FERNANDA DE MORAIS FERREIRA

**EFEITO DO XILITOL EM PASTILHAS NA COMPOSIÇÃO DO
BIOFILME DENTAL E NA DESMINERALIZAÇÃO E
REMINERALIZAÇÃO DO ESMALTE**

São Paulo

2007

Fernanda de Moraes Ferreira

**Efeito do xilitol em pastilhas na composição do biofilme dental e na
desmineralização e remineralização do esmalte**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Área de Concentração: Odontopediatria

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Guedes-Pinto

São Paulo

2007

FOLHA DE APROVAÇÃO

Ferreira FM. Efeito do xilitol em pastilhas na composição do biofilme dental e na desmineralização e remineralização do esmalte [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2007.

São Paulo, / / 2007.

Banca Examinadora

1) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

2) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

3) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

4) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

5) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

À inesquecível professora Célia,
para quem este trabalho era tão importante...
Exemplo raro de extrema sabedoria e humildade coexistindo em uma mesma
pessoa.

Diz um antigo provérbio africano que
“quando um homem morre é como se uma biblioteca inteira se incendiasse”.
A sua partida foi uma perda muito maior do que essa, pois nem uma biblioteca
inteira é capaz de ensinar sentimentos nobres como os seus...

Saudades eternas...

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A DEUS, que sempre me cercou de pessoas maravilhosas que me ajudaram a chegar até aqui.

Aos meus pais, Vanda e José Aloízio, por todas as vezes que adiaram seus sonhos para que eu pudesse realizar os meus. Mas, sobretudo, por terem me ensinado desde muito cedo o que é o amor incondicional: que não importava quantos títulos eu iria conseguir ou quantos artigos eu viria a publicar ao longo da minha vida, pois, independente deles, eu sempre seria muito importante para vocês. E saber disso faz toda a diferença...

Aos meus queridos irmãos, Juliana e Rafael, que sempre estiveram comigo, me apoiando com atitudes e palavras, não só nesta caminhada, mas em toda a minha vida.

Ao André, meu marido, a quem coube a pior parte desta história: amar uma mulher estressada em tempos de Pós-Graduação e ainda compreender a sua ausência... E você desempenhou tão bem este papel, sendo sempre companheiro e encorajador, que tornou mais leve o meu fardo... Serei eternamente grata por todo o seu carinho... Te amo muito!

À família Ferreira Matsuyama, que me acolheu de portas abertas em São Paulo, permitindo que eu fizesse parte dela por alguns anos... Vocês são muito especiais! Jamais irei esquecer tudo que fizeram por mim.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Célia Regina Martins Delgado Rodrigues, por todos os ensinamentos e pela maneira segura e serena de transmiti-los. Por toda a confiança em mim depositada e por ter sempre disponível um sorriso e muitas palavras de carinho, conforto e incentivo. Obrigada por ter sido esta pessoa maravilhosa, apaixonada pela Odontopediatria, pela docência e pela pesquisa... Obrigada pela oportunidade de ter participado dessa sua paixão.

Ao Prof. Dr. Antônio Carlos Guedes-Pinto, por ter me dado a oportunidade de fazer parte da Pós-Graduação em Odontopediatria da FO-USP, o que me proporcionou tamanho aprendizado. Por ser este grande mestre, exemplo de liderança, sempre firme e justo, pronto a ajudar na solução dos problemas, fossem eles da ordem que fossem. Obrigada, professor, por dividir comigo suas sábias reflexões sobre a Odontopediatria e sobre a vida. Obrigada também por ter assumido minha orientação neste trabalho em um momento tão difícil para todos nós.

À Prof^a. Dr^a. Cíntia Pereira Machado Tabchoury, exemplo de dedicação e carinho no exercício da carreira acadêmica, pela paciência, disponibilidade e cuidado dedicados a este trabalho. Minha eterna gratidão por ter confiado em mim desde o início e ter me possibilitado, juntamente com os demais professores da sua disciplina, este enorme aprendizado no campo da Cariologia. Obrigada ainda pelo seu apoio nesta reta final, sacrificando inclusive momentos de sua vida pessoal, que foi imprescindível para a finalização desta tese!

À Prof^a. Dr^a. Márcia Pinto Alves Mayer que, com suas grandes idéias, aprimorou em muito este trabalho. Obrigada pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório, o que representou uma grande contribuição para meu crescimento profissional. Sua competência e fibra serão sempre um estímulo para prosseguir.

Ao Prof. Dr. Fausto Medeiros Mendes, que inicialmente não era nem meu professor, nem meu colega de Pós-Graduação, mas que, ao longo destes anos, acabou se tornando as duas coisas e, mais do que isso, um grande amigo. Agradeço muito sua

disponibilidade de ler as pressas meus capítulos inacabados e suas contribuições valiosas a eles. Mas agradeço ainda mais por todas as vezes que ouviu meus desabafos e fez de tudo para me tranquilizar...

À Prof^a. Dr^a. Cláudia Perez Trindade, por ter compartilhado comigo seus conhecimentos sobre xilitol e ter me ensinado muitos procedimentos laboratoriais na microbiologia.

Ao Prof. Dr. Marcelo José Strazzeri Bönecker, por ter participado ativamente no desenrolar de momentos decisivos desta tese.

Ao Prof. Dr. José Carlos Petorossi Imparato, que, embora talvez nem ele mesmo saiba, teve grande participação na minha decisão de prestar a prova de Doutorado da Odontopediatria da FO-USP. Obrigada pelas palavras de encorajamento e pelas oportunidades oferecidas.

Às demais Professoras da Disciplina de Odontopediatria da FO-USP: Prof^a. Dr^a. Ana Estela Haddad, Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia Ciamponi, Prof^a. Dr^a. Márcia Turolla Wanderley, Prof^a. Dr^a. Maria Salete Nahás Pires Corres, pela acolhida carinhosa e convivência científica compartilhada ao longo destes anos.

Aos professores do curso de mestrado em Odontopediatria da FO-UFMG, em especial Prof^a. Dr^a. Isabela Almeida Pordeus, Prof^a. Dr^a. Miriam Pimenta Parreira do Vale e Prof. Dr. Saul Martins de Paiva, que me iniciaram na pesquisa científica e na trajetória acadêmica e estão sempre me incentivando a progredir.

Aos voluntários que se prontificaram a participar com seriedade e dedicação deste estudo. Tudo que será apresentado nesta tese só foi possível graças ao desprendimento e disponibilidade de vocês! MUITO OBRIGADA!

Aos colegas de Pós-Graduação em Odontopediatria da FO-USP: Adriana Ortega, Adriana Tashima, Alessandra, Anna Carolina, Ana Paula, Cássio, Daniela Forlin, Daniela Ferraz, Fernanda Nahás, Francisco, Gabriela, Isabela, Luciana Butini, Luciana Sanglard, Marcela, Mariana, Marise, Monique, Ricardo, Sandra, Selma e Thiago, dos quais guardarei ótimas lembranças. Todos vocês, cada um a seu modo, foram muito importantes nesta minha fase de crescimento e neste trabalho. Tenho certeza de que fiz verdadeiros amigos aqui e confesso que já sinto saudades...

“As amizades mais sólidas formam-se na mútua adversidade, assim como o ferro se une com mais força sob chamas intensas”.

Charles Caleb Colton

Às queridas Andréa e Selma, com as quais tive a oportunidade de conviver mais de perto durante a minha estada em São Paulo, proximidade esta que serviu para realçar as suas qualidades e reforçar nossos laços de amizade. Obrigada por tudo!

À minha amiga Sandra, com quem desde o início tive uma grande afinidade. Sua determinação, força e sinceridade são alguns dos motivos da minha admiração. Muito obrigada por todos os ótimos momentos de descontração e de trabalho que passamos juntas. Serão inesquecíveis!

A Flávia Palone e Christiana Murakami, que estão se iniciando na pesquisa, mas já demonstram potencial para se tornarem grandes pesquisadoras. Obrigada por tudo que fizeram por este estudo.

Aos amigos Juliana e Reginaldo, que tantas vezes abriram as portas da sua casa de recém-casados para me acolher em Piracicaba.

Aos colegas de Pós-Graduação dos outros Departamentos, Unidades e Faculdade nos quais foram realizadas partes deste trabalho, pela disponibilidade, colaboração e agradável convivência.

Aos funcionários: Clemência, Fátima, Júlio e Marize (Departamento de Ortodontia e Odontopediatria da FO-USP), Antônio, Mirtes, Rosa e Silvio (Departamento de Materiais Dentários da FO-USP), Sônia (Departamento de Dentística da FO-USP), João Paulo (Laboratório de Microbiologia Oral do ICB II-USP), Alfredo, Greice e Waldomiro (Laboratório de Bioquímica Oral da FOP-UNICAMP), cuja disponibilidade e competência foram imprescindíveis para a realização deste trabalho.

À bibliotecária Glauci Elaine Damásio Fidelis pela estruturação e formatação do texto, correção das referências e elaboração da ficha catalográfica.

À empresa Chupa Chups S.A. (Barcelona, Espanha) pela confecção e doação das pastilhas utilizadas neste estudo.

Ao cirurgião-dentista e amigo Geraldo Guimarães pela ajuda na coleta dos dentes.

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), nas pessoas dos engenheiros Elizabete e Carlos, pela esterilização dos dentes e de outros materiais usados nesta pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos durante o curso.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão do auxílio pesquisa (Processo nº. 52154-5/05).

A todos que estiveram presentes nesta caminhada, meus sinceros agradecimentos!

Ferreira FM. Efeito do xilitol em pastilhas na composição do biofilme dental e na desmineralização e remineralização do esmalte [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2007.

RESUMO

Apesar dos conhecimentos já existentes sobre o xilitol, seu efeito no desenvolvimento da cárie dentária ainda requer maiores esclarecimentos. Assim, este estudo *in situ* randomizado, duplo-cego e cruzado teve como objetivo determinar o efeito de xilitol em pastilhas na composição do biofilme dental e nos processos de desmineralização e remineralização do esmalte, comparado a um controle com pastilhas contendo sorbitol. Em duas fases de 14 dias, 11 voluntários utilizaram dispositivos palatinos com seis blocos de esmalte humano (três hígidos para avaliação da desmineralização + três previamente desmineralizados para avaliação da remineralização) com dureza de superfície conhecida. Sacarose 20% foi gotejada oito vezes ao dia apenas sobre os blocos hígidos. Cinco minutos após cada gotejamento, os dispositivos eram recolocados na boca e os voluntários chupavam pastilha com xilitol 88,3% ou sorbitol 84,5%. A utilização das pastilhas iniciou-se uma semana antes de cada fase experimental. Foi usado dentífrico sem flúor. Ao final de cada fase, o biofilme formado sobre os blocos foi coletado e dividido para análises microbiológica e bioquímica, e os fragmentos de esmalte foram analisados quanto a variação de dureza de superfície antes e após o experimento. A porcentagem de perda de dureza de superfície dos blocos de esmalte do grupo do xilitol apresentou uma tendência a ser menor do que aquela observada no grupo do sorbitol, embora a diferença não tenha sido significativa ($p=$

0,066; ANOVA). Também não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos em relação à porcentagem de ganho de dureza de superfície e à maioria dos parâmetros bioquímicos do biofilme. As médias das concentrações de fósforo inorgânico e de polissacarídeo intracelular no biofilme no experimento de desmineralização foram significativamente menores ($p < 0,001$ e $p = 0,007$) no grupo do sorbitol. As porcentagens de estreptococos do grupo mutans (SM) em relação ao total de estreptococos (S) ($p = 0,037$) no experimento de desmineralização, assim como as contagens de SM ($p = 0,035$) e lactobacilos ($p = 0,048$), e as porcentagens de SM em relação ao total de microrganismos ($p = 0,035$) e em relação a S ($p = 0,017$) no experimento de remineralização foram significativamente menores no biofilme do grupo do xilitol. Os demais parâmetros microbiológicos não foram influenciados de maneira significativa pelos tratamentos. O uso de pastilhas com xilitol por curtos períodos de tempo não apresentou vantagem nem em diminuir a desmineralização nem em favorecer a remineralização do esmalte em comparação ao uso de pastilhas com sorbitol, mas alterou a ecologia bacteriana do biofilme, reduzindo as contagens e as porcentagens de importantes grupos de microrganismos cariogênicos.

Palavras-Chave: xilitol; sorbitol; desmineralização do dente; remineralização dentária; placa dentária

Ferreira FM. Effect of xylitol mints in the dental biofilm composition and in the enamel demineralization and remineralization [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2007.

ABSTRACT

In spite of the existing knowledge about xylitol, its effect on the development of dental caries is still a subject that requires further clarifications. Thus, this randomized, double-blind, crossover *in situ* study aimed at assessing the effect of xylitol mints in the dental biofilm composition and in the processes of enamel demineralization and remineralization, in comparison to a control group using sorbitol mints. During the two phases of 14 days, 11 volunteers wore palatal appliances with six human enamel blocks (three intact ones for evaluation of demineralization and three demineralized ones for the evaluation of remineralization) of known superficial hardness. A solution of 20% sucrose was dripped only on the intact enamel blocks eight times per day. Five minutes after each dripping, the appliances were placed back inside the mouth and the volunteers took either an 88.3% xylitol mint or an 84.5% sorbitol mint. Both types of mints started being used by the volunteers one week before each experimental phase. Non-fluoridated toothpaste was used. At the end of each phase, the biofilm formed over the blocks was collected and divided for microbiological and biochemical analysis and the enamel fragments were evaluated in relation to surface hardness variation before and after the experiment. The percentage of surface hardness loss of the enamel blocks in the xylitol group tended to be lower than in those of the sorbitol group although this difference was not significant ($p= 0.066$; ANOVA). Moreover, there were no statistically significant differences between the

study groups regarding the percentage of surface hardness gain or regarding the biochemical parameters of the biofilm. The average concentrations of inorganic phosphorus and of intracellular polysaccharides in the biofilm for the demineralization experiment were significantly lower ($p < 0.001$ and $p = 0.007$) in the sorbitol group. The following results were significantly lower in the xylitol group biofilm: percentages of mutans streptococci (SM) in relation to the total number of streptococci (S) ($p = 0.037$) in the demineralization experiment; SM ($p = 0.035$) and lactobacilli ($p = 0.048$) count; and the percentages of SM in relation to the total number of microorganisms ($p = 0.035$) and in relation to S ($p = 0.017$) in the remineralization experiment. Other microbiological parameters were not significantly influenced by the treatments. Taking xylitol mints during short periods of time did not show advantages regarding the decrease of enamel demineralization or the promotion of enamel remineralization when compared to taking sorbitol mints. However, it did expressively alter the bacterial ecology of the biofilm, reducing the percentage and count of important groups of cariogenic microorganisms.

Keywords: xylitol; sorbitol; tooth demineralization; tooth remineralization; dental plaque

SUMÁRIO

	p.
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1 Estudos clínicos sobre a influência do xilitol e do sorbitol nos índices de cárie.....	21
2.2 Efeitos do xilitol e do sorbitol sobre o substrato dental.....	29
2.3 Efeitos do xilitol e do sorbitol sobre o biofilme.....	41
3 PROPOSIÇÃO.....	64
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	65
4.1 Seleção dos voluntários.....	65
4.2 Considerações éticas.....	66
4.3 Delineamento experimental.....	66
4.4 Fase preparatória / laboratorial I.....	68
4.5 Fase clínica.....	74
4.6 Fase laboratorial II.....	76
4.7 Análise estatística.....	81
5 RESULTADOS.....	83
5.1 Análise dos efeitos de seqüência (<i>carry-over</i>) e de período.....	83
5.2 Análise do efeito dos tratamentos.....	95
6 DISCUSSÃO.....	100
7 CONCLUSÕES.....	125

REFERÊNCIAS.....	126
APÊNDICES.....	136
ANEXO.....	142

1 INTRODUÇÃO

A importância da dieta, em especial dos carboidratos fermentáveis, na etiologia da doença cárie tem sido evidenciada por estudos epidemiológicos, observacionais, clínicos, laboratoriais e com animais. Entre os carboidratos, a sacarose é considerada o mais cariogênico. O seu consumo em alta frequência leva à seleção de espécies acidogênicas e acidúricas no biofilme dental, principalmente estreptococos do grupo mutans (SM) e lactobacilos (LB) (MARSH, 1994). As bactérias presentes no biofilme a utilizam na via glicolítica, e geram como produtos finais ácidos capazes de promover a desmineralização dental. Algumas delas também se beneficiam da sacarose utilizando-a como substrato para a produção de polissacarídeos intra (PIC) e extracelulares (PEC), os quais são considerados fatores de grande importância na sua cariogenicidade (DIBDIN; SHELLIS, 1988; SHEMESH et al., 2006; THURNHEER et al., 2006).

