e 5 g por 5 s para a dentina (Hara *et al.*, 2003). Foram realizadas 3 endentações na porção central dos blocos dentais, com 100 µm de distância entre as mesmas. Devido à maior porosidade da dentina, padronizou-se que

antes da realização das endentações, os blocos permanecessem por, pelo menos, 30 min ao ar livre, para adequada secagem (Vale *et al.*, 2011). Os critérios de seleção foram baseados na média e desvio padrão de dureza de cada bloco. Foram excluídos os blocos dentais que apresentaram desvio padrão maior que 10% de sua média de dureza individual (variabilidade intra-blocos) e aqueles que apresentaram sua média individual de dureza maior ou menor do que 10% (para esmalte) ou 8% (para dentina) da média de dureza calculada para todos os blocos inicialmente obtidos (variabilidade entre blocos). Ao todo, foram confeccionados 400 blocos de esmalte e 600 de dentina, dos quais foram selecionados 288 blocos de esmalte e 288 de dentina. A média da dureza dos blocos de esmalte e dentina para cada tratamento é apresentada no apêndice 3. Os blocos dentais selecionados pela dureza de superfície foram aleatoriamente alocados dentre os tratamentos e voluntários, de forma que as médias de dureza dos blocos entre os tratamentos não diferisse estatisticamente.

#### 4.2.3. Caracterização dos voluntários

O critério de seleção dos voluntários foi a não utilização de antibióticos sistêmicos um mês antes do início do experimento e fluxo salivar normal. Também foi realizado exame clínico nos voluntários para verificação do CPOD. Para avaliação do fluxo salivar, os voluntários vieram ao laboratório numa manhã, em jejum e sem escovar os dentes, e mastigaram Parafilm (goma inerte) por 30 s e a saliva formada neste tempo foi deglutida. Nos 3 min seguintes, ainda mastigando a goma, toda a saliva formada foi coletada em um copo plástico previamente pesado para determinação do fluxo salivar estimulado. Todos os voluntários apresentaram fluxo salivar estimulado igual ou maior que 1 mL/min, considerado valor normal (Edgar *et al.*, 2004). Foram selecionados 14 voluntários adultos saudáveis, de 23 a 39 anos (média  $26,4 \pm 4,0$  anos), de ambos os gêneros (2 homens e 12 mulheres) com fluxo salivar normal (média  $1,54 \pm 0,4$  mL/min), boa saúde geral e oral (CPOD médio  $3,5 \pm 3,6$ ), não fumantes e que não tinham utilizado antibióticos ou

medicamentos que pudessem afetar o fluxo salivar, pelo menos 1 mês antes do início da fase de *lead in*. Os voluntários residiam em Piracicaba, SP, cidade com água de abastecimento otimamente fluoretada (0,6 a 0,8 ppm F).

De acordo com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - FOP-UNICAMP (Anexo) e atendendo à Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional da Saúde, foi realizada uma reunião entre os pesquisadores e voluntários para melhor explanação sobre a pesquisa, seus objetivos, procedimentos e a fim de sanar as dúvidas. Àqueles de acordo, foi entregue um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice 4), que foi assinado e devolvido aos pesquisadores. Os voluntários receberam também esclarecimento verbal e por escrito (Apêndice 5) durante todo o experimento.

#### *4.2.4. Preparo do Dispositivo Oral Palatino*

Foram confeccionados dispositivos em resina acrílica autopolimerizável, contendo quatro cavidades de cada lado, medindo cada uma 5 x 5 x 3 mm. Os dispositivos foram polidos quimicamente pela imersão, por alguns segundos, em monômero de resina acrílica aquecido. Nas cavidades foram fixados os blocos de esmalte e dentina, intercalados, totalizando 8 blocos dentais por dispositivo.

Os blocos dentais foram fixados no dispositivo intra-oral com cera pegajosa. Em seguida foram cobertos com uma tela plástica recortada e colada no dispositivo com resina acrílica incolor de um lado, e vermelha do outro, para identificar e diferenciar os tratamentos (Paes Leme *et al.*, 2004; Pecharki *et al.*, 2005; Ribeiro *et al.*, 2005). Foi deixado um espaço de 1 mm entre os blocos e a tela para permitir o acúmulo do biofilme.

#### *4.2.5. Preparo das Soluções de Tratamento*

A solução de sacarose foi preparada utilizando reagente da marca Merck, e a solução de amido, a partir de reagente da marca Sigma. As soluções dos hidrolisados de amido foram preparadas a partir de produtos gentilmente cedidos pela indústria Corn Products, sendo que foram escolhidos hidrolisados de amido que possuem diferentes utilidades na indústria de alimentos, de equivalente de dextrose igual a 5, 20 e 40. As soluções foram preparadas no início de cada fase experimental, da mesma forma como descrito para o experimento in vivo, foram esterilizadas em autoclave (1 atm por 15 min) e entregues em frasco conta-gotas aos voluntários a cada dois dias.

#### *4.2.6. Fase Clínica*

Antes da primeira fase experimental, os voluntários foram aleatorizados entre os grupos de tratamentos descritos abaixo e então seguiram os tratamentos conforme o delineamento descrito na Figura 2:

- Água purificada (controle negativo)
- Solução de sacarose 10% (controle positivo)
- Solução de amido 2% (controle ativo)
- Solução de hidrolisado de amido ED 5 10%
- Solução de hidrolisado de amido ED 20 10%
- Solução de hidrolisado de amido ED 40 10%

As fases experimentais tiveram duração de 14 dias cada. Os voluntários utilizaram o dispositivo intra-oral palatino durante todo o tempo, inclusive para dormir. O dispositivo

intra-oral foi removido somente durante as refeições e higienização oral, enquanto permaneciam em recipiente com gaze úmida, para que as bactérias do biofilme permanecessem viáveis. Oito vezes ao dia, em horários pré-determinados (às 8 h, 9:30 h, 11 h, 12:30 h, 14 h, 15:30 h, 17 h, 18:30 h), os voluntários removeram os dispositivos, gotejaram 1 gota das soluções de tratamento sobre cada bloco dental e recolocaram os dispositivos na boca após 5 min. O excesso de fluido foi removido com auxílio de uma haste flexível de algodão, evitando assim, contaminação cruzada entre os tratamentos, já que foram realizados dois tratamentos concomitantemente em cada fase, um em cada lado do dispositivo. Trabalhos *in situ* anteriores dão suporte à ausência de efeito cruzado quando utilizada metodologia boca-dividida (Hara *et al.*, 2003; Paes Leme *et al.*, 2004; Pecharki *et al.*, 2005; Ribeiro *et al.*, 2005; Aires *et al.*, 2006). Entre as fases experimentais houve um período de *wash-out* de pelo menos 7 dias.

Durante os períodos de *lead in*, *wash-out* e todo o experimento, os voluntários utilizaram dentifrício não fluoretado cedido pelos pesquisadores. Foi enfatizado aos voluntários para que não escovassem os dispositivos na região onde os blocos estavam localizados, ou seja, poderiam apenas escovar a superfície em contato com o palato e que, durante o enxágue, não deixassem a região com os blocos em contato direto água corrente, a fim de não perturbar o biofilme.

#### 4.2.7. Análise da Acidogenicidade do Biofilme Dental

No 15<sup>o</sup> e último dia do experimento, aproximadamente 12 h após a última exposição às soluções de tratamento, em jejum e sem escovar os dentes, os voluntários foram ao laboratório de Bioquímica Oral da FOP para determinação do pH do biofilme dental formado sobre os blocos. Para isso, as telas plásticas sobre os 2 blocos centrais de cada lado do dispositivo (1 de esmalte e 1 de dentina) foram removidas com auxílio de uma lâmina de bisturi nº 15. O pH do biofilme formado sobre cada bloco dental foi

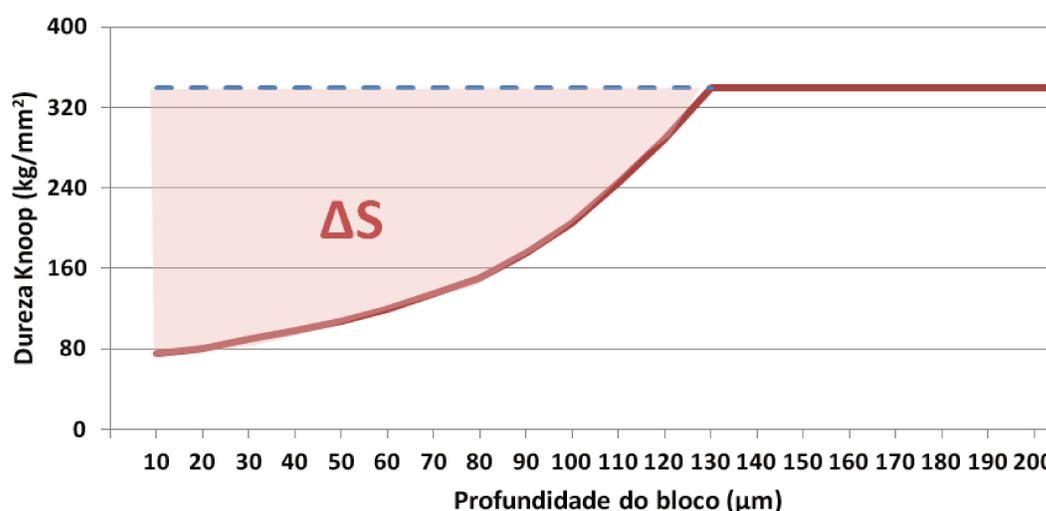
determinado no tempo zero (baseline). Logo em seguida, o dispositivo foi retirado da cavidade oral e foi dispensada uma gota das soluções de tratamento de acordo com a fase experimental sobre os blocos dentais. Após 1 min, o voluntário voltou o dispositivo intra-oral na boca e aguardou mais 4 min, quando o pH do biofilme foi novamente determinado, 5 minutos após a exposição ( $\text{pH}_{5\text{min}}$ ). O pH do biofilme foi determinado utilizando-se um microeletrodo de contato (Beetrode<sup>®</sup> MEPH3L, WPI, USA) acoplado a um eletrodo de referência (Orion Res Inc, modelo 900100) e a um peagômetro (Procyon Inst Cient SA 720). Uma ponte salina foi estabelecida entre o eletrodo de referência e o dedo do voluntário usando uma solução de KCl 3 M (Lingstrom *et al.*, 1994). O microeletrodo foi calibrado com soluções padrões de pH 4,0 e 7,0 antes da avaliação de cada voluntário, assim como entre as medidas, quando necessário.

#### 4.2.8. Determinação da Dureza da Superfície e do Bloco Seccionado Longitudinalmente

Ao final de cada fase experimental, a dureza de superfície dos blocos dentais de esmalte e dentina foi determinada novamente e uma média por voluntário e por substrato dental foi obtida. Três endentações foram feitas a 100  $\mu\text{m}$  de distância das iniciais e os valores médios das 3 impressões foram então calculados para cada grupo de tratamento. Estas análises foram realizadas de acordo com Cury *et al.* (2000) e a porcentagem de perda de dureza de superfície (%PDS) foi calculada. Foi utilizado o durômetro Future-Tech FM acoplado a um software FM-ARS e penetrador tipo Knoop com carga de 50 g por 5 s para o esmalte e 5 g por 5 s para a dentina.

A perda mineral resultante dos tratamentos também foi avaliada pela dureza dos blocos transversalmente seccionados. Os blocos de esmalte e dentina foram cortados transversalmente por corte longitudinal com uso de disco diamantado acoplado à cortadeira elétrica. Uma metade de cada bloco foi embutida (embutidora Arotec Pre 30<sup>®</sup>) com resina acrílica incolor, sendo a parte seccionada exposta. Para possibilitar as análises

da lesão de cárie, a superfície seccionada do esmalte e dentina foi lixada e polida com lixas de granulação 400, 600, 1200 e feltro com suspensão diamantada de 1  $\mu\text{m}$ ; em seguida a dureza foi determinada. Para tanto, foram realizadas 3 fileiras de impressões, às distâncias de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180 e 200  $\mu\text{m}$  de distância da superfície externa do bloco. As fileiras de endentações foram realizadas no centro dos blocos, a 100  $\mu\text{m}$  uma da outra, utilizando uma carga de 25 g por 5 s para o esmalte e 5 g por 5 s para a dentina. Então, as médias das durezas nas três posições a cada distância da superfície do bloco foram calculadas e os resultados foram convertidos na área de lesão ( $\Delta S$ ) para cada tratamento (Ana *et al.*, 2012), como exemplificado na figura 3.



**Figura 3.** Área da lesão do bloco em função da profundidade do bloco (eixo y) e média da dureza para cada distância (eixo x).

#### 4.2.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as análises estatísticas do experimento in situ, foi utilizado software SAS (SAS Institute Inc., versão 8.02, Cary, NC, USA), e foi estabelecido nível de significância de  $p < 0,05$ . Os voluntários foram considerados blocos estatísticos. Os intervalos de confiança e a homogeneidade foram checados, e as variáveis que não respeitavam esses princípios estatísticos foram transformadas (Box *et al.*, 2005). Os dados de %PDS e pH baseline

foram analisados pela Análise de Variância e em seguida pelo teste de Tukey sem transformação. Os dados de  $\Delta S$  de esmalte foram transformados no logaritmo na base 10 e os de dentina foram transformados em raiz quadrada. Os dados de  $\text{pH}_{5\text{min}}$  de esmalte foram elevados ao quadrado e os de dentina foram transformados no logaritmo na base 10. Em seguida, esses dados foram analisados pela Análise de Variância e teste de Tukey.

## 5. RESULTADOS

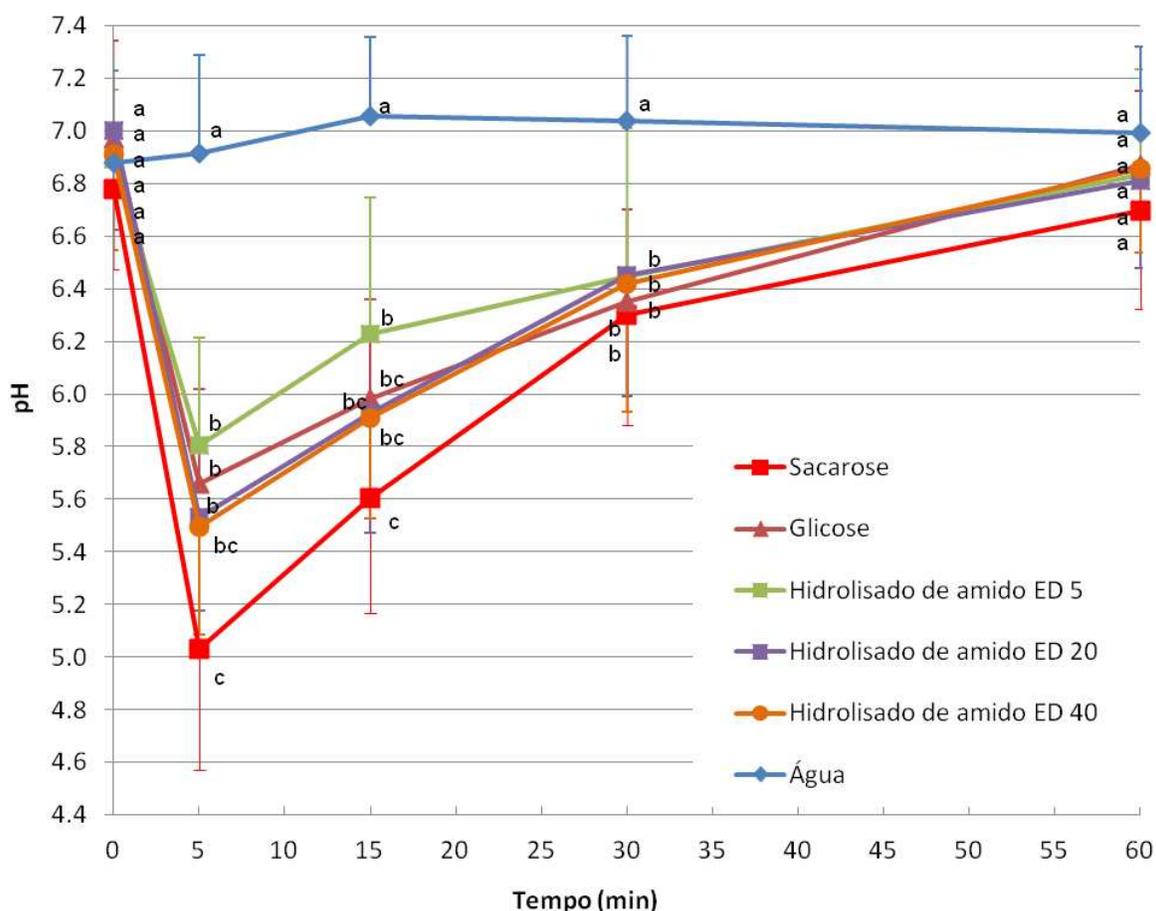
### 5.1. EXPERIMENTO *in vivo*

Na tabela 1, é possível observar que os valores de pH medidos no tempo zero (baseline) não apresentaram diferenças estatísticas entre os tratamentos ( $p=0,6893$ ), mostrando homogeneidade no jejum dentre os biofilmes formados na presença de diferentes condições. Todos os tratamentos, com exceção da água, levaram à significativa queda de pH após 5 minutos do bochecho ( $p<0,0001$ ), sendo que os grupos de tratamento hidrolisados de amido ED 5, 20 e 40 não diferiram entre si e também não diferiram da glicose. A sacarose foi o tratamento que resultou na maior queda de pH aos 5 min, não diferindo significativamente somente do hidrolisado de amido ED 40. Após 15 min, o pH dos biofilmes expostos aos hidrolisados de amido ED 20 e 40 não diferiram estatisticamente entre si e da sacarose e glicose. O hidrolisado de amido ED 5 apresentou, aos 15 min, pH do biofilme estatisticamente maior ( $p<0,0001$ ) comparado com a sacarose, mas significativamente menor quando comparado à água. Trinta minutos após a exposição às soluções de tratamento, nenhuma diferença estatística foi encontrada no pH do biofilme expostos às soluções contendo carboidratos, mas estes ainda apresentavam pH significativamente menor ( $p=0,0016$ ) que o biofilme exposto à água. Após 60 min, não houve diferença estatística ( $p=0,4642$ ) no valor do pH dos biofilmes expostos a todos os tratamentos. As alterações no pH do biofilme dental após exposição às soluções de tratamentos estão apresentadas na Figura 4, assim como a comparação entre os tratamentos em cada tempo de avaliação.

**Tabela 1.** Média  $\pm$  DP (n=12) do pH do biofilme dental formado in vivo, segundo o tratamento, em cada intervalo de tempo.

| Tratamento                 | pH <sub>0 min</sub>          | pH <sub>5 min</sub>           | pH <sub>15 min</sub>          | pH <sub>30 min</sub>         | pH <sub>60 min</sub>         |
|----------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Água purificada            | 6,88 $\pm$ 0,35 <sup>a</sup> | 6,92 $\pm$ 0,37 <sup>a</sup>  | 7,06 $\pm$ 0,30 <sup>a</sup>  | 7,04 $\pm$ 0,32 <sup>a</sup> | 6,99 $\pm$ 0,33 <sup>a</sup> |
| Sacarose                   | 6,78 $\pm$ 0,31 <sup>a</sup> | 5,03 $\pm$ 0,46 <sup>c</sup>  | 5,60 $\pm$ 0,43 <sup>c</sup>  | 6,30 $\pm$ 0,42 <sup>b</sup> | 6,70 $\pm$ 0,37 <sup>a</sup> |
| Glicose                    | 6,97 $\pm$ 0,37 <sup>a</sup> | 5,66 $\pm$ 0,36 <sup>b</sup>  | 5,98 $\pm$ 0,38 <sup>bc</sup> | 6,35 $\pm$ 0,35 <sup>b</sup> | 6,87 $\pm$ 0,28 <sup>a</sup> |
| Hidrolisado de amido ED 5  | 6,89 $\pm$ 0,27 <sup>a</sup> | 5,80 $\pm$ 0,41 <sup>b</sup>  | 6,23 $\pm$ 0,52 <sup>b</sup>  | 6,45 $\pm$ 0,56 <sup>b</sup> | 6,83 $\pm$ 0,40 <sup>a</sup> |
| Hidrolisado de amido ED 20 | 7,00 $\pm$ 0,38 <sup>a</sup> | 5,53 $\pm$ 0,36 <sup>b</sup>  | 5,93 $\pm$ 0,46 <sup>bc</sup> | 6,45 $\pm$ 0,46 <sup>b</sup> | 6,81 $\pm$ 0,34 <sup>a</sup> |
| Hidrolisado de amido ED 40 | 6,91 $\pm$ 0,36 <sup>a</sup> | 5,49 $\pm$ 0,41 <sup>bc</sup> | 5,91 $\pm$ 0,38 <sup>bc</sup> | 6,42 $\pm$ 0,49 <sup>b</sup> | 6,86 $\pm$ 0,32 <sup>a</sup> |

Letras distintas indicam diferença estatística entre os grupos de tratamento pelo teste de Tukey HSD.



**Figura 4.** Curva de pH, calculada pela média do pH, segundo o tratamento, em cada intervalo de tempo aferido (n=12). As barras indicam o DP. Os tratamentos, cujas médias estão seguidas por letras distintas diferem estatisticamente entre si, em cada período de avaliação.