Desta forma, açúcares substitutos da sacarose têm sido usados na tentativa de eliminar ou pelo menos reduzir o desenvolvimento da doença cárie. Os polióis são açúcares alcoólicos não-cariogênicos, dentre os quais o xilitol aparece como um dos mais promissores. A partir dos estudos de açúcar de Turku (SCHEININ et al., 1975; SCHEININ; MÄKINEN; YLITALO, 1976), que demonstraram uma diminuição no desenvolvimento da doença cárie quando a sacarose foi total ou parcialmente substituída pelo xilitol, vários estudos clínicos e de campo examinaram os efeitos de chicletes ou pastilhas contendo xilitol e demonstraram uma redução considerável na incidência de cárie dentária (entre 30-85%, dependendo da metodologia e da população de estudo) em comparação ao efeito de produtos adoçados com

sacarose ou ao não consumo de chicletes ou pastilhas (ALANEN; ISOKANGAS; GUTMANN, 2000; HONKALA et al., 2006; ISOKANGAS; TIEKSO; ALANEN, 1988; KANDELMAN; GAGNON, 1990). Entretanto, estes estudos geram dúvidas se o efeito preventivo se deve ao xilitol ou ao estímulo do fluxo salivar em ausência de sacarose. Machiulskiene, Nyvad e Baelum (2001) demonstraram que o uso de chiclete controle (com adoçante não-acidogênico e não-cariogênico) foi tão efetivo na redução dos índices de cárie quanto chiclete adoçado com sorbitol ou xilitol, indicando que o efeito preventivo de mascar chicletes sem açúcar pode estar mais relacionado ao processo de mastigação que ao efeito do poliol. Contudo, uma relação de dose-efeito observada em alguns estudos sugere a existência de um efeito do xilitol por si só (KANDELMAN; GAGNON, 1987; MÄKINEN et al., 1995b).

Os resultados dos estudos clínicos deram origem a estudos *in situ*, *in vitro* e com animais na tentativa de compreender os mecanismos de ação do xilitol. Na literatura, há relatos de que o xilitol possa intervir em cada um dos fatores etiológicos essenciais ou primários da doença cárie. Em relação ao substrato dental, o xilitol parece diminuir a perda mineral e até promover remineralização de sítios desmineralizados ao aumentar o fluxo salivar por um estímulo mecânico dado por seus veículos, ou seja, através da intensa mastigação de chicletes ou sucção de pastilhas, e também por um estímulo gustativo causado por seu sabor agradável. Um aumento no fluxo salivar aumenta diretamente todas as características protetoras da saliva, como capacidade tampão, atividade imunológica e antimicrobiana, remoção bacteriana por agregação e manutenção de supersaturação de íons cálcio e fósforo em relação à hidroxiapatita (HICKS; GARCIA-GODOY; FLAITSZ, 2003). Quando o consumo de produtos adoçados com xilitol acontece com frequência, logo após os desafios cariogênicos, é provável que

ocorra uma inibição clínica no fenômeno de desmineralização dental, pois, em presença de fluxo salivar aumentado, o pH do biofilme não cai a valores críticos ou retorna mais rapidamente ao normal (CREANOR et al., 1992; LEACH; LEE; EDGAR, 1989). O fato de o xilitol não provocar queda de pH no biofilme e ao mesmo tempo aumentar os fatores de defesa do hospedeiro favorece a remineralização. A constatação de que a adição de altas concentrações de xilitol diminui a desmineralização *in vitro* (ARENDS et al., 1984, 1990) chamou a atenção para o fato de que o xilitol pode influenciar o processo des-remineralização, também interagindo com os minerais do esmalte. Acredita-se que o xilitol tenha capacidade de se associar ao cálcio em solução aquosa (MÄKINEN; SÖDERLING, 1984), possa retardar a difusão de íons cálcio e fosfato dissolvidos para fora do esmalte (ARENDS et al., 1984, 1990) e, ainda, agir como um carregador de cálcio necessário para a remineralização do esmalte (MÄKINEN; SÖDERLING, 1984).

Em relação à dieta, ele é capaz de substituir os açúcares fermentáveis sem induzir queda de pH no biofilme. Xilitol não é fermentado em produtos ácidos por bactérias cariogênicas (IMAI et al., 1984; MÄKINEN et al., 1985) e nenhuma adaptação do biofilme dental humano, no sentido de utilizar o xilitol como fonte de energia, foi detectada (GEHRING et al., 1974; KNUUTTILA; MÄKINEN, 1975; MÄKINEN et al., 1985). Moléculas pequenas como a do xilitol (com apenas cinco grupos carbono) não servem como substrato para enzimas microbianas (LOESCHE et al., 1984).

Em relação aos microrganismos, já foi descrito que o xilitol pode reduzir a quantidade de biofilme (BIRHED et al., 1979; MÄKINEN et al., 1985; MOUTON; SCHEININ; MÄKINEN, 1975a, 1975b, 1975c; SÖDERLING et al., 1989, 1997; WENNERHOLM et al., 1994), a proporção de SM no biofilme (GEHRING et al.,

1974, 1976; ISOKANGAS et al., 1991; LOESCHE et al., 1984; MÄKINEN et al., 1989; SÖDERLING et al., 1989), interferir na síntese de PEC destas bactérias (MÄKINEN et al., 1985; SÖDERLING et al., 1987), além de selecionar uma flora teoricamente menos patogênica (TANZER et al., 2006; TRAHAN et al., 1992; TRAHAN; MOUTON, 1987). Ao entrar na célula via sistema frutose fosfotransferase fosfoenol piruvato (C_{fru} -PTS), o xilitol é acumulado como xilitol-5-fosfato. Uma vez que esse metabólito não é utilizado pela célula de SM, ele acaba sendo desfosforilado e expelido na forma de xilitol puro. Esse ciclo fútil consome energia resultando em inibição do metabolismo e do crescimento bacteriano, conforme observado *in vitro* (ASSEV; RÖLLA, 1986; HRIMECH et al., 2000; TRAHAN, 1995; TRAHAN et al., 1985; TRAHAN; NÉRON; BAREIL, 1991). Ocorrendo clinicamente, este processo pode provocar uma redução no acúmulo de biofilme e no número de SM no biofilme. Além disso, exposição prolongada ao xilitol parece desempenhar um efeito seletivo nos SM, resultando na emergência de populações resistentes ou tolerantes ao mesmo (SM X^r), capazes de fermentar glicose na presença de xilitol sem que seu crescimento seja inibido *in vitro* (GAUTHIER; VADEBONCOEUR; MAYRAND, 1984; TRAHAN; BOURGEAU; BRETON, 1996) e *in vivo* (SATO; YAMAMOTO; KIZAKI, 2000; TRAHAN et al., 1992; TRAHAN; MOUTON, 1987), o que não significa, contudo, que possam fermentar o xilitol em produtos ácidos. As cepas de SM X^r apresentam menor capacidade de colonizar a superfície dental (TANZER et al., 2006), o que as torna potencialmente menos cariogênicas e pode, também, estar relacionado a uma redução na quantidade e na proporção de SM do biofilme em presença de xilitol (TRAHAN et al., 1992).

Porém, entre todos os efeitos do xilitol citados anteriormente, talvez os únicos que estejam bem estabelecidos e para os quais não haja resultados controversos na

literatura sejam sua incapacidade de ser fermentado em produtos ácidos por microrganismos cariogênicos e sua habilidade de estimular o fluxo salivar através de seus veículos. Apesar dos conhecimentos já existentes sobre o xilitol, estamos longe de entender completamente suas múltiplas influências sobre um complexo ecossistema como o biofilme dental e sobre os também complexos fenômenos de perda e ganho mineral do esmalte. Ainda há necessidade de maiores esclarecimentos a respeito dos mecanismos de ação do xilitol em relação à doença cárie, principalmente diante de um adequado controle para o estímulo do fluxo salivar.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O sorbitol é um açúcar alcoólico do tipo hexitol (seis grupos carbono) amplamente empregado em produtos “sem-açúcar”. Além de ser um adoçante, tem ação umectante e de agregação em produtos como dentifrícios e balas, e, quando presente em níveis suficientemente elevados, funciona ainda como conservante. O fato de o sorbitol ser um açúcar não-cariogênico e, ao mesmo tempo, sem esperado efeito anti-cariogênico faz com que este hexitol seja muito usado como controle negativo em comparações com o xilitol em pesquisas. As moléculas de sorbitol e de xilitol contêm a mesma base (CH_2O). Assim, qualquer diferença entre os efeitos dos dois pode ser atribuída ao “comprimento” da molécula, ou seja, à presença, na molécula de sorbitol, de um grupamento CH_2O extra (MÄKINEN et al., 1985).

A literatura relacionada ao papel dos polióis no desenvolvimento da cárie dentária é extensa e muitos aspectos têm sido revistos recentemente. Assim, esta revisão se focou em trabalhos relacionados aos parâmetros que serão avaliados nesta tese. Para facilitar a compreensão, ela será dividida em estudos clínicos longitudinais avaliando a influência do xilitol e também do sorbitol nos índices de cárie e estudos mais direcionados sobre os efeitos destes açúcares, em especial do xilitol, no substrato dental e no biofilme.

2.1 Estudos clínicos sobre a influência do xilitol e do sorbitol nos índices de cárie

O primeiro estudo clínico com sorbitol em relação à cárie dentária data de 1964. Nele, crianças que receberam tabletes com sorbitol desenvolveram 48% menos lesões de cárie do que crianças do grupo controle, que não receberam tabletes (SLAKC; MILLWARD; MARTIN, 1964). Contudo, a frequência de ingestão e a quantidade consumida não foram relatadas. No primeiro estudo com chicletes, crianças que mastigaram chicletes com sorbitol três vezes ao dia tiveram 10% menos lesões de cárie após um período de dois anos do que crianças que não mascaram chicletes (MÖLLER; POULSEN, 1973). Um estudo com duração de três anos na Hungria revelou uma redução de cárie de 48% em crianças que consumiram chocolates adoçados com sorbitol em relação a crianças que comeram chocolates adoçados com sacarose (BÁNÓCZY et al., 1981).

Van Loveren realizou uma revisão da literatura disponível até 2004 e constatou que a maioria dos estudos clínicos que investigaram o sorbitol o fizeram através de chicletes e indicaram que o consumo entre ou após as refeições de chicletes com sorbitol por longos períodos tem um efeito preventivo de cárie dentária para a dentição permanente se comparado ao não consumo de chicletes ou ao consumo de chicletes adoçados com sacarose (redução nos índices de cárie de 0% a 38%). Mascar chicletes com sorbitol pode ser efetivo na prevenção da cárie dentária também para a dentição decídua (MÄKINEN et al., 1996). Mas o número de estudos a esse respeito ainda é restrito.

Os clássicos estudos de açúcar de Turku, Finlândia, na década de 1970, foram os primeiros estudos clínicos desenvolvidos para avaliação dos possíveis efeitos do uso do xilitol na dieta sobre o desenvolvimento da cárie dentária. Em um deles, a sacarose foi quase totalmente substituída pelo xilitol na dieta. Após dois anos, o grupo da sacarose teve um incremento no CPOS de 7,2, enquanto o grupo do xilitol não teve nenhum incremento (SCHEININ; MÄKINEN; YLITALO, 1976). Em um estudo paralelo com chicletes que comparou a incidência de cárie ao longo de 12 meses, o grupo que recebeu chicletes adoçados com sacarose desenvolveu aproximadamente três novas superfícies cariadas, perdidas ou obturadas (CPOS), enquanto no grupo que mastigou chicletes adoçados com xilitol o CPOS diminuiu uma unidade. Ou seja, a substituição parcial de açúcar pelo xilitol levou a uma redução de 80% no incremento do CPOS (SCHEININ et al., 1975).

A partir dos estudos de açúcar de Turku (SCHEININ et al., 1975; SCHEININ; MÄKINEN; YLITALO, 1976), vários estudos clínicos e de campo examinaram os efeitos de chicletes ou pastilhas contendo xilitol. Estes estudos demonstraram uma redução considerável na incidência de cárie dentária (entre 30% e 85%, dependendo da metodologia e da população de estudo) em comparação ao efeito de produtos adoçados com sacarose ou ao não consumo de chicletes ou pastilhas (ALANEN; ISOKANGAS; GUTMANN, 2000; HONKALA et al., 2006; ISOKANGAS; TIEKSO; ALANEN, 1988; KANDELMAN; GAGNON, 1990; MACHIULSKIENE; NYVAD; BAELUM, 2001; MÄKINEN et al., 1995b; SCHEININ et al., 1985).

Pastilhas contendo xilitol são tão efetivas na prevenção de cárie quanto chicletes contendo xilitol. Esta foi a conclusão de um estudo clínico randomizado realizado com 740 crianças de dez anos de idade na Estônia, no qual o efeito do uso de chicletes com xilitol, três vezes ao dia, foi comparado ao efeito do consumo com a

mesma frequência de balas adoçadas com xilitol suplementadas com maltitol ou polidextrose e, ainda, a um grupo controle sem produtos contendo xilitol (ALANEN; ISOKANGAS; GUTMANN, 2000). A dose diária de xilitol foi a mesma em todos os grupos teste (5g de xilitol/dia). Decorridos três anos, todos os grupos de xilitol demonstraram uma redução significativa no incremento de cárie, sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais que consumiram chicletes (redução de 53,5%) ou balas (redução de 33% a 59%).

Após rever a literatura relacionada ao assunto, Van Loveren (2004) considerou que há uma boa quantidade de evidências de que o uso de chicletes ou balas adoçados com xilitol ou com uma mistura de xilitol e sorbitol várias vezes ao dia, por períodos prolongados, possa prevenir a cárie dentária em comparação a controles sem uso de chicletes ou com uso de chicletes adoçados com sacarose.

Entretanto, estes estudos não permitem avaliar se o efeito preventivo se deve ao xilitol ou ao estímulo do fluxo salivar em ausência de sacarose. Para medir o efeito preventivo de cárie do xilitol por si só, chicletes ou balas adoçados com o pentitol precisam ser comparados a produtos que não contenham sacarose, sendo adoçados com um adoçante não-acidogênico, não-cariogênico e ao mesmo tempo sem efeito anti-cariogênico. Machiulskiene, Nyvad e Baelum (2001) demonstraram que, após três anos de acompanhamento, chicletes controle com estas características foram tão efetivos na redução dos índices de cárie quanto chicletes adoçados com sorbitol ou xilitol quando consumidos cinco vezes ao dia, indicando que o efeito preventivo de mascar chicletes sem açúcar possa estar mais relacionado ao processo de mastigação que ao efeito do poliól.

Contudo, uma relação de dose-efeito observada em alguns estudos assim como o efeito preventivo de cárie persistente observado anos após a interrupção do uso do xilitol sugerem a existência de um efeito do xilitol por si só.

O efeito de mascar três vezes ao dia chicletes adoçados com xilitol 65% ou uma mistura de xilitol 15% e sorbitol 50% foi comparado ao de não mascar chicletes em crianças canadenses de nível econômico baixo e alto índice de cárie. Após 12 meses de acompanhamento, o incremento de cárie e a taxa de progressão das lesões foram significativamente menores nos grupos que mascaram chicletes em relação ao grupo controle. O chiclete contendo a maior concentração de xilitol (65%) reduziu de maneira significativa a taxa de progressão das lesões também em comparação ao chiclete com menor concentração de xilitol (15%), sugerindo uma relação de dose-resposta (KANDELMAN; GAGNON, 1987). Após 24 meses de acompanhamento esta relação não se confirmou: os resultados em relação à taxa de progressão das lesões foram semelhantes para os dois grupos experimentais e ambos tiveram um incremento médio no CPOS de 2,24 superfícies, comparado com o incremento de 6,06 superfícies obtido pelo grupo controle (KANDELMAN; GAGNON, 1990). Contudo, a taxa de perda amostral no segundo ano foi grande, de 48%, e pode ter influenciado nos resultados. Esta perda se deveu à saída do estudo de duas escolas, sendo uma delas de crianças com alta prevalência de cárie no grupo de chicletes com xilitol 15% e outra de crianças com baixa prevalência de cárie no grupo de chicletes com xilitol 65%, de maneira que os grupos ficaram desproporcionais em relação a esse importante parâmetro inicial. O estudo de Yliveska, na Finlândia, avaliou o efeito de diferentes freqüências relatadas de uso de chicletes adoçados com xilitol: $\leq 1,5$ pedaço de chiclete por dia, 2 a 2,5 pedaços ou 3 pedaços (ISOKANGAS; TIEKSO; ALANEN, 1988). Depois de dois anos, o

incremento no CPOS do grupo que relatou ter consumido $\leq 1,5$ chiclete não foi diferente do observado no grupo controle que não mascou chicletes. No grupo que relatou um consumo de 2 a 2,5 pedaços de chiclete houve uma redução de aproximadamente 35% no incremento do CPOS em relação ao grupo controle, sem diferença estatisticamente significativa, enquanto para o grupo que relatou ter consumido 3 pedaços por dia a redução foi significativa e de aproximadamente 57%. O aumento na dose de xilitol aumentou sua eficácia, mas isso foi obtido através do aumento no número de chicletes consumidos por dia, ou seja, neste estudo a maior eficácia pode estar mais relacionada a um aumento no estímulo do fluxo salivar do que à dose de xilitol. Os resultados do estudo de Belize (MÄKINEN et al., 1995b) que avaliou o efeito de chicletes adoçados com xilitol, sorbitol ou com mistura dos dois polióis na mesma frequência em comparação ao não uso de chicletes sugerem uma relação entre a concentração de xilitol e o incremento de cárie durante 40 meses: o uso de chicletes contendo sorbitol 65% e 0% de xilitol provocou alguma redução no incremento de cárie (redução de 36%), o uso de chicletes adoçados com duas diferentes misturas de sorbitol e xilitol reduziu um pouco mais o incremento de cárie (redução de 44% a 51%), enquanto o uso de chicletes com xilitol 65% e 0% de sorbitol foi responsável pela maior redução no incremento de cárie (redução de 73%), com diferença estatisticamente significativa para os demais grupos.