## 5.2. EXPERIMENTO *in situ*

Os resultados de porcentagem de perda de dureza de superfície (%PDS) e área da lesão ( $\Delta S$ ) são apresentados na tabela 2. Os dados de %PDS dos blocos de esmalte e dentina também são apresentados no apêndice 7.

**Tabela 2.** Porcentagem de perda de dureza da superfície (%PDS) e área da lesão cariiosa ( $\Delta S$ ) em esmalte e dentina submetidos aos tratamentos (média $\pm$ DP; n=14).

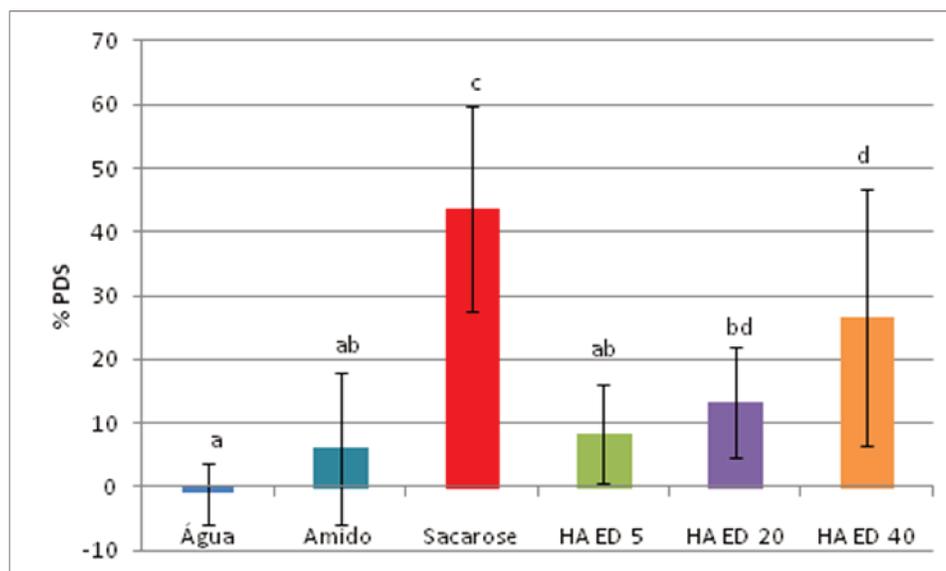
| Tratamento | %PDS                          |                               | $\Delta S$ (kg/mm <sup>2</sup> x $\mu$ m) |                                 |
|------------|-------------------------------|-------------------------------|---|---------------------------------|
|            | Esmalte                       | Dentina                       | Esmalte                                   | Dentina                         |
| Água       | -1,1 $\pm$ 4,9 <sup>a</sup>   | -2,9 $\pm$ 6,7 <sup>a</sup>   | 1019,4 $\pm$ 428,6** <sup>a</sup>         | 99,0 $\pm$ 60,1 <sup>a</sup>    |
| Amido      | 6,1 $\pm$ 11,9 <sup>ab</sup>  | 20,1 $\pm$ 15,4 <sup>b</sup>  | 1784,9 $\pm$ 731,5 <sup>b</sup>           | 537,1 $\pm$ 264,2 <sup>b</sup>  |
| Sacarose   | 43,7 $\pm$ 16,1 <sup>c</sup>  | 63,9 $\pm$ 14,4 <sup>c</sup>  | 12180,8 $\pm$ 3477,8 <sup>c</sup>         | 1803,7 $\pm$ 327,5 <sup>c</sup> |
| HA ED 5    | 8,3 $\pm$ 7,8* <sup>ab</sup>  | 22,3 $\pm$ 18,8* <sup>b</sup> | 2939,9 $\pm$ 315,4* <sup>d</sup>          | 550,2 $\pm$ 270,2* <sup>b</sup> |
| HA ED 20   | 13,4 $\pm$ 8,7* <sup>bd</sup> | 41,9 $\pm$ 14,3* <sup>d</sup> | 5802,5 $\pm$ 1845,5* <sup>e</sup>         | 974,8 $\pm$ 268,7* <sup>d</sup> |
| HA ED 40   | 26,6 $\pm$ 20,1 <sup>d</sup>  | 48,9 $\pm$ 14,5 <sup>cd</sup> | 7571,1 $\pm$ 3038,1 <sup>e</sup>          | 1202,2 $\pm$ 281,2 <sup>d</sup> |

\*n=13; \*\*n=12 (2 outliers foram removidos: 234,1 e 63,5)

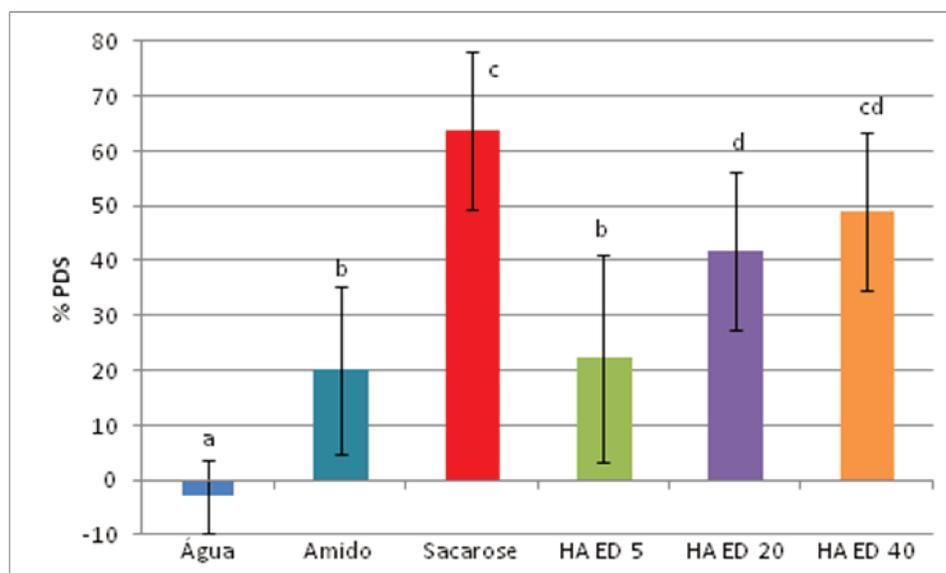
Letras distintas indicam diferença estatística entre os grupos de tratamento pelo teste de Tukey HSD.

HA – hidrolisado de amido.

Os dados de %PDS dos blocos de esmalte e dentina também são apresentados nos gráficos 5 e 6, respectivamente.



**Figura 5.** Média da porcentagem de perda de dureza de superfície (%PDS) nos blocos de esmalte de acordo com os tratamentos. Barras indicam DP. Letras distintas indicam diferença estatística entre os tratamentos. HA – hidrolisado de amido.

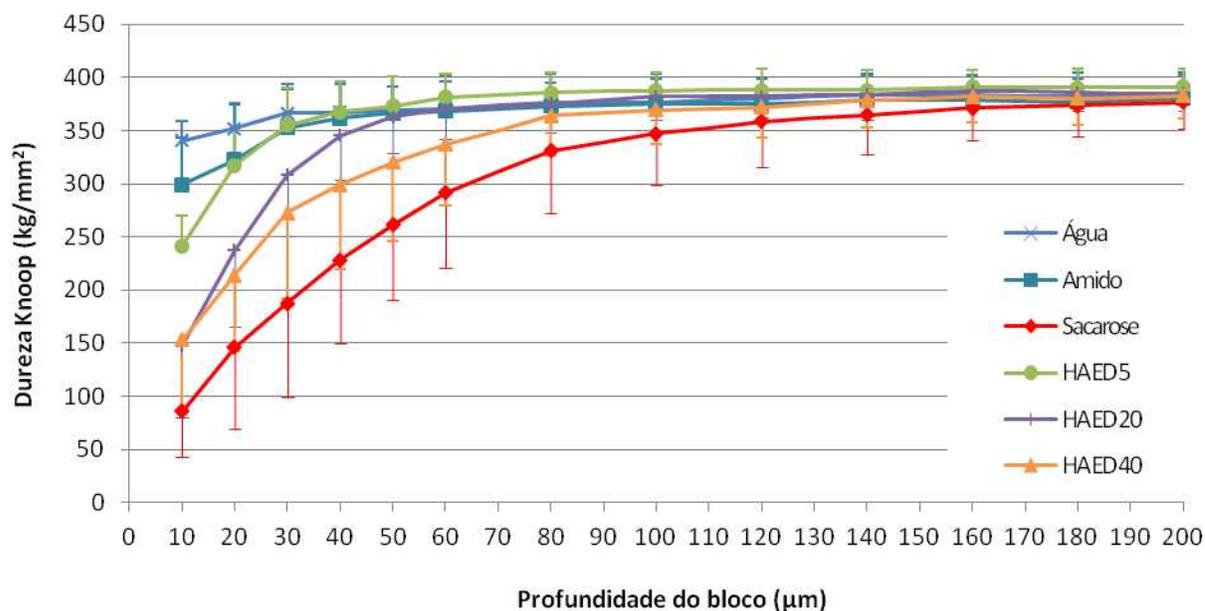


**Figura 6.** Média da porcentagem de perda de dureza de superfície (%PDS) nos blocos de dentina de acordo com os tratamentos. Barras indicam DP. Letras distintas indicam diferença estatística entre os tratamentos. HA – hidrolisado de amido.

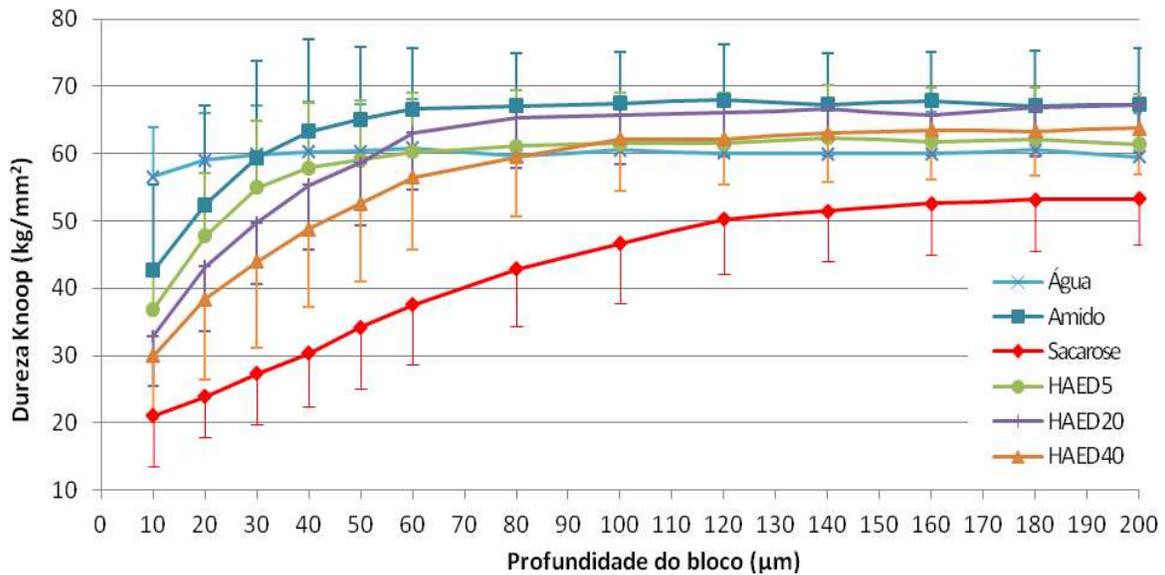
Os grupos de tratamento hidrolisados ED 20 e 40 apresentaram valores de %PDS significativamente maiores para esmalte e dentina quando comparados ao controle negativo água (Tabela 2 e Figuras 5 e 6). A maior %PDS, tanto nos blocos de esmalte quanto de dentina, foi observada no grupo sacarose. Em esmalte, a exposição à sacarose causou perdas significativamente maiores que todos os outros tratamentos, inclusive os hidrolisados, independente dos seus EDs (Tabela 2 e Figura 5). Os blocos de esmalte tratados com hidrolisado ED 5 não diferiram significativamente do tratamento amido e também do grupo água quanto à %PDS. Para esmalte, os hidrolisados ED 20 e 40 não diferiram significativamente entre si, sendo que o hidrolisado ED 20 também não diferiu estatisticamente dos grupos amido e ED 5. Nos blocos de dentina, apesar da sacarose ter causado maior %PDS, ela não diferiu significativamente do hidrolisado ED 40 (Tabela 2 e Figura 5). Ainda em dentina, a %PDS no grupo do hidrolisado ED 5 não diferiu significativamente do grupo amido e o hidrolisado ED 20 não apresentou diferença estatística em relação ao hidrolisado ED 40, sendo que todos os hidrolisados apresentaram perdas significativamente maiores que o grupo de tratamento água.

Em relação à área da lesão de cárie ( $\Delta S$ ) nos blocos de esmalte, os hidrolisados de amido ED 20 e 40 provocaram perdas minerais significativamente maiores que os grupos água, amido e hidrolisado ED 5 e estatisticamente menores que a sacarose (Tabela 2). O hidrolisado ED 5 diferiu significativamente do grupo água e amido ( $p < 0,05$ ). Já nos blocos de dentina, o hidrolisado ED 5 levou a perdas minerais significativamente maiores que a água, mas que no entanto não diferiram estatisticamente do amido (Tabela 2). Os hidrolisados ED 20 e 40 causaram perdas minerais estatisticamente maiores que a água, amido e hidrolisado de amido ED 5, também não diferindo entre si. No grupo sacarose foi observado o maior valor de  $\Delta S$ , o qual não diferiu significativamente do hidrolisado ED 40.

Nas figuras 7 e 8 foram plotadas as médias de dureza em função da profundidade do bloco, nos blocos de esmalte e dentina, respectivamente.



**Figura 7.** Média de dureza Knoop do esmalte ( $\text{kg}/\text{mm}^2$ ) de acordo com os tratamentos e a distância ( $\mu\text{m}$ ) da superfície (barras denotam o DP).



**Figura 8.** Média de dureza Knoop da dentina ( $\text{kg}/\text{mm}^2$ ) de acordo com os tratamentos e a distância ( $\mu\text{m}$ ) da superfície (barras denotam o DP).

Os dados de acidogenicidade dos biofilmes formados sob exposição aos tratamentos são apresentados na tabela 3 e apêndice 6.

**Tabela 3.** Análise do pH do biofilme dental formado in situ, de acordo com os tratamentos (média $\pm$ DP; n=14).

| Tratamento | pH <sub>0 min</sub> (baseline) |                      | pH <sub>5 min</sub>             |                                 |
|------------|--------------------------------|----------------------|---------------------------------|---------------------------------|
|            | Esmalte <sup>£</sup>           | Dentina <sup>£</sup> | Esmalte                         | Dentina                         |
| Água       | 7,45 $\pm$ 0,53*               | 7,63 $\pm$ 0,52      | 7,50 $\pm$ 0,73 <sup>a</sup>    | 7,50 $\pm$ 0,73 <sup>a</sup>    |
| Amido      | 7,55 $\pm$ 0,77*               | 7,41 $\pm$ 0,79**    | 6,70 $\pm$ 0,62** <sup>ab</sup> | 7,29 $\pm$ 1,44** <sup>ac</sup> |
| Sacarose   | 6,90 $\pm$ 0,84                | 7,11 $\pm$ 0,84      | 5,60 $\pm$ 0,78 <sup>c</sup>    | 5,62 $\pm$ 0,74 <sup>b</sup>    |
| HA ED 5    | 7,24 $\pm$ 0,76*               | 7,26 $\pm$ 0,81**    | 6,43 $\pm$ 1,05** <sup>bc</sup> | 6,50 $\pm$ 1,28* <sup>ab</sup>  |
| HA ED 20   | 7,18 $\pm$ 0,57*               | 7,18 $\pm$ 0,55*     | 6,10 $\pm$ 0,63* <sup>bc</sup>  | 6,13 $\pm$ 0,67* <sup>bc</sup>  |
| HA ED 40   | 7,20 $\pm$ 0,80                | 7,27 $\pm$ 0,74      | 6,08 $\pm$ 0,69 <sup>bc</sup>   | 6,23 $\pm$ 0,77 <sup>bc</sup>   |

\*n=13; \*\*n=12

Letras distintas indicam diferença estatística entre os grupos de tratamento pelo teste de Tukey HSD.

HA – hidrolisado de amido.

<sup>£</sup>Não há diferença entre os tratamentos (para esmalte o valor de p = 0,24 e para dentina o valor de p = 0,46).

A análise estatística mostrou que os valores de pH baseline não diferiram entre os tratamentos ( $p > 0,05$ ), tanto para o biofilme formado sobre esmalte quanto para aquele

formado sobre a dentina (Tabela 3 e Apêndice 8). No biofilme formado sobre esmalte, 5 min após a exposição aos tratamentos, todos os hidrolisados de amido causaram significativa queda de pH ( $p < 0,0001$ ), em relação ao grupo controle negativo água, e para a dentina, apenas o hidrolisado de amido ED 5 não diferiu estatisticamente do grupo água. Tanto para esmalte quanto para dentina não houve diferença estatística entre os hidrolisados de amido e estes também não diferiram significativamente da sacarose, embora essa tenha levado à maior queda de pH.

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1. EXPERIMENTO *in vivo*

Métodos de aferição do pH do biofilme dental são aceitos e largamente utilizados em estudos do potencial cariogênico de alimentos (Lingstrom *et al.*, 1993). Neste experimento, foi utilizado microeletrodo de contato, cuja maior vantagem é a medição do pH no biofilme em seu ambiente *in vivo*, com todas as influências da cavidade oral e, em especial, da saliva. Além disso, o microeletrodo de contato permite alcançar áreas interproximais dos dentes e ainda permite um maior número de análises por período experimental, pois tem capacidade de responder rapidamente, com boa reprodutibilidade (Sonmez & Aras, 2007).

Os dados encontrados no presente estudo *in vivo* mostram que os valores de pH baseline do biofilme em condição de jejum de pelo menos 2 horas não diferem estatisticamente entre os tratamentos, demonstrando que não há metabolização na ausência de substrato energético, e que os biofilmes dentais acumulados são homogêneos nestas condições. Estes achados são suportados pelos dados encontrados por Rebelo Vieira *et al.* (2002) e Sonmez & Aras (2007), que também não encontraram diferenças no pH do biofilme *in vivo* em condição de jejum.

Ainda, neste experimento *in vivo*, os carboidratos das soluções de tratamento, incluindo os hidrolisados de amido, foram metabolizados pelos microrganismos presentes no biofilme acumulado nos dentes dos voluntários e causaram significativa queda de pH, comparados ao grupo controle negativo, até 30 min após exposição aos mesmos. A queda de pH numericamente mais acentuada foi observada no grupo sacarose. No grupo glicose, a queda de pH do biofilme foi significativamente menor do que a do grupo sacarose aos 5 min. Este achado parece intrigante a princípio, pois tanto a glicose quanto a sacarose estão imediatamente disponíveis para fermentação pelos microrganismos do biofilme. No

entanto, é bem claro na literatura que os polissacarídeos extracelulares são reconhecidos como um fator de virulência para o biofilme (Koo *et al.*, 2009) e uma hipótese é que o maior potencial acidogênico da sacarose, encontrado neste estudo, poderia ser devido à diferença estrutural entre os biofilmes formados sob exposição à sacarose e glicose, em relação à composição dos polissacarídeos, com maior quantidade de polissacarídeos extracelulares insolúveis nos biofilmes formados sob exposição à sacarose, os quais conseqüentemente apresentariam maior porosidade, facilitando a difusão do açúcar e sua metabolização pelos microrganismos (Rolla *et al.*, 1985). A menor queda de pH provocada pelos hidrolisados de amido aos 5 min em comparação com a sacarose pode ser explicada pela própria complexidade estrutural destas moléculas, com seu maior peso molecular, que dificulta e torna mais lenta a metabolização destes carboidratos pelo biofilme dental (Moynihan *et al.*, 1996a, Al-Khatib *et al.*, 2001), pois é necessária a ação prévia da amilase salivar para hidrolisar as cadeias de polissacarídeos dos hidrolisados de amido e então liberar moléculas com tamanhos menores, capazes de difundir pelo biofilme e de ser metabolizadas pelos microrganismos. Os hidrolisados de amido de ED 5, 20 e 40 e a glicose provocaram, aos 5 min, quedas muito semelhantes no pH do biofilme. Possivelmente estes produtos da hidrólise do amido aqui avaliados contêm uma quantidade de monossacarídeos e dissacarídeos de glicose já suficiente para ser imediatamente disponibilizada e metabolizada pelo biofilme (Russel *et al.*, 1992), produzindo quedas de pH semelhantes à solução de glicose. Outra possibilidade ainda a ser considerada é de que, durante o tempo que os voluntários fizeram bochecho com as soluções para a determinação do pH após 5 min, os hidrolisados de amido ficaram expostos à ação da amilase salivar, que disponibilizou mais uma quantidade de monossacarídeos e dissacarídeos, que puderam ser utilizados pelos microrganismos do biofilme (Grenby & Mistry, 2000). Al-Khatib *et al.* (2001) também não encontraram diferenças significativas quando compararam o potencial acidogênico de soluções de maltodextrinas de ED 5,5, 14 e 18,5, concordando com o presente estudo, mesmo considerando as diferenças no delineamento experimental dos dois trabalhos. Assim, os

achados deste experimento in vivo sugerem que uma alta frequência de ingestão destes carboidratos associada ao acúmulo de biofilme poderia ter como consequência a desmineralização tanto do esmalte quanto da dentina, principalmente se for considerado o hidrolisado de ED 40, que aos 5 min provocou queda de pH estatisticamente semelhante à sacarose.