O efeito preventivo de cárie persistente do xilitol foi verificado para dois tipos distintos de população. Primeiramente foi relatado por Isokangas et al. (1993) para crianças finlandesas de 11 a 12 anos de idade com acesso a fluoretos e a moderna assistência odontológica. Quando as crianças do estudo de Ylivieska (ISOKANGAS; TIEKSO; ALANEN, 1988) foram reexaminadas cinco anos após o fim da intervenção, as que haviam consumido chicletes com xilitol três vezes ao dia durante dois anos

ainda apresentavam redução nos índices de cárie quando comparadas àquelas que não consumiram chicletes. As diferenças entre os grupos foram ainda maiores após cinco anos do que as diferenças observadas imediatamente após o período de intervenção. Posteriormente, efeito semelhante foi observado quando crianças de seis anos de idade, com acesso restrito a fluoretos e cuja assistência odontológica se limitava basicamente a extrações, do estudo de Belize (MÄKINEN et al., 1996), foram reexaminadas anos após o fim do estudo clínico original (HUJOEL et al., 1999). A probabilidade de que estas crianças tenham consumido algum dos produtos experimentais ao longo destes anos é extremamente pequena uma vez que eles não estavam disponíveis em um raio de 180 km. Cinco anos após o experimento, as crianças que consumiram sistematicamente, por dois anos, chicletes contendo xilitol ou uma mistura de xilitol e sorbitol ainda apresentavam menores índices de cárie que as crianças do grupo controle original que não consumiram chicletes. A proteção foi mais pronunciada entre as crianças que consumiram chicletes com apenas xilitol 65% (redução do risco de cárie em 59% no grupo xilitol e 44% no grupo xilitol-sorbitol). Comparado ao grupo que não fez uso de chicletes, o consumo de chicletes com apenas sorbitol não apresentou efeito preventivo persistente. No estudo de Alanen, Isokangas e Gutmann (2000), as diferenças no incremento de cárie entre o grupo controle, que não fez uso de produtos contendo xilitol, e os grupos que fizeram uso de balas adoçadas com xilitol por dois anos continuaram aumentando durante o terceiro ano de acompanhamento já sem consumo de balas ou chicletes com xilitol. No estudo de Isokangas et al. (2000), o uso de chicletes com xilitol de duas a três vezes ao dia por mães com altos níveis salivares de SM a partir de três meses após o parto até que a criança completasse dois anos de idade reduziu em aproximadamente 70% o índice de cárie

na dentição decídua (ceo) das crianças aos cinco anos de idade em comparação à aplicação de verniz fluoretado ou verniz de clorexidina aos seis, 12 e 18 meses após o parto. A diferença entre os índices de cárie das crianças aos cinco anos foi estatisticamente significativa entre o grupo xilitol e os grupos controle. Os dois grupos controle se comportaram de forma semelhante em relação à experiência de cárie das crianças aos cinco anos de idade. Várias explicações foram sugeridas para este efeito preventivo persistente como mudanças microbiológicas duradouras, padrões diferentes de colonização bacteriana dos dentes em erupção e/ou maturação do esmalte sob circunstâncias mais favoráveis. Embora estes estudos não tenham tido um grupo controle adequado para o estímulo do fluxo salivar, parece improvável que as diferenças verificadas entre os grupos que consumiram chicletes com xilitol e os que não consumiram chicletes se devam apenas a um aumento na frequência mastigatória ocorrido vários anos antes (ISOKANGAS et al., 1993).

Alguns dos estudos clínicos citados acima tentaram comparar o efeito preventivo de cárie do xilitol e do sorbitol no mesmo ambiente. No estudo de Belize (MÄKINEN et al., 1995b), os incrementos de cárie mais baixos foram de 4,6 lesões por 1000 superfícies por ano em crianças que iniciaram o estudo com dez anos de idade e mascaram chicletes com xilitol cinco vezes ao dia. Aquelas crianças que mascaram cinco chicletes com sorbitol por dia desenvolveram 12,6 lesões de cárie por 1000 superfícies por ano. Estes resultados indicam que o xilitol foi significativamente superior ao sorbitol em reduzir o risco de ataque cariogênico. Para as crianças de seis anos de idade com alta atividade inicial de cárie do estudo de Belize (MÄKINEN et al., 1996), o incremento de cárie na dentição decídua não foi significativamente diferente entre os grupos que mascaram chicletes com sorbitol ou

xilitol e os dois tipos de chiclete reduziram este incremento em relação ao não uso de chicletes. O risco de uma superfície de dente decíduo desenvolver lesão de cárie em um ano nos grupos de chicletes com xilitol e com sorbitol foi respectivamente de 35% a 53% e de 44% a 70% do risco observado para o grupo que não mascou chiclete. No estudo da Lituânia com crianças de nove a 14 anos de idade, o incremento de cárie em três anos do grupo que consumiu chicletes com xilitol (média de incremento de 8,1 no CPOS) não foi significativamente diferente do incremento verificado no grupo que consumiu chicletes com sorbitol (média de incremento de nove superfícies no CPOS) (MACHIULSKIENE; NYVAD; BAELUM, 2001). Assim, quando os efeitos preventivos de cárie de chicletes adoçados com xilitol e com sorbitol foram comparados diretamente, embora a superioridade do xilitol não tenha sido suportada por todos os estudos, há uma sugestão de que haja uma maior redução nos índices de cárie com o uso de chicletes adoçados com xilitol.

O efeito observado nos estudos clínicos de produtos contendo polióis, em especial xilitol, de diminuir a incidência de cárie levou ao desenvolvimento de estudos *in situ*, *in vitro* e com animais buscando entender melhor a ação destes açúcares sobre os processos de desmineralização e remineralização do dente e sobre o biofilme dental.

2.2 Efeitos do xilitol e do sorbitol sobre o substrato dental

2.2.1 Efeitos do xilitol e do sorbitol na desmineralização dental

Baseado em estudos *in vitro*, tem sido proposto que o xilitol, em altas concentrações, possa afetar diretamente a desmineralização do esmalte.

A adição de xilitol a soluções desmineralizadoras reduziu a desmineralização do esmalte humano e bovino *in vitro*, sendo esta influência dependente da concentração de xilitol na solução (efeito melhor evidenciado após 21 dias em altas concentrações, a partir de 2,63M) (ARENDS et al., 1984). Foi observado, também, utilizando-se moléculas radioativamente marcadas com carbono ^{14}C , que o xilitol penetra rapidamente no esmalte humano desmineralizado, onde pode afetar o transporte de íons. Os autores consideraram que o provável mecanismo através do qual o xilitol inibe a dissolução ácida do esmalte possa estar relacionado a sua capacidade de interferir no transporte dos componentes dissolvidos do esmalte do interior da lesão para a solução circundante. O xilitol apresenta (assim como o sorbitol) capacidade não específica de interagir com íons cálcio em solução, formando complexos estáveis (MÄKINEN; SÖDERLING, 1984) e reduzindo o coeficiente de difusão deste íon (ARENDS et al., 1984). Arends et al. (1990), ao investigar através de microrradiografia transversal o efeito do flúor e do xilitol na desmineralização do esmalte bovino *in vitro*, constataram que 6ppm de F ou 2,63M de xilitol tiveram efeito semelhante, reduzindo a lesão formada após 21 dias em cerca de 30%. Foi observado efeito aditivo para flúor e xilitol nestas concentrações,

de maneira que a redução na desmineralização foi da ordem de 68% quando estes agentes foram utilizados em conjunto. Os autores concluíram que, assim como o flúor, o xilitol reduz a desmineralização do esmalte, mas provavelmente através de mecanismos de ação diversos: enquanto íons fluoreto em solução afetam a taxa de dissolução mineral do esmalte ou formam precipitados semelhantes a fluorapatita, o xilitol parece agir diminuindo a difusão dos íons cálcio e fosfato para fora do esmalte desmineralizado. É interessante notar que 6ppm de F correspondem a 0,3mM de F, de maneira que o F demonstrou efetividade muito maior que o xilitol em retardar a desmineralização do esmalte.

Por outro lado, no estudo de Amaechi, Higham e Edgar (1999), o acréscimo de xilitol (20% peso/volume) à solução desmineralizadora não diminuiu de maneira significativa a perda mineral do esmalte bovino medida por microrradiografia, como aconteceu quando flúor 0,5ppm ou flúor 0,5ppm + xilitol 20% foram adicionados à solução. Embora a perda mineral tenha sido numericamente menor frente à combinação flúor + xilitol em relação à exposição apenas ao flúor, a diferença entre estes dois grupos não foi estatisticamente significante, demonstrando apenas sutil efeito aditivo do xilitol ao flúor. A limitação na proteção oferecida pelo xilitol foi relacionada pelos autores à baixa dose usada.

Alguns estudos *in situ* foram desenvolvidos na tentativa de estudar os efeitos dos polióis na desmineralização, mas problemas metodológicos presentes na maioria deles, como falta de padronização sobre o desafio cariogênico instituído e ausência de um grupo controle adequado, dificultam conclusões a partir dos mesmos.

Usando um modelo intrabucal, Kashket, Yaskell e Lopez (1989) observaram que mascar um chiclete com sorbitol por 30 minutos imediatamente após um desafio

cariogênico realizado com bochecho com solução de sacarose 10% foi particularmente efetivo em reduzir a desmineralização de blocos de esmalte bovino cobertos por uma camada de células de *S. mutans*. A desmineralização avaliada, através da diferença de permeabilidade à tintura de iodo antes e após a fase intrabucal, quando os voluntários mascaram chicletes cinco minutos após o bochecho foi 63% menor que a desmineralização verificada quando nenhum chiclete foi consumido. Porém, quando o uso do chiclete foi iniciado 30 minutos após o bochecho, este não foi capaz de diminuir a desmineralização, pois, neste momento, a perda mineral já havia acontecido. Os resultados foram relacionados ao estímulo do fluxo salivar induzido pelo ato de mascar.

Por sua vez, Wennerholm et al. (1994) não observaram efeito do uso freqüente de chicletes adoçados com xilitol, sorbitol ou mistura dos dois polióis em diminuir a desmineralização. Os autores desenvolveram um estudo *in situ* duplo-cego, randomizado e cruzado, com quatro fases de 21 dias nas quais 17 voluntários utilizaram dispositivo palatino com dois blocos de esmalte humano previamente desmineralizados *in vitro* e mascaram 12 chicletes por dia, após as refeições. Quatro tipos de chicletes foram usados: adoçados com xilitol, com sorbitol ou com mistura de xilitol e sorbitol em duas proporções diferentes. Não foi empregado nenhum desafio cariogênico além da dieta normal dos voluntários. Todas as amostras de esmalte perderam ainda mais mineral durante os períodos experimentais (análise por microrradiografia). Contudo, a profundidade da lesão, assim como os valores de perda mineral, não diferiu de forma significativa entre os grupos.

Uma alternativa para se tentar avaliar um possível efeito específico dos polióis na desmineralização é trabalhar com soluções, eliminando-se, assim, o efeito de

estimulação do fluxo salivar que ocorre quando se utiliza produtos do tipo chicletes ou balas como veículo.

Koulourides et al. (1976) avaliaram o efeito de nove açúcares na desmineralização do esmalte bovino submetido a desafio cariogênico *in situ* representado pela dieta normal dos voluntários em ausência de dentifrício fluoretado. A extensão da desmineralização ocorrida em uma semana na qual os blocos de esmalte dos dispositivos eram expostos a soluções teste nas concentrações de 3%, quatro vezes ao dia, durante dez minutos, foram medidas através de dureza de superfície e comparadas ao efeito produzido por uma solução controle (sacarose 3%). Sorbitol provocou desmineralização significativamente menor que a sacarose, enquanto xilitol não foi cariogênico neste delineamento experimental.

Exposição a uma solução de xilitol 2,5% durante cinco minutos, duas vezes ao dia, reduziu de forma significativa a desmineralização do esmalte em superfícies livres de biofilme em ausência de dentifrício fluoretado, mas não teve efeito sobre superfícies cobertas por biofilme. Estas foram as conclusões do estudo *in situ* randomizado e cruzado de Smits e Arends (1988), no qual blocos de esmalte humano, com fissuras artificialmente produzidas e desmineralizadas *in vitro*, montados em próteses removíveis de 11 voluntários, foram imersos em uma das soluções experimentais (sacarose 2,5%, xilitol 2,5%, água destilada). Após 16 dias, os tratamentos com sacarose e água resultaram em três vezes mais perda mineral (microrradiografia) que o tratamento com xilitol na superfície do esmalte. A imersão em xilitol provocou, ainda, uma redução na profundidade da desmineralização na superfície do esmalte (luz polarizada). Nas paredes laterais e no fundo da fissura, não foram observadas diferenças entre os efeitos das três soluções, ou seja, o xilitol

não reduziu a desmineralização nestas áreas. Sacarose 2,5% e água destilada obtiveram resultados semelhantes, o que mostrou que sacarose na concentração e na frequência empregadas neste estudo não representou um desafio cariogênico além do provocado pela dieta normal dos voluntários.

Gonçalves et al. (2006) investigaram se uma mistura de xilitol com sorbitol poderia potencializar o efeito de fluoretos na redução da desmineralização do esmalte quando utilizados em enxaguatórios bucais. Para tanto, realizaram estudo *in situ* em que blocos de esmalte bovino, em contato com “biofilme teste” composto por uma camada de células de *S. mutans* previamente cultivados, eram expostos por um minuto a um dos seguintes tratamentos: água destilada deionizada (H₂O dd = controle); solução fluoretada (F = 226g F/ml, concentração encontrada em enxaguatórios comerciais); solução com xilitol e sorbitol (X/S = 1: 3, concentração final de 1,6M ou 28% de açúcares alcoólicos) e solução fluoretada mais xilitol e sorbitol (F + X/S). O efeito dos tratamentos foi avaliado através da redução nos valores de dureza de superfície induzida por bochecho com solução de sacarose 20%. Não foi observado nenhum efeito aditivo para a combinação F + X/S. Ou seja, quando avaliadas separadamente, a solução fluoretada foi capaz de reduzir a desmineralização, enquanto a solução com X/S não teve efeito. A solução F + X/S se mostrou tão efetiva quanto a solução fluoretada em impedir a desmineralização, de maneira que este resultado pode ser atribuído a um efeito isolado do flúor presente na solução. Os autores consideraram que o tempo limitado de exposição às soluções (um minuto) ou a pequena concentração de xilitol usada no estudo possam ter sido responsáveis pela inefetividade da mistura.

Assim, nem o efeito isolado do xilitol e/ou do sorbitol na redução da desmineralização do esmalte foi demonstrado consistentemente até agora.

2.2.2 Efeitos do xilitol e do sorbitol na remineralização dental

Tem sido sugerido que o uso de açúcares alcoólicos promova remineralização, mas a evidência para tal informação a partir de estudos clínicos é pouco clara.

No estudo de açúcares de Turku, havia três grupos que consumiam dietas adoçadas com sacarose ou com frutose ou com xilitol. No grupo do xilitol, o incremento médio de cárie ao longo de dois anos caiu durante os três últimos meses de 0,8 para zero (SCHEININ; MÄKINEN; YLITALO, 1976). Estes resultados foram interpretados como evidência de remineralização. Contudo, avaliações clínicas e radiográficas cuidadosas revelaram o mesmo número de evoluções de “cáries sem defeito estrutural” para “superfícies híginas” em cada grupo de dieta. Reversões de lesões mais avançadas não foram observadas. No estudo paralelo com chicletes de Turku, um incremento negativo de aproximadamente uma superfície por indivíduo foi observado ao longo de 12 meses de uso de chicletes contendo xilitol. Porém, o artigo do estudo (SCHEININ et al., 1975) não separa os valores de incidência e reversão, de maneira que não fica claro se o incremento negativo se deve a um maior número de reversões (inativação de lesões), a um número menor de novas lesões ou a ambos.

Kandelman e Gagnon (1987) interpretaram o número significativamente mais alto (três vezes maior) de reversão de lesões observado entre as crianças dos grupos experimentais que consumiram chicletes com xilitol em comparação às crianças que não usaram chicletes como indicativo de que o uso regular de chicletes contendo xilitol (três vezes ao dia) seja capaz de provocar remineralização dental.