O hidrolisado de amido ED 5 é o produto que apresenta o menor grau de hidrólise, portanto, a menor proporção de moléculas de glicose livre ou pontas redutoras para o metabolismo bacteriano. Como consequência, é possível observar que este produto não abaixou o pH do biofilme a valores menores que 5,8 e também, aos 15 min, o valor de pH do biofilme se manteve estatisticamente maior que o da sacarose, mas ainda mais baixo que o controle negativo. Seria assim possível sugerir que o hidrolisado de amido com ED 5 é o produto com menor potencial cariogênico entre os hidrolisados avaliados, o que deve ser confirmado em um estudo in situ ou in vivo.

Em acréscimo, com a ação de lavagem da cavidade oral provocada pela saliva, e diluição das soluções de tratamento, além da sua capacidade de tamponar os ácidos produzidos pelo biofilme dental (Nauntofte *et al.*, 2005), após 30 min de exposição aos tratamentos, o pH dos biofilmes expostos aos carboidratos atingiu valores que não diferiram entre si, e aos 60 min, os valores de pH basais foram restaurados.

Ainda que os hidrolisados de amido avaliados neste experimento sejam menos cariogênicos quando comparados à sacarose, é importante salientar que eles levaram à significativa queda de pH no biofilme acumulado por 3 dias. Considerando a variedade de alimentos industrializados da dieta que contém estes subprodutos da hidrólise do amido e a frequência em que estes alimentos são consumidos, estudos são necessários para avaliar com mais detalhes os efeitos dos hidrolisados de amido sobre a desmineralização dental, para que profissionais de saúde e população conheçam as implicações do consumo constante destes carboidratos no processo da cárie.

## 6.2. EXPERIMENTO *in situ*

O papel do amido na cárie dental tem sido amplamente estudado (Grenby, 1997; Lingstrom *et al.*, 2000; Ribeiro *et al.*, 2005; Aires *et al.*, 2008; Duarte *et al.*, 2008; Thurnheer *et al.*, 2008), no entanto, muito pouco se conhece sobre o papel dos subprodutos da hidrólise do amido na desmineralização dental. Atualmente os hidrolisados de amido são largamente utilizados pela indústria de alimentos devido às suas diferentes características, cada uma com funções específicas, importantes na produção de itens alimentícios.

Os dados de queda do pH do biofilme formado *in situ* podem ajudar a explicar os resultados de perda mineral dos blocos dentais, pois o grupo sacarose apresentou as maiores perdas minerais em esmalte e dentina e também foi responsável pela maior queda de pH encontrada no biofilme formado *in situ* sobre os dois substratos dentais. Esta maior cariogenicidade da sacarose está de acordo com a literatura (Cury *et al.*, 1997; Cury *et al.*, 2000; Aires *et al.*, 2006; Aires *et al.*, 2008). Quanto aos hidrolisados de amido de ED 20 e 40 testados, utilizados em alta frequência (8 x/dia) e concomitante ao uso de dentifrício não-fluoretado, estes provocaram perdas minerais significativas para esmalte e para dentina, avaliadas tanto por dureza de superfície (%PDS) quanto pela área da lesão de cárie ( $\Delta S$ ). Estas perdas minerais não atingiram os mesmos níveis do grupo sacarose, mas os achados podem ser suportados pela queda de pH do biofilme exposto a estes produtos, os quais foram significativamente maiores que o grupo controle negativo. Estes dados de perda mineral estão de acordo com os resultados de Papa *et al.* (2010), que mostraram *in situ* que fórmula infantil contendo apenas maltodextrina, um tipo de hidrolisado de amido, como fonte de carboidrato, resultou em perda mineral significativa em esmalte decíduo. No entanto, deve-se levar em consideração os demais componentes destas fórmulas, que podem interferir negativa ou positivamente com o potencial cariogênico do hidrolisado de amido, o qual no presente estudo está sendo avaliado sem qualquer outra substância ou componente. Em acréscimo, assim como os presentes

resultados de %PDS e  $\Delta S$ , Grenby & Mistry (2000) demonstraram em experimento com ratos que quanto maior o ED do hidrolisado de amido, maior seu potencial cariogênico, o que pode ser devido à maior proporção de pequenas moléculas, rapidamente metabolizáveis, disponibilizadas para o biofilme.

Os dados de perda mineral encontrados para o grupo controle negativo água permitem afirmar que não houve efeito cruzado entre os tratamentos, pois este tratamento foi utilizado concomitantemente com a sacarose, e tanto esmalte quanto dentina não apresentaram perda mineral quando expostos ao mesmo, corroborando com estudos anteriores (Hara *et al.*, 2003, Paes Leme *et al.*, 2004, Pecharki *et al.*, 2005, Ribeiro *et al.*, 2005; Aires *et al.*, 2006). Os dados de %PDS para esmalte bovino mostraram que o amido não causou perda mineral significativa, assim como foi encontrado em esmalte permanente e decíduo, respectivamente, por Lingstrom *et al.* (1994) e Ribeiro *et al.* (2005). Os dados de pH ajudam a explicar este resultado, pois mesmo causando uma leve queda de pH aos 5 min, a produção ácida a partir do amido não foi suficiente para atingir níveis abaixo do pH crítico do esmalte (pH 5,5), portanto, não foi estabelecida uma condição de subsaturação no biofilme dental em relação ao mineral dental, o que permitiria a desmineralização do dente. Já para a dentina, com seu menor conteúdo mineral e consequente maior solubilidade, a quantidade de ácido produzido devido ao metabolismo do amido foi suficiente para causar perdas minerais capazes de serem medidas pela análise de dureza de superfície e da área da lesão de cárie. Estes achados em dentina estão de acordo com os dados de Aires *et al.* (2008).

Ressalta-se que neste estudo *in situ*, os substratos dentais são de origem bovina, que são mais porosos que o substrato humano, mas ainda são uma ótima opção de substituto para esmalte e dentina humanos, largamente aceito e utilizado em estudos *in vitro* e *in situ* (Mellberg, 1992). Além disso, os blocos dentais tiveram parte de sua superfície planificada e polida, e ao retirar a camada mais externa do mineral, associando o uso de dentifrício não fluoretado, possivelmente acelerou-se a velocidade da lesão.

As quedas de pH provocadas pelos hidrolisados de amido de diferentes equivalentes de dextrose, 5 min após a exposição aos mesmos, não diferiram entre si nem no biofilme dental formado *in situ* sobre blocos de esmalte, tampouco para aquele formado sobre blocos de dentina, concordando com os resultados encontrados *in vivo* por Grenby & Mistry (2000) e Al-Khatib *et al.* (2001). É importante ressaltar que no presente estudo *in situ*, grande quantidade de biofilme foi acumulado sobre os blocos dentais sob alta frequência de exposição à solução de tratamento e que durante as refeições, o dispositivo era removido da cavidade bucal, situação distinta do biofilme dental acumulado nos dentes dos voluntários para teste de acidogenicidade como no estudo de Al-Khatib *et al.* (2001), no qual os voluntários foram instruídos para não escovarem os dentes por 24 h apenas. Os resultados de acidogenicidade do experimento *in vivo* previamente descrito corroboram com os dados do experimento *in situ*. No pH baseline, ambos experimentos não demonstraram diferenças entre os tratamentos, e após 5 min de exposição, todos os hidrolisados de amido provocaram quedas significativas em relação ao controle negativo, sem diferenças estatísticas entre os eles.

## **7. CONSIDERAÇÕES GERAIS**

Com base nos dados de potencial acidogênico do experimento in vivo e in situ e nas perdas minerais encontradas no experimento in situ, surge a preocupação com a frequência de consumo dos hidrolisados de amido, especialmente em indivíduos de maior risco à cárie dental, como os idosos. Esta população muitas vezes encontra-se institucionalizados para o tratamento de outras doenças e recebem suplementação nutricional com hidrolisados de amido, que se associado à higienização oral ineficiente e presença de raízes expostas, favorece o surgimento e progressão de lesões cariosas, principalmente em dentina.

## **8. CONCLUSÃO**

Com base nos experimentos in vivo e in situ, conclui-se que os hidrolisados de amido são fermentados pelo biofilme oral, provocando significativas quedas de pH, e podem levar à desmineralização tanto em esmalte quanto em dentina, quando consumidos em alta frequência.

## REFERÊNCIAS\*

- 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(1): 28-32.
- Aires CP, Del Bel Cury AA, Tenuta LMA, Klein MI, Koo H, Cury JA. Effect of starch and sucrose on dental biofilm formed and on root dentine demineralization. *Caries Res.* 2008; 42(5): 380-6.
- Al-Khatib GR, Duggal MS, Toumba KJ. An evaluation of the acidogenic potential of maltodextrins *in vivo*. *J Dent.* 2001; 29: 409-14.
- Ana PA, Tabchoury CPM, 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: 441-51.
- Box GEP, Hunter WG, Hunter JS, Hunter WG. *Statistics for experiments: design, innovation, and discovery.* New York: John Wiley and Sons Inc.; 2005.
- Cummings JH, Stephen AM. Carbohydrate terminology and classification. *Eur J Clin Nutr.* 2007; 61(1): 5-18.
- Cury JA, Rebello MA, Del Bel Cury AA. *In situ* relationship between sucrose exposure and the composition of dental plaque. *Caries Res.* 1997; 31: 356-60.
- Cury JA, Rebelo MA, Del Bel Cury AA, Derbyshire MT, Tabchoury CPM. Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in the presence of sucrose or glucose and fructose. *Caries Res.* 2000; 34: 491-7.

---

\*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.

- Curzon MEJ, Preston AJ. Risk groups: nursing bottle caries/caries in the elderly. *Caries Res.* 2004; 38: 24-33.
- Danchaivijitr A, Nakornchai S, Thaweewoon B, Leelataweewud P, Phonghanyudh A, Kiatprajak C, Surarit R. The effect of different milk formulas on dental plaque pH. *Int J Pediatr Dent.* 2006; 16: 192-8.
- Del Bel Cury AA, Rebelo MAB, Cury JA. Efeito de bochecho com clorexidina e flúor na redução de formação de placa dental e incorporação de flúor no esmalte dental. *Rev Bras Odontol.* 1994; 51: 26-9.
- Dokic L, Jakovljevic J, Dokic P. Relation between viscous characteristics and dextrose equivalent of maltodextrins. *Starch J.* 2004; 54: 520-5.
- Duarte S, Klein MI, Aires CP, Cury JA, Bowen WH, Koo H. Influences of starch and sucrose on *Streptococcus mutans* biofilms. *Oral Microb Immunol.* 2008; 23(3): 206-12.
- Edgar M, Dawes Colin, O'Mullane D. *Saliva and Oral health.* 3ª Ed. London: British Dental Association; 2004.
- Ettinger S. Macronutrientes: carboidratos, lipídeos e proteínas. In: Mahan LK, Escott-Stump S, editors. *Alimentos, nutrição e dietoterapia.* São Paulo: Roca; 2005. p. 37-71.
- Fushida CE, Cury JA. Estudo in situ do efeito da freqüência de ingestão de coca-cola na erosão do esmalte-dentina e reversão pela saliva. *Rev Odontol Univ São Paulo.* 1999; 13: 127-34.
- Grenby TH. Summary of dental effects of starch. *Int J Food Sc Nutr.* 1997; 48: 411-6.