Ao observar clinicamente a paralisação de lesões cáries que ocorreu durante os dois estudos clínicos longitudinais com chicletes de Belize (MÄKINEN et al., 1995a), região com alta prevalência de cárie, foi observada remineralização em 13-27% das lesões dentinárias em dentes permanentes de crianças que mascararam chicletes contendo xilitol ou uma mistura de xilitol e sorbitol por 40 meses. No grupo de chicletes adoçados apenas com sorbitol, a remineralização ocorreu em 11% das lesões. Em dentes decíduos, as taxas de remineralização de lesões dentinárias após 18 meses variaram de 15% a 28% nos grupos que usaram chicletes com xilitol ou com mistura de xilitol e sorbitol, contudo, neste substrato, chicletes com apenas sorbitol apresentaram a mesma eficácia quanto a remineralização (15%) que aqueles com mistura de xilitol e sorbitol na proporção de 4:1. O uso de chicletes com apenas xilitol cinco vezes ao dia apresentou uma tendência a ser mais efetivo (26% e 27% das lesões remineralizadas para dentes permanentes e decíduos respectivamente) que o consumo de chicletes em uma frequência menor ou que o uso de chicletes adoçados com sorbitol ou mesmo com mistura de xilitol e sorbitol. Os autores concluíram que o consumo adequado de chicletes com xilitol pode remineralizar lesões cáries extensas em dentina na ausência de programas preventivos de cárie e quando não é possível realizar restaurações funcionais destes dentes. No entanto, é preciso ressaltar que o tipo de lesão mostrado na publicação foi, em sua maioria, amplas cavidades oclusais de cárie as quais são facilmente submetidas à atrição funcional e a remoção mecânica de biofilme, de maneira que o efeito mecânico da mastigação, e não o açúcar alcoólico por si só, possa ter tido grande responsabilidade nas mudanças clínicas relatadas.

Honkala et al. (2006) constataram que o uso regular (três vezes por dia letivo, tempo de sucção de cinco a dez minutos) de balas com xilitol durante 18 meses teve

efeito remineralizador em lesões de cárie de estudantes com comprometimento metal do Kuwait. Esta conclusão foi baseada no alto número de reversão de lesões observadas nos estudantes que consumiram balas com xilitol (212 superfícies) em relação aos que não consumiram balas (apenas uma superfície). Contudo, o número de estudantes no grupo teste era muito maior do que no grupo controle.

Mais uma vez o problema de ausência de um grupo controle adequado para o estímulo do fluxo salivar dificulta a avaliação da real participação dos polióis sobre as relatadas remineralizações destes estudos.

Efeito remineralizador do xilitol em lesões iniciais de cárie foi observado por alguns autores (HAVENAAR et al., 1984) em estudo com ratos, independente do alto conteúdo de sacarose na dieta destes animais e da presença de *S. mutans* no biofilme. Porém, em lesões mais avançadas, o xilitol não teve efeito.

Amaechi, Higham e Edgar (1999) avaliaram *in vitro* a remineralização de lesões artificiais de cárie expostas por 21 dias a saliva artificial (SA), SA suplementada com flúor 0,05ppm, SA suplementada com xilitol 20% (peso/volume), ou SA suplementada com flúor + xilitol. Não houve diferença estatística entre os grupos em relação aos parâmetros perda mineral e profundidade de lesão, medidos por microrradiografias. Ao considerar os valores numéricos de remineralização (diferença entre os parâmetros antes e após a exposição às soluções), esta foi maior nos blocos de esmalte bovino do grupo SA + flúor, seguidos pelos dos grupos SA, SA + flúor + xilitol e SA + xilitol, nesta ordem. Os resultados demonstraram que o xilitol não favoreceu a remineralização de lesões artificiais de cárie, podendo, inclusive, diminuir o potencial remineralizador do flúor nas concentrações utilizadas. Os autores atribuíram os resultados obtidos quando xilitol foi adicionado a SA à ligação de moléculas do poliól a íons cálcio e fosfato formando compostos e

exaurindo a solução circundante nestes íons, que são de fundamental importância na remineralização de lesões de cárie. Contudo, Mäkinen e Söderling (1984) relataram, com base em estudos de precipitação, que tanto xilitol 0,5M quanto sorbitol 0,5M retardam de maneira significativa a precipitação de fosfato de cálcio a partir de uma solução contendo os íons cálcio e fosfato, podendo, com isso, favorecer a remineralização de lesões cariosas. Além disso, por apresentarem habilidade de se ligarem ao cálcio em solução aquosa formando complexos estáveis, o xilitol e o sorbitol são capazes de agir como carregadores de cálcio necessário para a remineralização do esmalte (MÄKINEN; SÖDERLING, 1984).

Miake et al. (2003) observaram *in vitro* diferentes padrões de remineralização do esmalte humano, previamente desmineralizado, em presença ou ausência de xilitol 20%. Microrradiografias de contato demonstraram que a remineralização da camada mais superficial (0-10µm) foi menor nas amostras expostas ao xilitol, porém, nas camadas intermediárias e profundas ($\geq 50\mu\text{m}$) a remineralização foi maior que a obtida na ausência de xilitol. Estes resultados indicam que o xilitol possa induzir a remineralização das camadas mais profundas do esmalte, agindo como um carregador de cálcio, ou seja, facilitando a movimentação e o acesso de íons Ca^{2+} da solução remineralizadora para as regiões mais internas da lesão. Além disso, embora o exato mecanismo permaneça desconhecido, é provável que os íons fosfato penetrem com mais facilidade nas amostras expostas ao xilitol pelo fato de a camada superficial não estar muito remineralizada. Também não ficou claro o mecanismo responsável pela pequena remineralização superficial obtida com o xilitol, contrariando a expectativa, pois a remineralização do esmalte desmineralizado geralmente ocorre na camada superficial através do reparo de cristais dissolvidos, do aumento no tamanho dos cristais existentes e da deposição de novos cristais.

Estudos *in situ* também não evidenciaram efeito dos polióis em favorecer a remineralização, uma vez que toda a remineralização observada nestas pesquisas parece estar mais relacionada à utilização simultânea de dentifrício fluoretado ou ao efeito de estimulação do fluxo salivar.

Foi demonstrado que chicletes contendo sorbitol como principal açúcar, quando mascarados por 20 minutos imediatamente depois de cada uma das três refeições principais e de dois lanches com sacarose diários pelo período de três semanas, aumentaram significativamente (cerca de duas vezes) a remineralização de lesões artificiais de cárie em blocos de esmalte humano *in situ*, quando comparados a um grupo controle sem mascar chicletes (LEACH; LEE; EDGAR, 1989). A remineralização foi quantificada por diferentes parâmetros através de microrradiografia e microscopia de luz polarizada e foi considerada pelos autores como resultado da estimulação do fluxo salivar provocada pelo chiclete com sorbitol. Foi sugerido que o uso freqüente de chicletes com sorbitol tem efeito terapêutico, reparando lesões de cárie em estágio inicial de pessoas que estejam usando dentifrício fluoretado. Em nenhum momento os autores cogitam a existência de um efeito específico do sorbitol no processo de remineralização. Contudo, a magnitude do efeito isolado do ato de mascar chicletes não ficou clara, uma vez que a concentração de fluoretos nos dentifrícios usados pelos voluntários não foi controlada. Quando Creanor et al. (1992) avaliaram chicletes adoçados tanto com sorbitol, quanto com sacarose, usados pelo mesmo protocolo de Leach, Lee e Edgar (1989), mas por um período de sete semanas, foi observado que ambos aumentaram a remineralização em presença de dentifrício fluoretado, porém este aumento não foi estatisticamente significativo para nenhum dos dois chicletes quando comparado ao ganho mineral do grupo controle sem uso de chicletes. O

protocolo de uso parece ter grande importância nestes resultados: chicletes com sacarose, por exemplo, se mostraram capazes de remineralizar lesões quando usados logo após refeições ou lanches açucarados (qualquer possível efeito deletério do açúcar dos chicletes fica minimizado) e por um longo período como 20 minutos (o pico de sacarose na saliva acontece nos dois primeiros minutos, após os quais a concentração do açúcar cai rapidamente).

Em um estudo *in situ* randomizado e duplo-cego, Manning, Edgar e Agalamanyi (1992) compararam o efeito remineralizador de chicletes adoçados com sorbitol ou mistura de sorbitol e xilitol na proporção de 3:1 sobre lesões de cárie pré-formadas *in vitro* em blocos de esmalte humano. Os chicletes foram mascarados cinco vezes ao dia, após as três refeições principais e dois lanches contendo sacarose, em duas fases cruzadas de 21 dias. Os resultados de luz polarizada e microrradiografia mostraram que mastigar qualquer dos dois chicletes sem açúcar depois das refeições e lanches esteve relacionado com remineralização significativa em presença de dentifrício fluoretado, sem diferença estatística entre os chicletes para nenhum dos parâmetros de lesão avaliados. O efeito remineralizador observado foi relacionado pelos autores ao tempo prolongado de estimulação do fluxo salivar (cada chiclete era mascarado por 20 minutos) após os desafios cariogênicos.

Scheinin et al. (1993) avaliaram, através de um estudo *in situ* em crianças com alta atividade de cárie, o efeito do consumo de dez balas adoçadas com xilitol por dia, durante oito a 12 dias, na desmineralização e na remineralização do esmalte bovino. Para tanto, 24 blocos de esmalte (metade previamente desmineralizados *in vitro*, metade hígidos) foram inseridos com material restaurador provisório em cavidades de cárie não tratadas de crianças que consumiram balas com xilitol enquanto 30 blocos de esmalte foram inseridos em cavidades de crianças que não

tiveram nenhuma alteração na dieta habitual. Ao avaliar a variação de dureza de superfície antes e após a fase intrabucal, a diferença entre os grupos foi altamente significativa. Enquanto nas crianças expostas ao xilitol foi observada remineralização (aumento de dureza) tanto para espécimes que iniciaram o estudo hígidos quanto para os previamente desmineralizados, nas crianças do grupo controle todos os espécimes desmineralizaram (diminuição de dureza). Os resultados foram confirmados através de microrradiografias. Os autores concluíram que o uso de produtos adoçados com xilitol pode favorecer a remineralização mesmo em condições adversas como em populações com alto risco para cárie dentária. O fato de o grupo controle não ter sofrido nenhuma alteração na dieta original enquanto o grupo teste fez uso de dez balas por dia levanta o velho questionamento sobre ser o efeito remineralizador observado decorrente do xilitol ou do aumento do fluxo salivar causado pela sucção das balas.

Smits e Arents (1985) testaram em um estudo randomizado, cruzado e duplo-cego o efeito de quatro diferentes dentifrícios (com glicerina, com xilitol 35%, com glicerina + 500ppm de NaF e com xilitol + NaF) utilizados duas vezes ao dia durante 26 dias sobre a remineralização de blocos de esmalte previamente desmineralizados *in vitro* e acoplados em próteses totais de 20 voluntários. Após os períodos experimentais, os valores de dureza aumentaram significativamente em todos os grupos em relação aos valores iniciais, sem diferença estatisticamente significativa entre eles, indicando que em superfícies livres de biofilme nem o acréscimo de 500ppm NaF, nem de xilitol 35%, representou vantagem em relação à remineralização.

As diferenças entre os delineamentos experimentais dificultam a comparação entre os resultados dos estudos. A literatura existente até agora não dá suporte a um efeito terapêutico do xilitol e/ou do sorbitol em relação à cárie dentária.

2.3 Efeitos do xilitol e do sorbitol sobre o biofilme

2.3.1 Efeitos microbiológicos

Sem dúvida, a maior quantidade de trabalhos relacionando os polióis à cárie dentária o faz avaliando sua influência sobre os microrganismos da cavidade bucal.

Tanto o xilitol quanto o sorbitol já foram testados quanto à capacidade de serem fermentados pelos microrganismos bucais em estudos com animais, *in vitro* e através de medidas de pH do biofilme *in vivo*, e foram classificados como pouco ou não-acidogênicos.

Xilitol é um açúcar que não é metabolizado por SM (MÄKINEN et al., 1985). Com raras exceções, xilitol não é fermentado pelos microrganismos bucais. Nos estudos de açúcar de Turku, algumas cepas de estreptococos isoladas de biofilme humano foram capazes de fermentar xilitol muito lentamente, reduzindo o pH *in vitro* a níveis inferiores a 5,5 a partir deste açúcar. Estas bactérias não se enquadraram em nenhum dos biotipos ou sorotipos conhecidos de *S. mutans* nem foram capazes de produzir PEC (GEHRING et al., 1974, 1976). Imai et al. (1984) reafirmaram que o xilitol é um açúcar não-fermentável por SM ao compararem a velocidade relativa de

queda do pH em fase linear e medidas de pH após cinco e 30 minutos de incubação obtida em cultura de *S. mutans* contendo o poliól ou sacarose isoladamente. Biofilme humano formado após períodos de quatro, 12, 18 e 24 meses de exposição a dietas específicas (com sacarose, frutose ou xilitol), quando inoculado em meios de cultura suplementados com diferentes carboidratos, não demonstrou produção ácida significativa a partir do xilitol. Após sete dias de inoculação, os valores de pH medidos nos meios suplementados com sacarose, frutose e sorbitol se situavam entre 4 e 5. Apenas na presença de xilitol e no meio controle sem adição de açúcar os valores médios de pH foram superiores a 6. Quando o xilitol é o único carboidrato do meio, as células de *S. mutans* preferem utilizar proteínas como fonte de carbono (GEHRING et al., 1974, 1976). A estrutura da molécula do xilitol explica, em parte, estes fenômenos: moléculas pequenas como a do xilitol (com apenas cinco grupos carbono) não servem como substrato para enzimas microbianas, cujo substrato normal são moléculas maiores. Desta forma, os pentitóis inibem as reações enzimáticas de carboidratos, que são baseadas em uma estrutura de seis carbonos (MÄKINEN et al., 1985). Além disso, o xilitol possui, proporcionalmente ao número de átomos de carbono e de oxigênio, dois átomos de hidrogênio extras em relação à proporção encontrada nos carboidratos em geral, dificultando, ainda mais, a sua fermentação em produtos ácidos, especialmente ácido láctico (LOESCHE et al., 1984).

Nenhuma adaptação do biofilme dental humano no sentido de utilizar o xilitol como uma importante fonte de energia foi detectada em consumidores freqüentes de xilitol (BIRKHED et al., 1979; GEHRING et al., 1974; MÄKINEN, 1985; MÄKINEN et al., 1985). No último trabalho, microrganismos coletados da saliva de indivíduos que utilizavam regularmente uma dose diária média de 100mg de xilitol por quilo de peso

corporal durante um período de cinco a 10,5 anos não produziram quantidades significativas de ácido em presença de xilitol. Estes mesmos microrganismos induziram consideráveis quedas no pH em presença de sorbitol ou glicose. A fermentação ácida do biofilme de pessoas que utilizaram dieta adoçada exclusivamente com xilitol por dois anos a partir de sacarose, frutose, sorbitol ou xilitol não indicou a ocorrência de mutação ou adaptação da microbiota para degradar xilitol (GEHRING et al., 1974, 1976). Ou seja, nem mesmo após o consumo intensivo e crônico de xilitol o biofilme demonstrou adaptação a este açúcar *in vivo*. Da mesma forma, não há evidência de que uma possível adaptação de *S. mutans* para metabolizar xilitol possa ocorrer *in vitro* (KNUUTTILA; MÄKINEN, 1975).

Mesmo a maior parte das cepas de *S. Mutans*, assim como de *Lactobacillus casei*, sendo capazes de fermentarem facilmente o sorbitol (VADEBONCOEUR; PELLETIER, 1997), os produtos finais do seu metabolismo são ácido fórmico, ácido acético e etanol, uma mistura que tem pouca capacidade de dissolver o esmalte (BROWM; WITTENBERG, 1973). Em contrapartida, glicose e sacarose são rapidamente metabolizadas e resultam na formação de ácido láctico. Embora o sorbitol seja um hexitol, ele tem dois átomos de hidrogênio a mais que a glicose ou a frutose e, por isso, é utilizado de maneira menos eficiente pelos SM, pois seu metabolismo requer a indução de sistemas de transporte dependentes de energia e de caminhos metabólicos específicos (JANDA; KURAMITSU, 1978; TAKAHASHI-ABBE et al., 2001). Conseqüentemente, a queda de pH após a utilização do sorbitol é menor que após o metabolismo de glicose, frutose ou sacarose (VADEBONCOEUR; PELLETIER, 1997). Igarashi, Lee e Schachtele (1989), usando um eletrodo de pH em humanos, observaram que, em seguida a bochecho com solução de sorbitol 10% por um minuto, o pH do biofilme na base da fissura caiu de

6,2 para 5,9 ao longo dos 30 minutos de experimento. Na região interproximal, o pH caiu de 6,3 para 6,1. Em contraste, exposição à solução de sacarose 10% resultou em um valor de pH de 5,0 na fissura após 15 minutos e de 4,3 na região interproximal. Ainda em comparação com sacarose, frutose ou glicose, o sorbitol é degradado mais lentamente, levando dias para baixar o pH a 5,5 em meio microbiológico, enquanto os primeiros açúcares gastam horas ou mesmo minutos, sendo, portanto, menos cariogênico (GEHRING et al., 1974, 1976).

Foi sugerido que o uso prolongado pode aumentar na microbiota bucal o número de microrganismos capazes de fermentar sorbitol (BIRKHED et al., 1979; GEHRING et al., 1976). Este poliól é utilizado pelos *S. mutans* via sistema fosfotransferase apenas após ser convertido em frutose-6-fosfato, processo que depende de um período de adaptação no qual enzimas específicas para a produção deste metabólito, as desidrogenases intracelulares, são induzida (BOWEN, 1996; BROWN; WITTENBERGER, 1973; JANDA; KURAMITSU, 1978; SLEE; TANZER, 1983; TAKAHASHI-ABBE et al., 2001). Mäkinen et al. (1985) observaram que amostras de biofilme obtidas após o uso de dentifrício com sorbitol duas vezes ao dia por três meses exibiram um maior número de microrganismos capazes de utilizar o sorbitol do que amostras de biofilme obtido após o uso de dentifrício com xilitol ou obtido antes do experimento. Porém, qualquer adaptação que possa ocorrer parece não ser clinicamente relevante. Em presença de outro carboidrato como glicose, o que normalmente acontece na boca, mesmo microrganismos adaptados para usar sorbitol perdem sua habilidade e não o utilizam (BOWEN, 1996; BROWN; WITTENBERGER, 1973; SLEE; TANZER, 1983). A presença de xilitol também paralisa a metabolização do sorbitol por *S. mutans* (ASSEV; RÖLLA, 1986). Sorbitol é transportado para o interior da célula bacteriana por uma fosfotransferase indutível

específica para sorbitol, dependente de fosfoenolpiruvato, resultando na acumulação intracelular de sorbitol-6-fosfato. Este composto é posteriormente metabolizado em frutose-6-fosfato por uma sorbitol-6-fosfato desidrogenase indutível. As duas enzimas são reprimidas na presença de glicose, mesmo em pequena quantidade como a encontrada normalmente no ambiente bucal (BROWN; WITTENBERGER, 1973; SLEE; TANZER, 1983). Este caminho metabólico para catabolismo do sorbitol já foi também demonstrado em outras bactérias, como *Lactobacillus casei* (WOLFF; KAPLAN, 1956).

Nem o xilitol nem o sorbitol servem de substrato para a produção de PEC (glucanos e/ou frutanos) pelas bactérias cariogênicas (BOWEN, 1996; IMAI et al., 1984; SHEMESH et al., 2006).

O consumo de xilitol, principalmente em chicletes, pode reduzir a quantidade de biofilme dental. O uso diário de três, seis ou dez chicletes contendo xilitol reduziu significativamente o peso do biofilme formado durante três dias sem escovação dental em 38-47% quando comparado com o uso de chicletes contendo sacarose e em 20-41% quando comparado ao não uso de chicletes (MOUTON; SCHEININ; MÄKINEN, 1975a, 1975b, 1975c). A redução na quantidade de biofilme foi cerca de 40% maior quando foram consumidos dez chicletes ao dia em relação ao consumo de três chicletes, tanto para xilitol quanto para sacarose. O consumo de dez chicletes por dia adoçados com uma mistura de sorbitol e xilitol, entre as refeições, durante quatro dias, causou uma redução estatisticamente significativa de aproximadamente 28% na quantidade de biofilme em relação ao não uso de chicletes (BIRKHED et al., 1983). No trabalho de Söderling et al. (1989), mascar dez chicletes por dia, após refeições e lanches, contendo xilitol ou uma mistura de xilitol

e sorbitol durante duas semanas, diminuiu a quantidade de biofilme em 29,4% e 24,3%, respectivamente, em relação aos valores iniciais.

Em relação ao sorbitol, a literatura não é unânime. Segundo Bowen (1996), quando sorbitol é usado em chicletes, a combinação de efeitos físicos, salivares e do próprio poliól sobre o biofilme resultam em uma pequena, mas significativa redução na sua quantidade. Por outro lado, consumo de chicletes adoçados com sorbitol não causou nenhuma mudança na quantidade de biofilme em relação ao não uso de chicletes no estudo de Birkhed et al. (1983), e ainda aumentou em 48,3% a quantidade de biofilme em relação aos valores iniciais no estudo de Söderling et al. (1989).

Alguns estudos não encontraram diferença entre a quantidade de biofilme após uso de chicletes com xilitol, sorbitol ou uma mistura dos dois polióis, sugerindo que o sorbitol possa ser tão efetivo quanto o xilitol em chicletes para reduzir biofilme. Nenhuma diferença significativa foi observada entre a quantidade de biofilme formado após um período de 25 dias de uso de 12 chicletes adoçados com xilitol ou com sorbitol ou ainda com uma mistura de xilitol e sorbitol por 17 voluntários no estudo de Wennerholm et al. (1994). Seis semanas de uso de cinco chicletes ao dia adoçados com xilitol ou com sorbitol reduziram significativamente os índices de placa em relação aos índices iniciais e em relação aos índices obtidos quando nenhum chiclete foi mascado (STEINBERG; ODUSOLA; MANDEL, 1992). Apesar da redução entre os índices de placa ter sido mais expressiva para chicletes com xilitol, neste estudo a diferença não foi estatisticamente significativa em relação aos chicletes com sorbitol. O mesmo ocorreu no estudo de Isotupa et al. (1995), no qual, embora a redução na quantidade de biofilme após 28 dias tenha sido melhor evidenciada entre as crianças que receberam seis vezes ao dia chicletes adoçados com xilitol,

chicletes contendo sorbitol ou uma mistura dos dois polióis também produziram reduções significantes nos índices de placa em relação às quantidades iniciais. No trabalho de Söderling et al. (1997), enquanto o uso por duas semanas de chicletes adoçados com xilitol ou com mistura de xilitol e sorbitol reduziu significativamente a quantidade de biofilme em relação às quantidades iniciais, chicletes placebo sem adoçante, usados pelo mesmo tempo, frequência e duração, não tiveram efeito sobre a quantidade de biofilme. Este resultado sugere que os polióis sejam os ingredientes ativos nos chicletes capazes de alterar a quantidade de biofilme dental.

Mäkinen et al. (1985) não encontraram diferença entre a quantidade de biofilme avaliada por peso e índice de placa quando compararam o efeito de dentifrícios contendo sorbitol ou xilitol em um estudo cruzado, duplo-cego, em que voluntários usaram os dentifrícios experimentais por quatro minutos, duas vezes ao dia, durante três meses. A capacidade de adesão do biofilme foi diminuída em relação aos valores iniciais pelos dentifrícios contendo os dois polióis, sem diferença entre eles.

É preciso lembrar, porém, que um efeito quantitativo na redução do biofilme não pode ser supervalorizado do ponto de vista da cariologia. Mais interessante é a capacidade de reduzir a população de bactérias cariogênicas como SM no biofilme.

Um retardo no crescimento em glicose devido à presença de xilitol foi relatado para *S. mutans* Ingbritt (KNUUTTILA; MÄKINEN, 1975) e para nove entre dez cepas de *S. mutans* recém isoladas de biofilme humano (VADEBONCOEUR et al., 1983), embora nem todas as cepas sensíveis tenham sido afetadas da mesma maneira. O acréscimo de xilitol também retardou o crescimento de *S. sobrinus* em presença de glicose (TRAHAN; NÉRON; BAREIL, 1991). A inibição do metabolismo e do crescimento de *S. mutans* e *S. sobrinus* sensíveis ao xilitol pela presença deste no

meio é compatível com uma menor quantidade de energia celular disponível após o gasto energético com o “ciclo fútil” do xilitol e com uma inibição de enzimas glicolíticas pelo xilitol-5-fosfato *in vitro* (HRIMECH et al., 2000; TRAHAN; NÉRON; BAREIL, 1991). Ao entrar na célula bacteriana via sistema constitutivo frutose fosfotransferase fosfoenolpiruvato (^Cfru-PTS), a molécula de xilitol inicia o processo de fosforilação na via glicolítica produzindo um composto intermediário xilitol-5-fosfato. Como esse metabólito intermediário não é utilizado pela célula de SM, ele é acumulado dentro da célula e acaba sendo desfosforilado e expelido na forma de xilitol puro. Esse processo consome energia e é conhecido como “ciclo energético fútil”, resultando em inibição do crescimento e do metabolismo bacteriano (TRAHAN et al., 1985). Assim, o xilitol funciona como um “veneno”, interrompendo o ciclo glicolítico da bactéria e estagnando a produção de ATP (molécula de energia de Adenosina Trifosfato) e de ácidos, sendo, em última instância, bactericida por esgotar os recursos energéticos da célula e provocar sua morte por depleção de energia (TRAHAN, 1995). O efeito tóxico do xilitol sobre a célula bacteriana pode ser consequência do acúmulo intracelular do composto xilitol-5-fosfato que parece inibir o metabolismo dos açúcares úteis, interrompendo a via glicolítica (glicólise) logo nos primeiros estágios por inibir enzimas como a fosfoglicoseisomerase (TRAHAN; NÉRON; BAREIL, 1991) ou a fosfofrutokinase (ASSEV; RÖLLA, 1986), levando à falta de substrato e incapacidade de produção de energia celular. Isso se soma ao gasto energético necessário para exportar o produto insolúvel resultante para fora da célula, causando um processo de bacteriostase (TRAHAN, 1995). O acúmulo intracelular do metabólito fosforilado não-metabolizável xilitol-5-fosfato foi demonstrado como inibidor do crescimento devido ao estabelecimento do “ciclo fútil

do xilitol” também em *Lactobacillus casei* (HAUSMAN; THOMPSON; LONDON, 1984).

Porém, o efeito inibitório do xilitol sobre as bactérias cariogênicas, especialmente *S. mutans*, é ainda conflitante. Enquanto o crescimento de *S. mutans* da cepa OMZ 176 foi inibido pelo xilitol em meio suplementado com glicose (ASSEV; VEGARUD; RÖLLA, 1980), Mühlemann et al. (1977) não observaram efeito do xilitol sobre o crescimento desta cepa de *S. mutans* em presença de sacarose. A adição de xilitol 6% ou sorbitol 6% a um meio de cultura contendo sacarose 3% apenas retardou discretamente o crescimento da cepa de *S. mutans* ATCC 25175 *in vitro* (SÖDERLING et al., 1987). No estudo de Trahan e Mouton (1987), enquanto a adição de 0,5% de xilitol inibiu o crescimento de cepas de *S. mutans* originadas da saliva de voluntários que nunca tinham consumido produtos comerciais contendo xilitol em meio suplementado com glicose 0,2%, o acréscimo de xilitol não foi capaz de restringir o crescimento bacteriano quando o açúcar do meio era frutose ou sacarose. Os autores observaram, ainda, que a presença de frutose ou sacarose no meio de cultura abolia a fosforilação do xilitol que ocorria na ausência de outro carboidrato ou na presença de glicose e lactose. O acréscimo de xilitol 1% também não retardou o crescimento de *S. sobrinus* quando havia frutose no meio, embora o crescimento bacteriano tenha sido inibido em presença de glicose (TRAHAN; NÉRON; BAREIL, 1991). Resultado semelhante foi obtido por Assev e Scheie (1986). Assim, a presença de frutose ou sacarose representa uma garantia contra a toxicidade do xilitol, uma vez que altas quantidades de frutose (seja pelo fornecimento direto deste monossacarídeo ou pela liberação de frutose a partir da hidrólise extracelular da sacarose) previnem a captação do xilitol para o interior da célula bacteriana por competir com este pelo mesmo sistema ^Cfru-PTS que dá

preferência à captação de frutose. A maior afinidade da enzima responsável por este sistema de transporte (enzima frutose EII) pela frutose comparada à afinidade da mesma pelo xilitol garante que apenas frutose seja captada para o interior da célula bacteriana e que a produção intracelular de energia se mantenha, a menos que a proporção entre as concentrações de xilitol e de frutose seja muito alta (TRAHAN et al., 1985; TRAHAN; MOUTON, 1987; TRAHAN; NÉRON; BAREIL, 1991).

Além disso, Assev, Stig e Scheie (2002) demonstraram que a inibição de crescimento causada pelo xilitol em cepas de *S. mutans* em meio com glicose é transitória. *In vitro*, quando o meio contendo xilitol é substituído por um meio fresco, sem xilitol, as células bacterianas readquirem sua taxa de crescimento normal, indicando que à medida que deixam de estar expostas ao pentitol, o composto xilitol-5-fosfato é desfosforilado, expelido e as células reconquistam sua capacidade glicolítica. Se este fenômeno também ocorrer *in vivo*, para que o xilitol desempenhe função inibitória ele precisa estar disponível para as bactérias continua e simultaneamente a baixas quantidades dos demais carboidratos fermentáveis. Dependendo das condições e da natureza dos açúcares exógenos disponíveis, um “ciclo fútil” pode ou não ser estabelecido a partir do xilitol, resultando apenas na redução ou até na exaustão da energia celular (TRAHAN; NÉRON; BAREIL, 1991). Assim, os efeitos do xilitol no biofilme *in vivo* podem ser pouco significantes e provavelmente perceptíveis apenas sob condições extremas (ASSEV; STIG; SCHEIE, 2002).

Os resultados de estudos clínicos mostram que o consumo regular de xilitol tem maior probabilidade de reduzir o número de SM no biofilme e na saliva que o consumo regular de sorbitol. Entretanto, o efeito mutans-redutor do xilitol não é confirmado pela totalidade dos estudos.

Nos estudos de açúcar de Turku, a incidência e a contagem de *S. mutans* no biofilme de pessoas que consumiram por quatro meses dietas com xilitol foram significativamente menores do que em pessoas submetidas a dietas com frutose ou sacarose (GEHRING et al., 1974). A tendência se manteve nas avaliações aos 12 e 18 meses e a diferença entre os grupos foi estatisticamente significativa após 24 meses de exposição às dietas (GEHRING et al., 1976). Os três grupos de dietas não se diferenciaram significativamente em relação às contagens de *S. sanguis*, *S. salivarius* e do total de microrganismos viáveis ao longo do período experimental. No estudo de Loesche et al. (1984), o consumo cinco vezes ao dia de chicletes adoçados com mistura de xilitol e sorbitol por quatro semanas induziu uma significativa redução nos níveis salivares e na proporção de *S. mutans* no biofilme em comparação aos valores anteriores ao tratamento e aos valores obtidos após mascar chicletes com mistura de sorbitol e manitol ou com frutose. Da mesma forma, o uso de chicletes com xilitol cinco vezes ao dia por 30 dias reduziu estatisticamente os níveis salivares de SM nos voluntários do estudo de Trindade (2005), em relação aos níveis iniciais. O consumo, também por cinco vezes ao dia, de chicletes contendo xilitol ou mistura de xilitol e sorbitol durante duas semanas reduziu a proporção de *S. mutans* no biofilme e os níveis deste microrganismo na saliva quando comparados aos valores iniciais, enquanto o consumo de chicletes contendo apenas sorbitol aumentou estes valores (SÖDERLING et al., 1989). As diferenças entre os efeitos de chicletes contendo xilitol ou sorbitol foram estatisticamente significantes. Nestes trabalhos, nenhum dos chicletes avaliados teve efeito significativo nos níveis de LB no biofilme (LOESCHE et al., 1984) ou na saliva (SÖDERLING et al., 1989). Em pacientes usando aparelho ortodôntico fixo, o consumo durante um mês de chicletes contendo xilitol ou mistura de xilitol e sorbitol

seis vezes ao dia reduziu significativamente os níveis de SM no biofilme e na saliva (ISOTUPA et al., 1995). Neste trabalho, o uso de chicletes contendo apenas sorbitol não alterou os níveis iniciais de SM. Após um experimento de duas semanas com consumidores habituais de xilitol, o número de SM na saliva e a proporção destes microrganismos no biofilme diminuiu significativamente em relação aos valores iniciais no grupo que mascou chicletes contendo xilitol de três a cinco vezes por dia durante aproximadamente três minutos cada. A mesma tendência ($0,05 < p < 0,1$) foi observada para as duas variáveis no grupo que mascou chicletes com mistura de xilitol e sorbitol, enquanto nenhuma alteração estatisticamente significativa ocorreu no grupo que mascou chicletes placebo sem adoçante (SÖDERLING et al., 1997). Após dois anos consumindo até três chicletes adoçados com xilitol por dia, houve uma redução significativa nos níveis de *S. mutans* no biofilme de crianças finlandesas de 11 a 12 anos de idade em relação a crianças de um grupo controle que não consumiu chicletes (MÄKINEN et al., 1989). Não havia diferença entre os níveis iniciais de *S. mutans* no biofilme das crianças dos dois grupos. Após o experimento de dois anos, algumas crianças continuaram consumindo espontaneamente chicletes com xilitol durante os três anos subsequentes. Decorrido este tempo, a contagem de SM no biofilme de regiões interproximais foi significativamente menor nas crianças que consumiram habitualmente chicletes com xilitol do que em crianças que não consumiram chicletes (ISOKANGAS et al., 1991). Mäkinen et al. (2002) também verificaram uma redução na porcentagem de *S. mutans* no biofilme dental interproximal depois de 64 dias consumindo chicletes com xilitol cinco vezes ao dia.