- Grenby TH, Mistry M. Properties of maltodextrins and glucose syrups in experiments in vitro and in diets of laboratory animals, relating to dental health. *Br J Nutr.* 2000; 84: 565-74.
- 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.
- Henriques, GS. Biodisponibilidade de carboidratos. In: Cozzolino SMF, organizador. Biodisponibilidade de Nutrientes. São Paulo: Manole; 2007. p.124-52.
- Hoppenbrouwers PM, Driessens FC, Borggreven JM. The mineral solubility of human tooth roots. *Arch Oral Biol.* 1987; 32: 319-22.
- Jones JA. Root caries: prevention and chemotherapy. *Am J Dent.* 1995; 8(6): 352-7.
- Kearsley MW, Dziedzic SZ. Physical and chemical properties of glucose syrups. In: Kearsley MW, Dziedzic SZ, editors. Handbook of starch hydrolysis products and their derivatives. London: Blackie Academic & Professional; 1995. p. 129-154.
- Kennedy JF, Knill CJ, Taylor DW. Maltodextrins. In: Kearsley MW, Dziedzic SZ, editors. Handbook of starch hydrolysis products and their derivatives. London: Blackie Academic & Professional; 1995. p. 65-82.
- Lingstrom P, Imfeld T, Birkhed D. Comparison of three different methods for measurement of plaque pH in humans after consumption of soft bread and potato chips. *J Dent Res.* 1993; 72: 865-70.

- Lingstrom P, Birkhed D, Ruben J, Arends J. Effect of frequent consumption of starchy food items on enamel and dentin demineralization and on plaque pH *in situ*. J Dent Res. 1994; 73: 652-60.
- Lingstrom P, Van Houte J, Kashket S. Food Starches and Dental Caries. Crit Rev Oral Biol Med. 2000; 11(3): 366-80.
- Marchal LM, Beeftink HH, Tramper J. Towards a rational design of commercial maltodextrins. Trends Food Science Technol. 1999; 10: 345-55.
- Marsh PD. Sugar, fluoride, pH and microbial homeostasis in dental plaque. Proc Finn Dent Soc. 1991; 87: 515-25.
- Mellberg JR. Hard-tissue substrates for evaluation of cariogenic and anti-cariogenic activity *in situ*. J Dent Res. 1992; 71(Special Issue): 913-9.
- Moynihan PJ, Gould MEL, Huntley N, Thorman S. Effect of glucose polymers in water, milk and a milk substitute on plaque pH *in vitro*. Inter J Ped Dent. 1996a; 6: 19-24.
- Moynihan PJ, Wright WG, Walton AG. A comparison of the relative acidogenic potential of infant milk and soya infant formula: a plaque pH study. Int J Ped Dent. 1996b; 6: 177-81.
- Moynihan PJ. Update on the nomenclature of carbohydrates and their dental effects. J Dent. 1998; 26(3): 209-18.
- Moore GRP, Canto LRC, Amante ER. Cassava and corn starch in maltodextrin production. Quim Nova. 2005; 28(4): 596-600.

Nauntofte J, Tenovuo JO, Langerlöf F. Secreção e composição da saliva. In: Ferjeskov O, Kidd E. Cárie dentária. A doença e seu tratamento clínico. São Paulo: Santos; 2005.

Nelson DL, Cox MM. Lehninger Princípios da Bioquímica. São Paulo: Sarvier, 2002.

Ogaard B, Rolla G, Arends J. *In vivo* progress of enamel and root surface lesions under plaque as a function of time. *Caries Res.* 1988; 22: 302-5.

Palmer TJ. Acid and enzyme hydrolysis of starch. In: Birch GG, Green, LF, Coulson CB, editors. Glucose syrups and related carbohydrates. London: Elsevier; 1970. p. 22-30.

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): 71-5.

Paes Leme AF, Koo H, Bellato C, Bedi G, Cury JA. The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation – New insight. *J Dent Res.* 2006; 85: 878-87.

Papa AMCM, Tabchoury CPM, Del Bel Cury AA, Tenuta LMA, Arthur RA, Cury JA. Effect of milk and soy-based infant formulas on *in situ* demineralization of human primary enamel. *Ped Dent.* 2010; 32 (1): 389-94.

Pecharki GD, Cury JA, Paes Leme AF, Tabchoury CPM, Del Bel Cury AA, Rosalen PL, Bowen WH. Effect of sucrose containing iron (II) on dental biofilm and enamel demineralization *in situ*. *Caries Res.* 2005; 39: 123-9.

Rehder-Neto FC, Menezes M, Chimello DT, Serra MC. Development of caries-like lesions in human and bovine dentin compared to natural caries. *Rev Odontol UNESP.* 2010; 39(3): 163-8.

- Rebello Vieira JM, Rebello MAB, Cury JA. Evaluation of the cariogenic potential of cassava flours from the amazonian region. *Caries Res.* 2002; 36: 417-22.
- Ribeiro CCC, Tabchoury CPM, Del Bel Cury AA, Tenuta LMA, Rosalen PL, Cury JA. Effect of starch on the cariogenic potential of sucrose. *Br J Nutr.* 2005; 94: 44-50.
- Rolla G, Scheie AA, Ciardi JE. Role of sucrose in plaque formation. *Scand J Dent.* 1985; 93: 105-11.
- Rong Y, Sillick M, Gregson CM. Determination of dextrose equivalent value and number average molecular weight of maltodextrin by osmometry. *J Food Science.* 2009; 74 (1): 33-40.
- Russel RRB, Aduse-Opoku J, Sutcliffe IC, Tao L, Ferretti JJ. A binding protein-dependent transport system in *Streptococcus mutans* responsible for multiple sugar metabolism. *J Bio Chem.* 1992; 267: 407-77.
- Sonmez IS, Aras S. Effect of white cheese and sugarless yoghurt on dental plaque acidogenicity. *Caries Res.* 2007; 41(3): 208-11.
- Sreebny LM. Cereal availability and dental caries. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1983; 11: 148 – 55.
- Surmely R, Alvarez H, Cereda MP, Vilpoux OF. Hidrólise do amido. In: *Culturas de tuberosas amiláceas latino americanas.* São Paulo: Fundação Cargill; 2003. p. 377-449.
- Thurnheer T, Giertsen E, Gmur R, Guggenheim B. Cariogenicity of soluble starch in oral in vitro biofilm and experimental rat caries studies: a comparison. *J Applied Microbiol.* 2008; 105: 829-36.

Vale GC, Tabchoury CPM, Del Bel Cury AA, Tenuta LMA, ten Cate JM, Cury JA. APF and dentifrice effect on root dentin demineralization and biofilm. *J Dent Res.* 2011; 90(1): 77-81.

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.

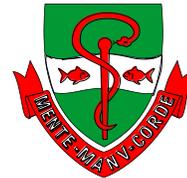
Zero DT. Sugars – The arch criminal? *Caries Res.* 2004; 38: 277-85.

## APÊNDICES

### APÊNDICE 1. Instruções do Experimento in vivo que foram entregues aos voluntários



Universidade Estadual de Campinas  
Faculdade de Odontologia de Piracicaba  
Programa de Pós-Graduação em Odontologia  
Área de concentração – Cariologia  
Docente responsável: Profa. Cíntia P. M.  
Tabchoury  
Mestranda: Karla Evelyn Cook



Título do Estudo: “**Avaliação in vivo do pH de biofilmes cariogênicos expostos a diferentes hidrolisados de amido**”

Orientações para as fases experimentais:

- Cada fase experimental terá duração de 4 dias.
- Durante os quatro dias de experimento, você deverá **interromper a escovação dos dentes posteriores superiores e inferiores** (dentes molares e pré-molares), assim como o uso do fio dental também deverá ser interrompido. Os dentes anteriores e a língua poderão ser normalmente escovados, utilizando o dentífrício fornecido pelas pesquisadoras.
- **No primeiro dia, ir ao laboratório de Bioquímica Oral às 8 h** para obter orientações práticas quanto aos bochechos e receber os potes com as soluções.
- No primeiro dia, o primeiro bochecho será realizado no laboratório, às 8 h. Você receberá 5 doses da solução de tratamento, para as 10 h, 14 h, 16 h e 18 h do mesmo dia, e a primeira dose do dia seguinte, às 8 h.
- No segundo e terceiro dia, a aluna de mestrado será responsável por entregar as soluções de tratamento, pois estas devem ser preparadas diariamente.
- Os potes dos tratamentos estarão devidamente identificados com seu nome, o dia e o horário para realização dos bochechos.
- **Atenção especial para o horário do último bochecho no 3º dia**, pois deverá haver um intervalo de 12 horas entre o último bochecho e a aferição do pH no tempo 0 (ou baseline).
- No 4º dia, apresentar-se ao consultório (sala em frente ao laboratório da Bioquímica Oral) no horário informado, com ao menos 2 horas de jejum.
- O bochecho não deve ser realizado de forma vigorosa, atentar para que a **solução entre em contato com todas as regiões da cavidade bucal**.

- Durante o bochecho, **contar lentamente de 1 a 20.**
- Após cada bochecho, **aguardar 15 min.** para comer ou beber.
- Não há necessidade de mudar seus hábitos alimentares, se alimente normalmente!

Qualquer problema ou dúvidas nos comunicar pelo e-mail: [karlacoock@gmail.com](mailto:karlacoock@gmail.com) ou por telefone: (11) 8295-XXXX (pode ligar a cobrar).

Muito obrigada pela sua participação!

Karla E. Cook  
Profa. Dra. Cínthia P. M. Tabchoury

## APÊNDICE 2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do Experimento in vivo



### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



**Título da Pesquisa:** "Avaliação *in vivo* do pH de biofilmes cariogênicos expostos a diferentes hidrolisados de amido"

Esta pesquisa tem como responsável a Profa. Cíntia P. M. Tabchoury e aluna de Mestrado Karla Evelyn Cook, que fará o convite para participação na pesquisa, a apresentação do TCLE e a obtenção do consentimento pelo voluntário.