Contudo, um experimento de três meses, no qual duas pastilhas foram chupadas quatro vezes ao dia, não demonstrou redução no número de SM ou de LB

no biofilme dental (BIRKHED et al., 1979). Havenaar et al. (1984) não observaram efeito da adição de xilitol à dieta de ratos na porcentagem de *S. mutans* do biofilme de fissuras ou interproximal. Nenhuma diferença significativa foi observada entre o número inicial de SM na saliva ($\geq 10^5$ UFC/ml) e no biofilme e após um período de 25 dias de uso de 12 chicletes adoçados com xilitol ou com mistura de xilitol e sorbitol por 17 voluntários (WENNERHOLM et al., 1994). Contudo, embora a diferença entre os grupos não tenha sido significativa, uma concentração aumentada de xilitol nos chicletes resultou em um menor número de SM e LB, tanto na saliva, quanto no biofilme.

Mäkinen et al. (1985) não obtiveram redução significativa de *S. mutans* no biofilme em relação aos valores iniciais após escovação dentária com dentifrício com xilitol por três meses, mas a redução dos níveis destes microrganismos na saliva após o uso de dentifrício com xilitol foi significativamente maior do que a que ocorreu quando foi usado dentifrício com sorbitol. Os dentifrícios não apresentaram efeito sobre os níveis salivares de LB.

Enquanto Birkhed et al. (1979) não observaram alteração entre as contagens de SM e LB no biofilme antes e após três meses de consumo de pastilhas contendo sorbitol, Mäkinen et al. (2002) verificaram um aumento na porcentagem de *S. mutans* no biofilme dental interproximal depois de 64 dias consumindo chicletes com sorbitol cinco vezes ao dia. Wennerholm et al. (1994) demonstraram que, quando foram consumidos chicletes adoçados com sorbitol por um período de 25 dias, houve um aumento estatisticamente significativo no nível inicial de SM na saliva. Também Söderling et al. (1989) encontraram um aumento no número de *S. mutans* na saliva e na proporção destes no biofilme após duas semanas de uso de chicletes com sorbitol. Uma mistura de sorbitol e manitol nos chicletes aumentou a quantidade

de *S. mutans* tanto no biofilme quanto na saliva em relação aos valores anteriores às quatro semanas experimentais (LOESCHE et al., 1984). Os últimos autores relacionaram este efeito mutans-estimulador às freqüentes exposições ao sorbitol entre as refeições, ou seja, em momentos sem disponibilidade de outros carboidratos, o que leva a indução das enzimas necessárias para metabolização do sorbitol pelos *S. mutans*. O efeito do sorbitol de aumentar o número de SM parece ser neutralizado quando xilitol é adicionado ao chiclete (WENNERHOLM et al., 1994). *In vitro*, pequenas quantidades de sorbitol podem inclusive estimular a ação inibidora do xilitol sobre o crescimento e o metabolismo bacteriano (ASSEV; RÖLLA, 1986). Quantidades maiores de sorbitol, em contrapartida, geralmente passam a ser substrato para *S. mutans* e dão suporte ao crescimento bacteriano (MÄKINEN et al., 1989). Contudo, as proporções ideais e mesmo o real significado clínico do sinergismo de uma mistura de xilitol e sorbitol ainda precisam ser melhor estabelecidos.

Exposição prolongada ao xilitol leva a emergência de populações de SM insensíveis ao mesmo (xilitol resistentes ou tolerantes = X^r). Todas as cepas de SM sensíveis ao xilitol que foram sucessivamente cultivadas *in vitro* em presença xilitol e de glicose evoluíram para populações X^r (GAUTHIER; VADEBONCOEUR; MAYRAND, 1984; TRAHAN; BOURGEAU; BRETON, 1996). O consumo de xilitol por longos períodos leva ao surgimento de uma população de SM X^r também em humanos (SATO; YAMAMOTO; KIZAKI, 2000; TRAHAN; MOUTON, 1987; TRAHAN et al., 1992; TRINDADE, 2005), ou seja, SM que conseguem fermentar glicose na presença de xilitol sem que seu crescimento seja inibido, o que não significa, contudo, que possam fermentar xilitol em produtos ácidos. O que ocorre não é uma adaptação da bactéria para crescer na presença de xilitol. São células mutantes

naturais, que são desprovidas ou apresentam falha no C_{fru} -PTS (SATO; YAMAMOTO; KIZAKI, 2000; TANZER et al., 2006; TRAHAN, 1995; TRAHAN; MOUTON, 1987) e não conseguem captar xilitol do meio. Como a toxicidade do xilitol para os SM é causada pelo acúmulo intracelular de xilitol-5-fosfato, o açúcar não representa um veneno para estas células (TRAHAN et al., 1985; TRAHAN; MOUTON, 1987). Estas cepas normalmente coexistem com cepas sensíveis ao xilitol (X^s) na cavidade bucal, mas estão em minoria em relação às últimas nos indivíduos para os quais o xilitol não faz parte da dieta. Por sua vez, consumo freqüente de xilitol cria um poderoso, provavelmente estressante, ambiente seletivo para SM naturalmente X^r (TRAHAN; MOUTON, 1987).

Tanzer et al. (2006) demonstraram que SM X^r apresentam menor capacidade de colonizar a superfície dental, mas ainda não está claro se isso se deve a uma alteração na sua habilidade de crescer no biofilme dental, a uma alteração na sua capacidade de adesão à superfície dental ou a ambos. De qualquer forma, sabe-se que o consumo prolongado de xilitol modifica a distribuição de SM entre o biofilme dental e a saliva (SATO; YAMAMOTO; KIZAKI, 2000), o que é compatível com a redução observada no número de SM no biofilme e na quantidade de biofilme usualmente apresentada por consumidores de xilitol. Este mecanismo serviria também para explicar porque crianças cujas mães usaram com freqüência xilitol são menos colonizadas (ISOKANGAS et al., 2000) e apresentam menores níveis salivares de SM até a idade de seis anos (SÖDERLING et al., 2001) do que crianças de grupos controle.

TANZER et al. (2006), quando testaram a cariogenicidade de *S. mutans* X^r em ratos alimentados com dieta rica em sacarose, consideraram que estas cepas são menos cariogênicas em virtude de apresentarem menor capacidade de colonizar a

superfície dental e ainda de contribuírem menos para a progressão da lesão cariosa em dentina do que cepas X^s . Características relacionadas à cariogenicidade de cepas de SM X^s e X^r avaliadas por (ASSEV; STIG; SCHEIE, 2002) não suportam esta inferência. Pelo contrário, em relação às cepas X^s , as cepas X^r produziram mais ácido láctico a partir de glicose e quantidades iguais de polissacarídeos (solúveis e insolúveis) a partir de sacarose, o que sugere que a menor capacidade de adesão das últimas não esteja relacionada com a formação de polissacarídeos.

Células X^r podem precisar da presença do agente seletivo xilitol por um longo período antes de se tornarem estabelecidas na boca de forma forte o suficiente para resistir à interrupção da exposição ao agente seletivo que as protege de serem eliminadas (TRAHAN; MOUTON, 1987). Contudo, uma vez selecionada pelo consumo habitual de xilitol e estabelecida na boca por um consumo prolongado, a população naturalmente mutante de SM X^r pode se manter por muitos anos após a interrupção da exposição ao agente seletivo (TRAHAN et al., 1992). Isto explica, pelo menos em parte, o efeito preventivo de cárie persistente observado anos (cerca de até cinco anos) após a interrupção do uso do xilitol (ALANEN; ISOKANGAS; GUTMANN, 2000; HUJOEL et al., 1999; ISOKANGAS et al., 1993, 2000).

Simultaneamente a estes efeitos bacterianos, efeitos salivares e bioquímicos podem também estar envolvidos em um possível desempenho anticariogênico do xilitol, sugerido pelos resultados de alguns estudos clínicos e com animais (MÄKINEN, 1985; MÄKINEN; SÖDERLING, 1984).

2.3.2 Efeitos bioquímicos

Resultados de estudos *in vivo*, *in situ* e principalmente *in vitro* têm demonstrado alguns efeitos dos polióis, em especial do xilitol, sobre parâmetros bioquímicos que podem influenciar a composição e a cariogenicidade do biofilme.

O xilitol e o sorbitol parecem apresentar habilidade semelhante de se ligarem ao cálcio em solução aquosa, formando complexos Ca^{2+} -poliol estáveis e podendo, com isso, aumentar a concentração deste íon no biofilme (MÄKINEN; SÖDERLING, 1984). A quantidade de cálcio e de fósforo inorgânico no biofilme formado *in vivo* não diferiu significativamente quando foram utilizados dentifrícios contendo sorbitol ou xilitol por quatro minutos, duas vezes ao dia, durante três meses em um estudo cruzado e duplo-cego (MÄKINEN et al., 1985). No estudo randomizado, cruzado e duplo-cego de Steinberg, Odusola e Mandel (1992), no qual 25 voluntários mascaram cinco chicletes ao dia, durante dez minutos, contendo sorbitol ou xilitol, em duas fases experimentais de seis semanas, o uso de qualquer um dos dois tipos de chicletes aumentou significativamente a quantidade de cálcio no biofilme em relação ao não uso de chicletes, sem diferença entre os dois polióis.

O estudo de Mäkinen et al. (1985) constatou uma interferência do xilitol sobre a presença de amônia no biofilme. A quantidade de amônia na fase extracelular do biofilme após o período de uso do dentifrício com xilitol foi significativamente maior do que os valores de amônia iniciais. O dentifrício adoçado com sorbitol não alterou a quantidade de amônia no biofilme. Estes achados foram relacionados a um aumento generalizado do metabolismo de nitrogênio no biofilme em presença de xilitol, o que pode levar a um aumento na formação total de amônia. Estudos prévios

demonstraram que o metabolismo de nitrogênio do biofilme dental e dos microrganismos bucais é acelerado quando seus carboidratos preferidos como fonte de energia são substituídos por xilitol em meio de cultura (KNUUTTILA; MÄKINEN, 1981; MÄKINEN; SCHEININ, 1982). A formação de amônia pode ser importante na determinação do pH mínimo do biofilme (MÄKINEN, 1985). Pode-se considerar que quanto mais amônia for formada no biofilme, menos ácido e, conseqüentemente, menos cariogênico este se torna.

O uso de três, seis ou dez chicletes por dia contendo xilitol durante três dias sem escovação dental alterou a composição bioquímica do biofilme de dez voluntários adultos jovens, diminuindo significativamente a atividade de enzimas *invertase-like* (enzimas que agem na quebra da sacarose e na formação de polissacarídeos) na fase extracelular solúvel em água do biofilme, em comparação ao uso de chicletes com sacarose ou ao não uso de chicletes (MOUTON; SCHEININ; MÄKINEN, 1975b, 1975c). Resultado semelhante sobre a atividade de enzimas *invertase-like* foi obtido quando o estudo foi repetido com 96 voluntários utilizando seis chicletes por dia (MOUTON; SCHEININ; MÄKINEN, 1975a). A atividade da enzima invertase na saliva parece ser afetada da mesma forma pelo xilitol e pelo sorbitol quando estes são usados em dentifrícios contendo 20% destes açúcares por um período de três meses (MÄKINEN et al., 1985).

Ainda no estudo de Mouton, Scheinin e Mäkinen (1975a), a quantidade de PEC solúveis em água foi significantemente menor no biofilme dos voluntários que mascaram chicletes adoçados com xilitol em relação aos que mascaram chicletes com sacarose, o que é facilmente compreensível, uma vez que a sacarose é substrato para a produção de PEC e o xilitol não. Mouton, Scheinin e Mäkinen (1975a) não verificaram diferença entre as quantidades de PEC solúveis presentes

no biofilme do grupo do xilitol e do grupo controle, sem chicletes. Também não houve diferença entre o grupo do xilitol e o da sacarose quando a quantidade de carboidrato foi expressa por miligrama de biofilme úmido e os autores relacionaram este último resultado a uma maior quantidade de biofilme formado em presença de sacarose. Em um estudo cruzado e duplo-cego, não houve diferença entre a quantidade de PEC solúveis em água presentes no biofilme acumulado por quatro dias sem escovação em voluntários quando estes usaram dez chicletes por dia adoçados com mistura de sorbitol e xilitol ou com apenas sorbitol entre as refeições, ou mesmo quando estes não consumiram chicletes (BIRKHED et al., 1983).

No estudo de Mäkinen et al. (1985) com dentifrícios contendo sorbitol ou xilitol, menores quantidades de polissacarídeos solúveis foram encontradas no biofilme formado *in vivo* após o uso dos dentifrícios experimentais ($p < 0,001$) em relação aos valores iniciais, sendo a maior redução obtida pelo dentifrício com xilitol, com diferença estatisticamente significativa em relação ao sorbitol. Resultados semelhantes foram obtidos para polissacarídeos insolúveis, porém apenas o dentifrício com xilitol provocou redução significativa na quantidade destes polissacarídeos. Não houve diferença significativa entre os efeitos do sorbitol e do xilitol sobre os polissacarídeos insolúveis. Já Söderling et al. (1989) não observaram alterações estatisticamente significantes no total de carboidratos do biofilme de 21 voluntários, antes e após duas semanas de consumo de dez chicletes por dia contendo xilitol, sorbitol ou uma mistura de xilitol e sorbitol após refeições e lanches. Também não houve diferença entre os tratamentos.

Os dois estudos *in vitro* melhor delineados a respeito da interferência dos polióis na produção de polissacarídeos a partir de culturas puras de *S. mutans* apresentaram resultados contraditórios.

Imai et al. (1984) examinaram o efeito de alguns açúcares substitutos da sacarose na síntese de glucanos insolúveis por *S. mutans in vitro*. As análises quantitativas da síntese dos glucanos insolúveis foram realizadas pelo sistema de cultura de células (*S. mutans* eram inoculados e cultivados em meio contendo 5mM do açúcar substituto teste e/ou 5mM de sacarose, por 24 horas a 37°C) ou pelo sistema livre de células (incubação de uma mistura reativa contendo entre outras coisas 5mM do açúcar substituto teste e/ou 5mM de sacarose, mais a enzima glicosiltransferase extracelular isolada a partir de uma cepa de *S. mutans*, por 16 horas a 37°C). Após o cultivo e a incubação, os glucanos sintetizados na mistura foram fracionados em glucanos insolúveis e glucanos solúveis. Nem xilitol nem sorbitol diminuíram a síntese de glucanos insolúveis por *S. mutans* a partir da sacarose.

Contudo, Söderling et al. (1987) compararam o efeito do sorbitol e do xilitol na solubilidade dos polissacarídeos produzidos por *S. mutans* a partir de sacarose e encontraram resultados diferentes. Polissacarídeos solúveis e insolúveis foram extraídos das culturas dos microrganismos em meios contendo 3% de sacarose e 6% de xilitol ou sorbitol, quando estas atingiram turvação pré-estabelecida, e foram dosados. Os dois polióis aumentaram a produção de polissacarídeos solúveis em relação ao controle só com sacarose: controle < xilitol < sorbitol. A presença de sorbitol aumentou, também, a quantidade de polissacarídeos insolúveis, ao passo que o xilitol diminuiu a quantidade destes em relação ao controle. A quantidade mais alta de polissacarídeos totais foi produzida na presença de sorbitol: sorbitol > xilitol ≈ controle.

É interessante notar que no estudo de Söderling et al. (1987) os polióis foram acrescidos em concentração que correspondia ao dobro da concentração de

sacarose presente no meio, enquanto no estudo de Imai et al. (1984) os polióis foram acrescentados na mesma concentração da sacarose. Assim, é possível que no estudo de Imai et al. a alta proporção sacarose / poliól tenha restringido um possível efeito inibitório do xilitol sobre o metabolismo das células de *S. mutans* e, conseqüentemente, sobre a síntese de proteínas como as glicosiltransferases (*GTFs*) relacionadas à produção de polissacarídeos.

Wunder e Bowen (1999) avaliaram o efeito inibitório de várias substâncias nas *GTF*, que são enzimas produzidas pelos *S. mutans* responsáveis pela síntese de PEC do tipo glucano a partir da sacarose, através da quantificação de glucanos formados em solução (após a imersão em meio tamponado contendo a enzima isolada) ou em película artificialmente formada (enzima aderida na superfície de grânulos de hidroxiapatita cobertos por saliva humana). Nem o xilitol nem o sorbitol em concentração até 200mM foram efetivos inibidores de nenhuma das três enzimas *GTFs* [*GTF B*, que sintetiza glucanos insolúveis (mutanos); *GTF D* que sintetiza glucanos solúveis e *GTF C* que sintetiza tanto glucanos insolúveis quanto solúveis (dextranos)] tanto quando a avaliação foi realizada em solução, quanto quando em película.