**Pesquisadores:** Karla Evelyn Cook, Cíntia Machado Pereira Tabchoury, Jaime Aparecido Cury.

#### Justificativa para a realização da pesquisa

É sabido que os índices de cárie na população têm diminuído, entretanto, a doença não foi erradicada, gerando a necessidade de estudar a ação dos componentes da dieta sobre os microrganismos cariogênicos presentes na boca. Os hidrolisados de amido representam uma ferramenta da indústria para conferir determinadas características a diversos alimentos e bebidas, e apresentam diferentes valores de equivalente de dextrose (DE), dependendo da fonte vegetal do amido e do processo de hidrólise utilizado. Pouco se sabe do efeito destes carboidratos no biofilme formado sobre esmalte dental, tornando importante a avaliação do potencial de queda de pH e consequente desmineralização.

#### Objetivos

Avaliar *in vivo* o efeito de queda de pH do biofilme provocado por hidrolisados de amido de diferentes equivalentes de dextrose.

#### Procedimentos

O estudo será realizado *in vivo* e cruzado, compreendendo 6 fases de 4 dias de duração, das quais participarão voluntários adultos que interromperão a higiene da face bucal dos dentes posteriores e farão bochecho com solução de tratamento 5x/dia. Os voluntários serão casualizados em 6 grupos de tratamento: T1: água destilada e deionizada (controle negativo); T2: solução de sacarose 20% (controle positivo); T3: solução de glicose 20%; T4: solução de hidrolisado de amido (ED 10) 20%; T5: solução de hidrolisado de amido (ED 20) 20%; T6: solução de hidrolisado de amido (ED 40) 20%. Na manhã do quarto dia de cada fase, os voluntários, em jejum de 2 horas, terão aferidos o pH do biofilme e logo em seguida bochecharão o respectivo tratamento, e será novamente aferido o pH do biofilme depois de 5, 15, 30 e 60 min. A higienização dos demais dentes será realizada com dentífrico fluoretado durante o experimento e nos períodos de wash-out.

#### Possibilidade de inclusão em grupo controle ou placebo

Não há possibilidade do voluntário ser incluído em grupo controle ou placebo.

## **Métodos alternativos para obtenção da informação ou tratamento da condição**

Não existem métodos alternativos.

## **Descrição crítica dos desconfortos e riscos previsíveis**

O acúmulo de biofilme por 4 dias não oferece risco de cárie ou de doença periodontal. Mesmo assim, dentifrício fluoretado poderá ser utilizado na higienização dos dentes anteriores, e o fluoreto se difundirá para o biofilme, devido o gradiente de concentração do íon, minimizando a perda mineral. Em acréscimo, ao final de cada fase experimental, os voluntários voltarão a escovar todos os dentes com dentifrício fluoretado e será recomendado que realizem adequada higiene bucal.

## **Descrição dos benefícios e vantagens diretas ao voluntário**

Não há benefício e vantagem direta, entretanto o voluntário contribuirá para a realização deste projeto, gerando e adquirindo conhecimento sobre o assunto estudado.

## **Forma de acompanhamento e assistência ao sujeito**

Os pesquisadores envolvidos na pesquisa estarão à disposição do voluntário para esclarecer quaisquer dúvidas antes, durante e após os tratamentos.

## **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-XXXX (Sala da Profª Cinthia); (19) 2106-XXXX (Laboratório de Bioquímica); (11) 8295-XXXX (celular da Karla).

Em caso de dúvida quanto aos seus direitos como voluntário de pesquisa escreva para o **Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP**: Av. Limeira, 901 - caixa postal 52. Piracicaba - SP – CEP: 13414-903. Tel/fax: (0xx19) 2106-5349. E-mail: [cep@fop.unicamp.br](mailto:cep@fop.unicamp.br). Website: [www.fop.unicamp.br/cep/index.htm](http://www.fop.unicamp.br/cep/index.htm)

## **Garantia de esclarecimento**

O voluntário tem garantia de que receberá resposta ou esclarecimento de qualquer dúvida quanto aos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados à pesquisa ainda que isso possa afetar a vontade do indivíduo em continuar participando. Qualquer dúvida ou problema, por favor, comunicar-nos o mais breve possível.

## **Garantia de recusa à participação ou de saída do estudo**

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

## **Garantia de sigilo**

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

## **Garantia de ressarcimento**

O voluntário será ressarcido de eventuais despesas com o transporte e alimentação.

## **Garantia de indenização e/ou reparação de danos**

Não há danos previsíveis decorrentes desta pesquisa, e desta forma não há previsão de indenização.

**Garantia de entrega da cópia**

O voluntário receberá uma cópia deste documento.

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

---

Nome do voluntário/ RG

---

Assinatura do voluntário

**APÊNDICE 3. Valores médios ( $\pm$  DP) de dureza de superfície iniciais dos blocos de esmalte e dentina aleatorizados em cada tratamento (n=48).**

| <b>Substrato</b>               | <b>Tratamento</b>                          | <b>Dureza de superfície</b>        |
|--------------------------------|--|------------------------------------|
| <b>Esmalte</b><br>(p = 0.6646) | Água <sup>a</sup>                          | 344,1 $\pm$ 11,0                   |
|                                | Amido <sup>a</sup>                         | 342,0 $\pm$ 12,1                   |
|                                | Sacarose <sup>a</sup>                      | 342,4 $\pm$ 11,4                   |
|                                | Hidrolisado de amido ED 5 <sup>a</sup>     | 344,7 $\pm$ 12,5                   |
|                                | Hidrolisado de amido ED 20 <sup>a</sup>    | 344,5 $\pm$ 12,7                   |
|                                | Hidrolisado de amido ED 40 <sup>a</sup>    | 341,4 $\pm$ 13,1                   |
|                                | <b>Média de todos os blocos de esmalte</b> | <b>343,2 <math>\pm</math> 12,1</b> |
| <b>Dentina</b><br>(p = 0.0733) | Água <sup>A</sup>                          | 44,1 $\pm$ 1,9                     |
|                                | Amido <sup>A</sup>                         | 43,4 $\pm$ 2,1                     |
|                                | Sacarose <sup>A</sup>                      | 43,8 $\pm$ 2,4                     |
|                                | Hidrolisado de amido ED 5 <sup>A</sup>     | 43,7 $\pm$ 1,8                     |
|                                | Hidrolisado de amido ED 20 <sup>A</sup>    | 44,3 $\pm$ 2,0                     |
|                                | Hidrolisado de amido ED 40 <sup>A</sup>    | 43,2 $\pm$ 1,8                     |
|                                | <b>Média de todos os blocos de dentina</b> | <b>43,8 <math>\pm</math> 2,0</b>   |

Letras iguais indicam ausência de diferenças estatísticas entre as linhas.

## APÊNDICE 4. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do Experimento in situ



### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



Título da Pesquisa: "Efeito de hidrolisados de amido de diferentes equivalentes de dextrose na acidogenicidade do biofilme e desmineralização dental"

Esta pesquisa tem como responsável a Profa. Cíntia P. M. Tabchoury e aluna de Mestrado Karla Evelyn Cook que fará o convite para participação na pesquisa, a apresentação do TCLE e a obtenção do consentimento pelo voluntário.

Pesquisadores: Karla Evelyn Cook, Profa. Dra. Cíntia Pereira Machado Tabchoury, Prof. Dr. Jaime Aparecido Cury, Profa. Dra. Altair Antoninha Del Bel Cury, Prof. Dr. Wander José da Silva.

#### **Justificativa para a realização da pesquisa**

É sabido que os índices de cárie na população têm diminuído, principalmente quando passou-se a adicionar flúor na água de abastecimento público e com a popularização do uso de dentifrícios fluoretados. Entretanto, a doença não foi extinguida, e hoje procura-se estudar os componentes presentes na alimentação da população e sua ação sobre os microrganismos cariogênicos naturalmente presentes na boca. Os hidrolisados de amido representam uma ferramenta da indústria de alimentos para conferir determinadas características a bebidas esportivas, refrigerantes, sopas em pó, achocolatados, fórmulas infantis, entre outros. Os hidrolisados de amido podem apresentar diferentes valores de equivalente de dextrose (ED), que depende da fonte vegetal do amido e do processo de hidrólise que for aplicado. Entretanto, pouco se sabe do efeito destes carboidratos nos substratos dentais (esmalte e dentina), tornando importante avaliar o potencial cariogênico de hidrolisados de amido com diferentes ED, considerando tanto seu potencial de queda de pH, quanto sua influência sobre os microrganismos orais e consequente desmineralização dental.

#### **Objetivos**

Avaliar *in situ* o efeito de hidrolisados de amido de diferentes equivalentes de dextrose na desmineralização do esmalte e dentina, assim como na acidogenicidade e composição bioquímica e microbiológica do biofilme dental formado.

#### **Procedimentos**

Será realizado um estudo *in situ*, cruzado e boca-dividida, com 3 fases experimentais, do qual participarão voluntários adultos. Os mesmos utilizarão dispositivo palatino contendo blocos de esmalte e dentina pré-selecionados pela dureza de superfície, sendo 2 blocos de esmalte e 2 de dentina em cada lado do dispositivo. Os voluntários serão casualizados em 3 combinações de tratamentos: água destilada e deionizada - controle negativo + solução de sacarose 10%; solução de hidrolisado de amido ED 5, 10% + solução de hidrolisado de amido ED 20, 10%; solução de amido 2% + solução de hidrolisado de amido ED 40, 10%). Os voluntários serão orientados a utilizar o dispositivo diariamente, inclusive para dormir e as soluções de tratamento serão gotejadas extra oralmente sobre os blocos 8 x/dia. A higienização será realizada com dentifrício não fluoretado durante o experimento e nos períodos de lead-in e wash-out. Ao final de cada fase, será feita análise do pH dos biofilmes formados sobre os diferentes substratos e a coleta do biofilme formado sobre os blocos para avaliação microbiológica e bioquímica. Para avaliação da perda

mineral será determinada a dureza de superfície, assim como a do esmalte seccionado transversalmente.

**Possibilidade de inclusão em grupo controle ou placebo**

Não há possibilidade do voluntário ser incluído em grupo controle ou placebo.

**Métodos alternativos para obtenção da informação ou tratamento da condição**

Não existem métodos alternativos.

**Descrição crítica dos desconfortos e riscos previsíveis**

Não há desconfortos e riscos previsíveis.

**Descrição dos benefícios e vantagens diretas ao voluntário**

Não há benefício e vantagem direta, entretanto o voluntário contribuirá para a realização deste projeto e irá adquirir conhecimento sobre a área.

**Forma de acompanhamento e assistência ao sujeito**

Os pesquisadores envolvidos na pesquisa estarão à disposição do voluntário para esclarecer quaisquer dúvidas antes, durante e após as fases experimentais.

**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: 2106-XXXX (Sala da Profª Cinthia); 2106-XXXX (Laboratório de Bioquímica); (11) 8295-XXXX (celular Karla).