Ao examinarem a produção de enzimas *GTFs* por *S. mutans* em meio contendo diferentes fontes de carbono na concentração de 1%, Janda e Kuramitsu (1978) observaram que células que cresceram em presença de sorbitol exibiram aproximadamente a metade da atividade de *GTFs* extracelulares apresentada pelas células que cresceram em presença de glicose. Contudo, a proporção da atividade correspondente às *GTFs* capazes de sintetizar glucanos insolúveis foi similar para as diferentes fontes de carbono. Assim, a utilização do sorbitol, fonte de carbono menos

eficiente, pelas células de *S. mutans* não afetou a atividade de suas enzimas *GTFs* extracelulares responsáveis pela síntese de PEC insolúveis.

Uma vez que a expressão de enzimas *GTFs* e frutossiltransferase (*FTF*, que sintetiza PEC do tipo frutano) por *S. mutans* pode ser afetada por carboidratos, Shemesh et al. (2006) investigaram o efeito do sorbitol (10g/L) e do xilitol (10g/L) neste fenômeno em cultura de células bacterianas (meio de cultura sem sacarose) usando RT-PCR (*real-time polymerase chain reaction* / reação de polimerase em cadeia em tempo real) quantitativa. Os autores concluíram que, embora o sorbitol não seja substrato para a produção de glucanos ou frutanos por *S. mutans*, ele pode afetar indiretamente a formação de lesões de cárie, promovendo a formação de biofilme por aumentar a síntese de enzimas *GTFs* e *FTF*, ambas envolvidas na formação do biofilme e acúmulo bacteriano na presença de sacarose. Por sua vez, a maior influência do xilitol foi induzir consideravelmente a síntese de *GTF D*, enzima responsável pela síntese de glucanos solúveis, menos importantes na formação de biofilme e agregação bacteriana. Contudo, os próprios autores consideraram que a expressão dos genes relacionados a essas enzimas depende de uma série de fatores como a cepa de bactéria, a fase de crescimento, o meio de cultura e a quantidade de carboidratos, de maneira que o exato mecanismo envolvido neste processo ainda não está claro.

Quando adicionado ao meio de cultura na concentração de 4%, o xilitol funcionou como fator de estresse, forte inibidor do metabolismo de *S. mutans* sensíveis ao xilitol, perturbando a síntese protéica, reduzindo a expressão de algumas proteínas em até 50% (como HSP-60 e HSP-70 que são proteínas necessárias para funções celulares básicas, indispensáveis, e para a adaptação bacteriana ao ambiente) e simultaneamente aumentando em cerca de 50% a

expressão de outras proteínas. Não foi observado efeito parecido induzido por outros polióis como o sorbitol. Os autores consideraram que essa perturbação na síntese protéica pode contribuir para a relatada redução do número de SM em pessoas que consomem xilitol, por prejudicar a capacidade de sobrevivência na presença do pentitol de cepas sensíveis ao mesmo (HRIMECH et al., 2000).

O xilitol não demonstrou efeito inibitório sobre as enzimas *GTFs* já produzidas (WUNDER; BOWEN, 1999), mas comportou-se como forte inibidor do metabolismo de *S. mutans*, perturbando a síntese protéica (HRIMECH et al., 2000). Foi demonstrado que um adequado crescimento das células bacterianas é necessário para a produção de enzimas *GTFs* extracelulares, que fazem parte dos produtos constitutivos da célula de *S. mutans* (JANDA; KURAMITSU, 1978). Assim, os resultados dos estudos de Imai et al. (1984), Söderling et al. (1987) e Shemesh et al. (2006) permitem imaginar que, se o xilitol tiver efeito inibitório na síntese de PEC insolúveis por *S. mutans* a partir da sacarose, este pode estar relacionado a uma inibição no metabolismo geral destas bactérias e, conseqüentemente, a uma perturbação na síntese de proteínas envolvidas na produção de polissacarídeos, como as *GTFs*. Entretanto, este é um assunto complexo, sobre o qual resultados contraditórios ainda são encontrados, e que necessita de maiores esclarecimentos.

Faz-se necessário ressaltar, ainda, que os estudos *in vitro* citados anteriormente trabalharam na sua maioria com altas concentrações de sorbitol e xilitol, em culturas puras de microrganismos, de maneira que ainda não se sabe qual a real importância dos efeitos bioquímicos relatados para um biofilme dental humano *in vivo*.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo foi determinar o efeito de altas concentrações de xilitol administrado na forma de pastilhas na composição microbiana e bioquímica do biofilme dental e nos processos de desmineralização e remineralização do esmalte, comparado a um controle com pastilhas contendo sorbitol.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Seleção dos voluntários

Foram selecionados onze voluntários adultos jovens (21 a 33 anos de idade), alunos dos cursos de Pós-Graduação e de Graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FO-USP). Os critérios para inclusão dos voluntários consistiram em condições de saúde bucal e sistêmica favoráveis e disponibilidade dos mesmos para comparecerem ao local da pesquisa e cumprirem as determinações requeridas pelo protocolo experimental. Era também necessário que os voluntários apresentassem níveis detectáveis de estreptococos do grupo mutans (SM) na saliva. O teste da espátula (KÖHLER; BRATTHALL, 1979) foi utilizado para a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) de SM por mililitro de saliva estimulada. Quatro dos onze voluntários possuíam, inicialmente, níveis salivares de SM acima de 10^5 UFC/ml e os demais apresentavam entre 10^3 e 10^5 UFC de SM por mililitro de saliva. Foram adotados, também, os seguintes critérios de exclusão: os voluntários não podiam apresentar lesão de cárie ativa, periodontite ou aparato ortodôntico, nem possuir histórico de doença cardiovascular ou outra doença grave. Além disso, não podiam ser fumantes ou ter feito uso de antibiótico sistêmico ou tópico no mês anterior, nem de droga ou medicamento que afetasse o fluxo salivar, assim como de enxaguatório bucal antibacteriano nos últimos três meses.

4.2 Considerações éticas

O estudo foi conduzido de acordo com as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo seres humanos do Conselho Nacional de Saúde (Resolução nº. 196, de 10 de outubro de 1996) e após ter sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FO-USP (Protocolo 244/04 – ANEXO A). Todos os voluntários receberam um “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido”, explicando os procedimentos, objetivos, riscos e benefícios aos quais estariam expostos (APÊNDICE A) e só foram incluídos no estudo após concordarem e assinarem o mesmo. Os pesquisadores envolvidos se comprometeram a informá-los sobre suas dúvidas a qualquer momento, ainda que isto pudesse afetar a sua vontade em continuar participando como voluntário.

4.3 Delineamento experimental

O presente estudo foi realizado *in situ*, utilizando-se um modelo intrabucal de longa duração, do tipo cruzado e duplo-cego. Os onze voluntários utilizaram em duas fases experimentais de 14 dias dispositivos palatinos contendo seis blocos de esmalte humano, sendo três blocos de esmalte hígido para avaliação da desmineralização e mais três blocos de esmalte previamente desmineralizado *in vitro* para avaliação da remineralização. Sobre os blocos de esmalte hígido, foi gotejada solução de sacarose a 20%, oito vezes ao dia, para indução de desafio

cariogênico (CURY; REBELLO; DEL BEL CURY, 1997). Os blocos previamente desmineralizados não foram expostos à sacarose. Os voluntários foram aleatoriamente alocados por sorteio simples em um dos grupos (teste ou controle) e, após o cumprimento da primeira fase, os grupos foram invertidos. Na fase em que estiveram participando do grupo teste, os voluntários chuparam minipastilhas contendo 88,30% de xilitol (0,1766g de xilitol) e 0,60% de aspartame (Smint[®], Chupa Chups S.A., Barcelona, Espanha) cinco minutos após cada gotejamento de sacarose sobre os blocos hígidos do aparelho. No grupo controle, cinco minutos após cada gotejamento de sacarose, os voluntários chuparam minipastilhas contendo 84,50% de sorbitol (0,169g de sorbitol) e 0,50% de aspartame. Estas pastilhas eram visualmente idênticas às do grupo teste, foram produzidas pela mesma empresa (Smint[®], Chupa Chups S.A., Barcelona, Espanha) e demonstraram a mesma capacidade de estimular o fluxo salivar em teste realizado com os voluntários, em dias alternados, no mesmo horário ($p = 0,0973$, teste t -pareado, APÊNDICE B). Além dos adoçantes, a composição das pastilhas incluía aromatizantes (10,0 a 14,9%) e óleo vegetal hidrogenado (0,1 a 1,1%). A utilização das pastilhas teste ou controle oito vezes ao dia iniciou-se uma semana antes da respectiva fase experimental, quando ainda nenhum dispositivo palatino estava presente na boca.

Durante todo o período experimental e na semana que precedeu cada uma de suas fases, os voluntários escovaram seus dentes naturais normalmente, fazendo uso de dentifrício sem flúor (Quinta Essência Cosméticos e Medicamentos, Porto Alegre, Brasil), que lhes foi fornecido gratuitamente. O mesmo dentifrício foi usado para escovar o dispositivo palatino, com exceção das janelas onde se encontravam os blocos de esmalte (AIRES et al., 2006; CURY et al., 2000).

Um intervalo de uma semana foi mantido entre as fases experimentais, sem consumo de pastilhas, sem utilização de dispositivo palatino e sem restrições quanto ao uso de dentífrico fluoretado (*wash-out*).

Ao final de cada fase experimental, o biofilme dental formado sobre os blocos de esmalte foi coletado, dez horas após o último gotejamento de sacarose, e os fragmentos de esmalte foram removidos do dispositivo para análise. Um novo dispositivo acrílico palatino foi construído para cada voluntário em cada fase (PECHARKI et al., 2005).

As variáveis de resposta foram medidas através de análises bioquímica e microbiológica do biofilme formado e de análise de dureza de superfície dos blocos de esmalte.

4.4 Fase preparatória / laboratorial I

4.4.1 Obtenção dos dentes

Foram utilizados na pesquisa 132 blocos de esmalte obtidos de terceiros molares humanos não-irrompidos, evitando assim a variação na maturidade pós-eruptiva (CURY; REBELLO; DEL BEL CURY, 1997). Os dentes foram coletados em clínicas e cursos de especialização, seguindo os critérios de informação e consentimento do paciente exigidos pelos preceitos éticos (APÊNDICE C). Passaram por profilaxia com pedra pomes e água destilada, foram esterilizados por

radiação gama (25K Gy) no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) e permaneceram armazenados em ambiente úmido e refrigerado (potes individuais contendo gaze umedecida em solução de timol a 0,1%, em geladeira). Dentes que apresentaram ao exame visual com auxílio de lupa fraturas, trincas ou hipoplasias foram excluídos.

4.4.2 Obtenção dos blocos de esmalte

Os terceiros molares foram fixados com cera pegajosa em uma base acrílica circular para permitir o posicionamento na cortadeira de precisão (Labcut 1010, Extec Co., Enfield, EUA). As porções radiculares, quando existiam, foram seccionadas no sentido mesio-distal, posicionando-se um disco de corte diamantado dupla-face ligeiramente acima do limite cervical. Um segundo corte foi realizado, paralelo ao primeiro, movendo-se o disco 3mm em direção à face oclusal. Desta forma, obteve-se uma fatia de dente da porção coronária numa secção transversal de 3mm. Devido às irregularidades e angulações do esmalte superficial, as áreas planas e sem sulco foram demarcadas com lápis grafite nº. 5 para facilitar a análise de como poderiam ser feitos os cortes de modo a obter o maior número de fragmentos de esmalte por dente. As fatias da porção coronária foram reposicionadas, então, com a dentina voltada para a base acrílica, e novos cortes foram realizados nos sentidos mesio-distal e vestibulo-lingual para a obtenção dos blocos de esmalte nas dimensões desejadas (3 x 3 x 2mm). Os cortes foram feitos

sempre visando a obtenção de uma face paralela à porção externa mais plana, sob refrigeração com água destilada.

4.4.3 Lixamento e polimento dos blocos

Os blocos de esmalte foram lixados e polidos em uma politriz digital (BUEHLER, Lake Bluff, EUA) com sistema de polimento múltiplo capaz de realizar o polimento simultâneo de seis corpos-de-prova e de manter o paralelismo entre a superfície do esmalte e as lixas, em velocidade baixa (10rpm) e sob força de 5 libras. O objetivo foi planificar e polir a superfície a ser lida no microdurômetro. Foi utilizada uma seqüência de lixas d'água (Norton Abrasivos do Brasil, Guarulhos, Brasil) com granulação decrescente (320 por três segundos, 600 por cinco segundos, 1200 por um minuto e 2000 por dois minutos). A cada mudança de granulação de lixa, os blocos dentais foram imersos em solução detergente (Ultramet[®] Sonic Cleaner, BUEHLER) diluída na proporção de 20:1 em água destilada deionizada e mantidos em aparelho de ultra-som por dois minutos para remoção dos resíduos da lixa anterior. O polimento foi finalizado com disco de feltro auto-adesivo e pasta diamantada granulação 1 μ m (BUEHLER), por dois minutos. Em seguida, os blocos dentais permaneceram por mais dois minutos em solução detergente em aparelho de ultra-som. Ao final do polimento, as amostras foram avaliadas em microscópio óptico para verificar a lisura superficial e os blocos foram conservados sob refrigeração em ambiente úmido. Foram preparados blocos adicionais para que pudessem ser selecionados os melhores através da análise de dureza de superfície.

4.4.4 Seleção dos blocos pela análise de dureza

A determinação da dureza de superfície neste momento teve por objetivo selecionar os blocos para o estudo. Para esta análise, foi usado um penetrador Knoop com carga estática de 50g e tempo de 15 segundos em microdurômetro (aparelho Shimadzu Micro Hardness Tests HMV-2, Shimadzu, Kyoto, Japão). No centro de cada bloco foram feitas cinco indentações no esmalte, separadas entre si por uma distância de 100 μ m (CURY et al., 2000), e a média destes valores foi calculada. Blocos de esmalte com dureza de superfície entre 300 e 363 unidades Knoop Hardness Number (KHN) foram selecionados para o estudo (blocos com dureza 10% maior ou menor do que a média geral foram descartados para a obtenção de uma amostra mais homogênea). Além disso, os blocos foram posteriormente distribuídos nos dispositivos de tal modo que a média de dureza de superfície inicial dos mesmos fosse numericamente semelhante para todos os voluntários em cada cruzamento.

Os valores de dureza obtidos foram também usados para cálculo da porcentagem de variação (perda ou ganho) na dureza de superfície após o experimento.

4.4.5 Formação das lesões artificiais de cárie *in vitro*

De acordo com Moreno e Zahradnik (1974), um tampão ácido 50% saturado em relação ao esmalte induziria uma desmineralização subsuperficial típica, sem erosão. No presente estudo, a solução desmineralizadora foi preparada acrescentando-se reagentes contendo íons cálcio, fósforo e flúor nas concentrações previamente dosadas de uma solução de tampão acetato 0,05M, pH 5,0, 50% saturada em relação ao dente humano (CENCI; CURY, informação pessoal¹). Assim, os blocos de esmalte selecionados tiveram todas as superfícies protegidas por um verniz ácido-resistente (esmalte cosmético), exceto a superfície polida, e foram imersos individualmente em 18ml de solução contendo Ca 1,28mM ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ P.A., PANREAC QUÍMICA S. A., Barcelona, Espanha), P_i 0,86mM ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, REAGEN Quimibrás Indústrias Químicas S. A., Rio de Janeiro, Brasil), F 0,43 μM (NaF, padrão de flúor 100 ppm, Thermo Orion, Beverly, EUA) e ácido acético 0,05M (Ácido acético glacial, MERCK, Rio de Janeiro, Brasil), pH 5,0 (CENCI; CURY, informação pessoal¹), a 37°C por 16 horas. Decorrido este tempo, os blocos foram removidos da solução e abundantemente enxaguados em água destilada e deionizada.

¹ Metodologia de formação de lesões artificiais de cárie *in vitro* desenvolvida por Cenci e Cury, Doutorado em Odontologia, Área de concentração em Cariologia, FOP-UNICAMP, 2004-2007, Piracicaba (dados não publicados).

4.4.6 Análise de dureza de superfície após desmineralização *in vitro*

Os blocos de esmalte submetidos à desmineralização *in vitro* tiveram a dureza de superfície novamente determinada. Foram feitas cinco indentações no esmalte, separadas entre si por uma distância de 100µm, com carga estática de 50g por 15 segundos, 100µm à direita das indentações iniciais (CURY et al., 2005). A média destes valores de dureza foi usada para o cálculo da porcentagem de recuperação (ganho) de dureza de superfície antes e após o experimento para os blocos que iniciaram a fase clínica desmineralizados.