Em caso de dúvida quanto aos seus direitos como voluntário de pesquisa escreva para o **Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP**: Av. Limeira, 901 - caixa postal 52. Piracicaba - SP – CEP: 13414-903. Tel/fax: (0xx19) 2106-5349. E-mail: [cep@fop.unicamp.br](mailto:cep@fop.unicamp.br). Website: [www.fop.unicamp.br/cep/index.htm](http://www.fop.unicamp.br/cep/index.htm)

**Garantia de esclarecimento**

O voluntário tem garantia de que receberá resposta ou esclarecimento de qualquer dúvida quanto aos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados à pesquisa ainda que isso possa afetar a vontade do indivíduo em continuar participando. Qualquer dúvida ou problema, por favor, comunicar-nos o mais breve possível.

**Garantia de recusa à participação ou de saída do estudo**

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

**Garantia de sigilo**

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

**Garantia de ressarcimento**

O voluntário será ressarcido de eventuais despesas com o transporte e alimentação.

**Garantia de indenização e/ou reparação de danos**

Não há danos previsíveis decorrentes desta pesquisa, e desta forma não há previsão de indenização.

**Garantia de entrega da cópia**

O voluntário receberá uma cópia deste documento.

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

---

Nome do voluntário/ RG

---

Assinatura do voluntário

## APÊNDICE 5. Instruções do Experimento in situ que foram entregues aos voluntários



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



Projeto de Pesquisa: Efeito de hidrolisados de amido de diferentes equivalentes de dextrose na acidogenicidade do biofilme e desmineralização dental

Aluna de Mestrado: Karla Evelyn Cook  
Profa. Orientadora: Dra. Cíntia P. M. Tabchoury

### INSTRUÇÕES AOS VOLUNTÁRIOS

#### Orientações Gerais

- O aparelho palatino deve permanecer na boca durante todo o dia e noite, devendo ser removido apenas durante as refeições, para comer ou beber algo e para higienização oral.
- Quando o aparelho estiver fora da boca, não deve, em momento algum, ser deixado a seco. Favor guardá-lo sempre no porta-aparelho, em contato com gaze umedecida com água.
- Utilize apenas a pasta de dente fornecida. Se necessitar de outra pasta, é só informar aos pesquisadores.
- A higienização oral poderá ser feita normalmente, 3 vezes ao dia.
- Favor não utilizar produtos de bochecho ou outros agentes tópicos durante as fases experimentais.
- Em geral, não haverá nenhuma mudança na alimentação. Solicitamos, entretanto, que não consuma chá preto, verde e mate durante o experimento, pois estes contêm quantidades significativas de flúor.
- Procure evitar manter o dispositivo fora da boca por períodos prolongados, tentando restringir aos períodos de alimentação.

#### Uso do aparelho palatino

- Em cada fase experimental, dois tratamentos diferentes serão utilizados, um sendo gotejado nos blocos do lado direito, e outro tratamento nos blocos do lado esquerdo. Considerar a cor da resina do dispositivo e a cor no frasco de tratamento.
- O gotejamento deve ser realizado **8 vezes ao dia**. Os horários estão pré-determinados e estão marcados na tampa do porta-aparelho.
- As soluções de tratamento serão entregues e devem **permanecer à temperatura ambiente**. Eles foram esterilizados, portanto não há riscos de contaminação.
- Para gotejar a solução de tratamento, remova o aparelho da boca, seque a região da tela com uma gaze, **dobre a gaze e posicione entre as telas**, para que os tratamentos não escorram e contaminem os blocos opostos. Goteje **uma gota** sobre cada bloco, evitando tocar a ponta do conta-gotas na tela, para não contaminar as soluções.
- Aguardar **5 minutos** e recolocar o aparelho na boca.
- Se acordar tarde e precisar alterar os horários de gotejamento, não há problemas! Iniciar o gotejamento mais tarde, mas mantenha os intervalos e o total de 8 exposições!
- Nosso objetivo é a formação e acúmulo de biofilme (placa dental) acima dos blocos, por isso não tente remover o biofilme sob a tela plástica!

### **Escovação dos dentes e do aparelho**

- Utilizar somente o dentifrício fornecido, que não contém flúor, nem substâncias anti-placa.
- A escovação poderá ser realizada normalmente, após o café da manhã, almoço e jantar.

#### **Modo de escovação**

1. Retirar o aparelho da boca.
2. Escovar os dentes normalmente e enxaguar a boca.
3. Colocar mais pasta de dente na escova e escovar o dispositivo, iniciando da parte que entra em contato com o palato (oposta à tela plástica), para formação de espuma.
4. Virar o dispositivo e escovar a região central do aparelho e em torno da tela. Tomar cuidado para **não escovar sobre a tela plástica**, para não remover o biofilme que está se formando. Arraste a espuma com a lateral da escova sobre a tela.
5. Enxágue o dispositivo, com cuidado para **evitar jatos d'água** caindo sobre a tela plástica, para não remover o biofilme.

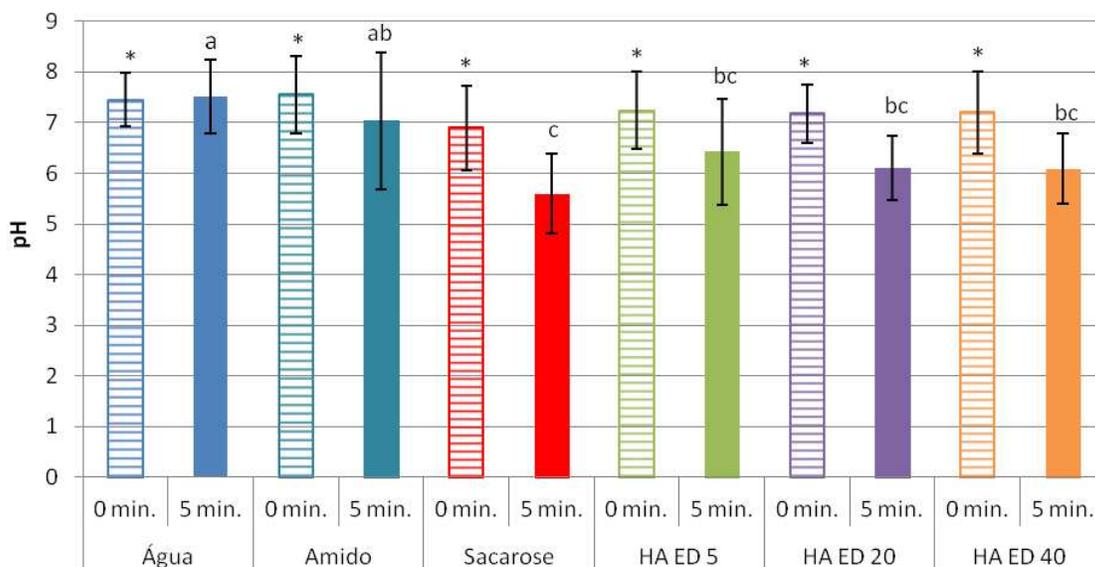
**As soluções de tratamento serão trocadas as segundas, quartas e sextas-feiras. Nestes dias, durante as três fases experimentais, solicitamos a gentileza de retirar as soluções no Laboratório de Bioquímica Oral. As soluções serão identificadas, cuidado para não pegar as soluções trocadas!**

Qualquer dúvida ou problema, favor entrar em contato conosco!

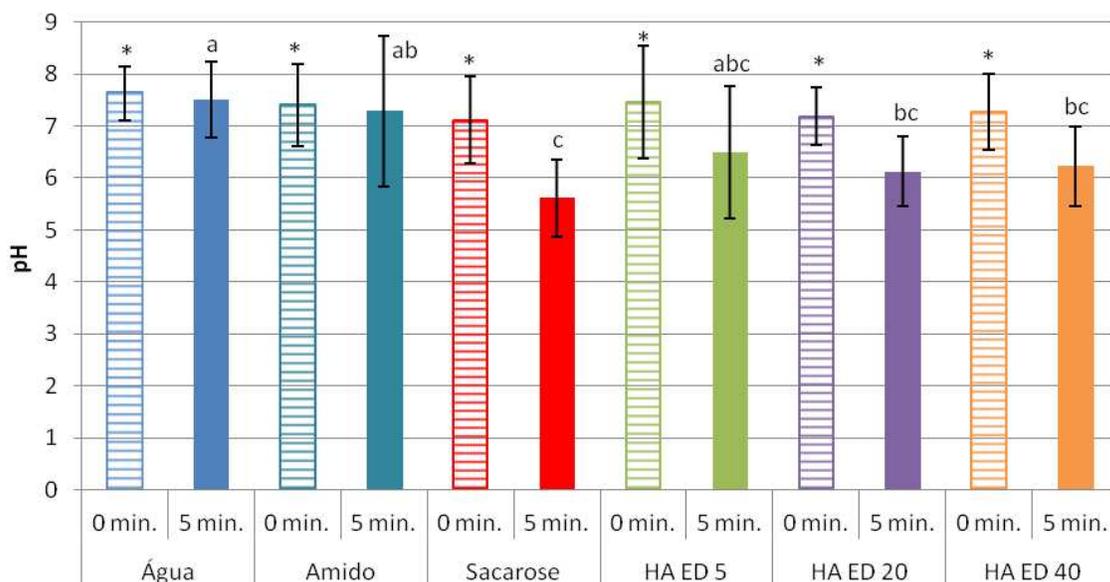
Karla: (11) 8295-XXXX

Profa. Cíntia: 2106-XXXX

**APÊNDICE 6. Gráficos dos dados de acidogenicidade nos blocos de esmalte e dentina, para cada tratamento.**



**Figura 1.** Análise do pH do biofilme formado sobre os blocos de esmalte, no tempo 0 (baseline) e após 5 min. de exposição aos tratamentos (barras indicam DP; n=14). Letras distintas indicam diferença estatística entre os tratamentos.



**Figura 2.** Análise do pH do biofilme formado sobre os blocos de dentina, no tempo 0 (baseline) e após 5 min. de exposição aos tratamentos (barras indicam DP; n=14). Letras distintas indicam diferença estatística entre os tratamentos.



**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 de maltodextrinas de diferentes equivalentes de dextrose na acidogenicidade do biofilme e na desmineralização dental**", protocolo nº 142/2009, dos pesquisadores Cíntia Pereira Machado Tabchoury, Altair Antoninha Del Bel Cury, Jaime Aparecido Cury e Karla Evelyn Cook, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 21/05/2011.

The Ethics Committee in Research of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that the project "**Effect of maltodextrins with different dextrose equivalent on biofilm acidogenicity and dental demineralization**", register number 142/2009, of Cíntia Pereira Machado Tabchoury, Altair Antoninha Del Bel Cury, Jaime Aparecido Cury and Karla Evelyn Cook, 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 05/21/2011.

**Profa. Dra. Livia Maria Andalo Tenuta**  
Secretária  
CEP/FOP/UNICAMP

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