Foram selecionados para este estudo 66 blocos com dureza média após a desmineralização de $25,6 \pm 13,1$ KHN.

4.4.7 Preparo dos dispositivos palatinos

Após moldagem da arcada superior e obtenção de modelos de gesso, foram confeccionados dispositivos palatinos removíveis em resina acrílica autopolimerizável para cada voluntário, previamente a cada fase experimental. Nos lados direito e esquerdo de cada dispositivo foram preparadas duas canaletas (10 x 4 x 3mm) para adaptação dos blocos de esmalte, deixando 1mm de espaço livre sobre eles de modo a promover o acúmulo de biofilme. Três blocos de esmalte ocuparam cada uma destas canaletas, blocos hígidos em um dos lados e desmineralizados no outro. O lado que recebeu os blocos hígidos ou desmineralizados foi aleatorizado

para cada voluntário. Os blocos de esmalte foram presos ao dispositivo com cera utilidade e sobre eles foi fixada uma tela plástica para proteger o biofilme formado de algum distúrbio mecânico. Para permitir a identificação dos blocos sobre os quais a sacarose deveria ser gotejada, a tela plástica foi fixada com resina acrílica vermelha sobre os blocos hígidos. Sobre os blocos desmineralizados, utilizou-se resina incolor (CURY et al., 2001a; PECHARKI et al., 2005). Os dispositivos, depois de prontos e ajustados à boca dos voluntários e antes do início das fases experimentais, foram esterilizados por radiação gama (25K Gy).

4.5 Fase clínica

Onze voluntários foram aleatoriamente distribuídos nos grupos e receberam instruções para usar os dispositivos palatinos contendo os blocos de esmalte dia e noite durante as fases experimentais de 14 dias (PAES LEME et al., 2004), removendo-os apenas durante as refeições e quando consumissem outros alimentos ou líquidos. Nos momentos em que estiveram fora da boca, os dispositivos foram conservados em ambiente úmido (caixa plástica com gaze umedecida em água) com o objetivo de manter as bactérias do biofilme viáveis. Nenhuma recomendação em relação à dieta foi passada aos voluntários, uma vez que, por se tratar de um estudo cruzado, cada um deles participou de cada um dos grupos.

Os voluntários foram instruídos a, oito vezes ao dia (8:00, 9:30, 11:00, 14:00, 15:30, 17:00, 19:00, 21:00 horas), remover os dispositivos da boca e gotejar três gotas de solução de sacarose a 20% sobre os blocos de esmalte hígidos, nas duas

fases do experimento. O excesso de solução era removido com gaze ou algodão para evitar que escorresse sobre os blocos desmineralizados. Cinco minutos após o gotejamento de sacarose, o dispositivo era recolocado na boca e, em seguida, o voluntário chupava uma pastilha contendo xilitol ou sorbitol, de acordo com o grupo experimental. O voluntário iniciou o consumo de oito pastilhas por dia (tanto de pastilhas contendo xilitol como de pastilhas placebo) uma semana antes da fase clínica propriamente dita.

Dentifrício sem flúor foi usado pelos voluntários para escovação de seus dentes naturais e do dispositivo, exceto os blocos de esmalte, três vezes por dia. O mesmo dentifrício começou a ser utilizado uma semana antes de cada fase do experimento (AIRES et al., 2006; CURY et al., 2000). Também foi recomendado aos voluntários a não utilização de qualquer outro produto fluoretado ou alimento rico em flúor durante o período do estudo. Todos os voluntários residiam em cidade com água de abastecimento fluoretada. Por se tratarem de estudantes de Graduação e Pós-Graduação em Odontologia, os mesmos eram pessoas conscientes em relação à necessidade do devido cuidado na utilização do dispositivo e que apresentavam bons hábitos de higiene dental.

Após cada período experimental, dez horas depois da última exposição aos tratamentos, com os voluntários em jejum e antes de escovarem seus dentes, os dispositivos intrabucais foram retirados da boca e lavados com água destilada deionizada, a tela de proteção foi removida e todo o biofilme formado sobre os blocos foi coletado e dividido para as análises bioquímica e microbiológica. Os blocos de esmalte foram então removidos do dispositivo, escovados com escova de dente extra-macia e dentifrício sem flúor com baixa abrasividade, enxaguados em

água destilada deionizada e preparados para análise de dureza (PECHARKI et al., 2005; RIBEIRO et al., 2005).

4.6 Fase laboratorial II

4.6.1 Análise microbiológica do biofilme

Parte do biofilme formado sobre os blocos foi coletada para análise microbiológica através da fricção de hastes de microbrush (Microbrush® International, Grafton, EUA) cortadas, previamente pesadas e esterilizadas, na superfície do esmalte. O biofilme restante foi usado para análise bioquímica.

O conjunto hastes de microbrush mais biofilme foi pesado em frasco de centrífuga de 1,5ml estéril para determinação do peso do biofilme coletado (aproximadamente 1,85mg) e transferido imediatamente para 3,8ml de meio de transporte gelatinoso VMGA III (*prereduced anaerobically sterilized* - PRAS) (MÖLLER, 1966). Após a manutenção em estufa a 37°C por 30 minutos para liquefazer a gelatina do meio, o biofilme dental foi disperso no próprio frasco de transporte contendo pérolas de vidro através de agitação em agitador de tubos sob velocidade máxima por 30 segundos. Em seguida, esse biofilme foi diluído em série na ordem de 10^{-1} a 10^{-6} em água peptonada e inoculado em meios de cultura em placas de Petri. Alíquotas das diluições 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} foram semeadas na superfície de Ágar Brucella (Difco, Kansas City, EUA) acrescido de sangue

desfibrinado de carneiro (50ml/L), hemina (Inlab, São Paulo, Brasil) (5mg/ml) e menadione (Inlab) (10 mg/ml) para a determinação do total dos microrganismos viáveis (TM). Alíquotas das diluições 10^{-3} e 10^{-4} foram semeadas em meio Ágar Mitis Salivarius (Difco) para determinação do número total de estreptococos (S). Alíquotas do biofilme sem diluição e nas diluições 10^{-1} e 10^{-2} foram semeadas em meio Ágar Mitis Salivarius acrescido de bacitracina (GOLD; JORDAN; VAN HOUTE, 1973) para determinação da população de estreptococos do grupo mutans (SM). Alíquotas de 100 μ l de cada diluição foram semeadas na superfície de agar e espalhadas com o auxílio de uma alça de Drigalski. Para a verificação da presença de lactobacilos (LB), alíquotas (100 μ l) sem diluição e na diluição 10^{-2} foram inoculadas em profundidade (*pour plate*) em meio Ágar Rogosa SL (Difco). As placas de Ágar Brucella foram incubadas em câmara de anaerobiose (PLAS by LABS, LANSING, MICH., USA) a 37°C por sete dias. As placas de Ágar Mitis Salivarius e Mitis Salivarius Bacitracina foram incubadas em 10% de CO₂ (estufa de CO₂ Shel Lab, mod. 2123, Oregon, EUA), a 37°C, por 48 horas. As placas contendo Ágar Rogosa foram incubadas em 10% de CO₂, a 37°C, por 72 horas.

Após a incubação, foi realizada a contagem das colônias características em cada placa, observadas com auxílio de microscópio estereoscópico com aumento de dez vezes, na diluição que apresentou entre 30 e 300 colônias por placa.

Todos os procedimentos foram realizados em duplicata e a média das contagens foi calculada. Os resultados foram expressos em UFC de SM e LB / mg de biofilme úmido e em proporção de estreptococos (% S / TM), de estreptococos do grupo mutans (% SM / TM) e de lactobacilos (% LB / TM) em relação ao total de microrganismos viáveis. Para SM, foi calculada também a proporção em relação ao

total de estreptococos (% SM / S) (CCAHUANA-VÁSQUEZ et al., 2007; PECHARKI et al., 2005; RIBEIRO et al., 2005).

4.6.2 Análise bioquímica do biofilme

Após a coleta para a análise microbiológica, todo o biofilme remanescente sobre os blocos de esmalte foi coletado para a análise bioquímica com uma espátula plástica para resina composta previamente esterilizada e dispensado em tubo de centrifuga de 1,5ml esterilizado. O tubo foi pesado antes e após a colocação do biofilme e pela diferença foi possível calcular o peso do biofilme úmido. Este material foi, então, desidratado a vácuo em dessecador com P_2O_5 por 24 horas e pesado novamente para determinação do peso do biofilme seco.

Para extração do biofilme, foram acrescentados 100µl de HCl 0,5M titulado a cada miligrama de biofilme seco. Após um período de três horas de constante agitação (mesa agitadora velocidade 100rpm à temperatura ambiente), foram adicionados ao tubo 100µl de TISAB II, contendo 20g de NaOH por litro, pH 5,0, por miligrama de biofilme. As amostras foram agitadas, centrifugadas por três minutos (14.000 rpm) e o sobrenadante (SOB1) foi separado para as dosagens de flúor (F), cálcio (Ca) e fósforo inorgânico (P_i). A concentração de F foi determinada utilizando-se potenciômetro EA-940 (Expandable íon Analyser, ORION, Beverly, EUA) com eletrodo específico para flúor ORION 96-09. A concentração de Ca foi medida por espectrofotometria de absorção atômica (SpectrAA 50, Varian Inc., Palo Alto, EUA) (CURY et al., 2000; CURY; REBELLO; DEL BEL CURY, 1997; PECHARKI et al.,

2005; RIBEIRO et al., 2005). Um método colorimétrico com determinação da absorbância em espectrofotômetro (DU 800 Spectrophotometer, Beckman Coulter, Inc., Fullerton, EUA) a 660nm foi empregado para a avaliação de P_i (FISKE; SUBBAROW, 1925).

Ao precipitado (PPT1) foram acrescentados 200µl de NaOH 1M titulado por miligrama de biofilme seco. As amostras foram homogeneizadas por um minuto em agitador de tubos, mantidas sob agitação por três horas à temperatura ambiente e centrifugadas por três minutos (14.000 rpm). Ao sobrenadante (SOB2a), foram adicionados três vezes o volume de etanol gelado e a amostra foi mantida em geladeira por uma noite para precipitação dos polissacarídeos. Depois de nova centrifugação por três minutos (14.000 rpm), o sobrenadante (SOB2b) foi descartado e os tubos eppendorfs foram mantidos abertos para evaporação total do etanol. O precipitado (PPT2b) foi ressuspendido em NaOH 1M titulado (200µl de NaOH por miligrama de biofilme seco). A concentração de polissacarídeos extracelulares insolúveis (carboidratos álcali-solúveis) foi determinada na suspensão através de um método colorimétrico de dosagem de carboidratos totais (DUBOIS et al., 1956). A intensidade de cor foi determinada por absorbância em espectrofotômetro (DU 800 Spectrophotometer, Beckman Coulter, Inc., Fullerton, EUA) a 490nm (CCAHUANA-VÁSQUEZ et al., 2007).

Ao precipitado (PPT2a) foram acrescentados 200µl de NaOH 1M titulado por miligrama de biofilme seco. As amostras foram mantidas em aquecimento (100°C) por 15 minutos em aparelho DryBlock MA 4004 (MARCONI EQUIPAMENTOS PARA LABORATÓRIO LTDA, Piracicaba, Brasil) e centrifugadas por três minutos (14.000 rpm) (AIRES et al., 2007). Ao sobrenadante (SOB3), foram adicionados três vezes o volume de etanol gelado e a amostra foi mantida em geladeira por uma noite. Depois

de nova centrifugação por três minutos (14.000 rpm), o sobrenadante (SOB4) foi descartado e os tubos eppendorfs foram mantidos abertos para evaporação total do etanol. O precipitado (PPT4) foi ressuspenso em NaOH 1M titulado (200µl de NaOH por miligrama de biofilme seco). A concentração de polissacarídeos intracelulares foi determinada na suspensão através do mesmo método empregado para dosagem de polissacarídeos extracelulares insolúveis (CCAHUANA-VÁSQUEZ et al., 2007; DUBOIS et al., 1956).

4.6.3 Análise de dureza de superfície após fase clínica

Ao final de cada fase experimental, dois dos três blocos de esmalte inicialmente hígidos e dois dos três blocos desmineralizados *in vitro* (os que estavam nas posições mais posteriores no dispositivo) de cada voluntário foram novamente submetidos à análise de dureza de superfície utilizando um penetrador Knoop com carga de 50g por 15 segundos, em um microdurômetro (Shimadzu Micro Hardness Tests HMV-2). Uma nova fileira de cinco indentações adjacentes, com espaçamento de 100µm entre elas, foi realizada do lado esquerdo (a 100µm) das indentações iniciais e foi calculada a média dos cinco valores (CURY et al., 2000, 2005). Para os blocos que iniciaram a fase clínica hígidos, foi calculada a porcentagem de perda de dureza de superfície [% PDS = $100(DS_{\text{inicial}} - DS_{\text{após fase clínica}}) / DS_{\text{inicial}}$] (TENUTA et al., 2003). Para os blocos que iniciaram a fase clínica desmineralizados, foi calculada a porcentagem de recuperação (ganho) de dureza de superfície [% GDS =

$100(DS_{\text{após fase clínica}} - DS_{\text{após desmineralização in vitro}}) / (DS_{\text{inicial}} - DS_{\text{após desmineralização in vitro}})]$
(CURY et al., 2005).

4.7 Análise estatística

Para o tratamento estatístico dos dados foi adotado um modelo de Análise de Variância (ANOVA) para estudos do tipo cruzado (*cross-over*), usando o *software* SAS (Statistical Analysis System) 9.1.3 *for Windows*. Com base nesse modelo, foi verificado o efeito de seqüência, período e tratamento para cada um dos parâmetros avaliados. O efeito de seqüência avalia se os resultados obtidos durante o segundo tratamento são afetados pelo que aconteceu no primeiro tratamento. O efeito de período informa se há alguma diferença entre os dois períodos do estudo. O efeito de tratamento compara os dois tratamentos em questão: xilitol e sorbitol em pastilhas.

A característica especial da análise estatística de um experimento cruzado é o cuidado que se deve ter na análise da presença ou não do efeito de seqüência ou efeito *carry-over*. Quando não é identificado efeito de seqüência, prossegue-se a análise verificando-se a presença ou não dos efeitos de período e tratamento. Nos casos em que há efeito de seqüência, a análise do efeito de tratamento é baseada apenas nas observações obtidas no primeiro período experimental.

Devido à alta variabilidade dos dados, optou-se por utilizar uma transformação logarítmica nos mesmos. Após o ajuste do modelo foi realizada uma análise de resíduos para avaliar as suposições do modelo adotado.

O nível de significância foi fixado em 10% ($\alpha = 0,10$) para avaliação do efeito de seqüência (GRIZZLE, 1965). Para o restante da análise estatística foi adotado um nível de significância de 5%, ou seja, foram considerados como estatisticamente significantes os resultados que apresentaram *p*-valor inferior a 5% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

Cada um dos 11 voluntários participantes do estudo recebeu cada um dos tratamentos (pastilhas com xilitol e com sorbitol) em dois períodos. Como os voluntários foram alocados aleatoriamente às seqüências xilitol-sorbitol (XS) ou sorbitol-xilitol (SR), o planejamento utilizado no estudo pode ser descrito como cruzado com dois períodos e dois tratamentos (*cross-over 2 x 2*). Visando determinar se houve efeito residual do uso de pastilhas com os poliálcoois (xilitol e sorbitol) e, posteriormente, se estes açúcares tiveram efeito sobre cada um dos parâmetros avaliados, os dados *log*-transformados foram submetidos a um modelo de Análise de Variância (ANOVA) para estudos cruzados. O voluntário foi considerado como unidade experimental, assim, *n* foi igual a 11. Porém, a quantidade de biofilme acumulado durante o período experimental por alguns voluntários foi insuficiente para algumas análises bioquímicas e, nestes casos, *n* foi menor que 11.

5.1 Análise dos efeitos de seqüência (*carry-over*) e de período

Para o parâmetro % PDS, as duas seqüências e os dois períodos não diferiram de maneira estatisticamente significativa ($p= 0,652$ e $p= 0,930$; respectivamente. Tabela 5.1). As duas seqüências ($p= 0,966$) e os dois períodos ($p= 0,073$) também não diferiram em termos de média de % GDS (Tabela 5.2).

Tabela 5.1 - Médias $\pm$ desvio-padrão de % PDS de acordo com a seqüência e o período

Seqüência	Período		
	1	2	
1 (S-X)	36,08 $\pm$ 14,17 (n=5)	27,11 $\pm$ 22,16 (n=5)	31,60 $\pm$ 18,16 (n=10)
2 (X-S)	23,98 $\pm$ 13,31 (n=6)	40,51 $\pm$ 16,49 (n=6)	32,24 $\pm$ 16,70 (n=12)
	29,48 $\pm$ 14,45 (n=11)	34,42 $\pm$ 19,53 (n=11)	

% PDS = porcentagem de perda de dureza de superfície; S-X = uso de pastilhas com sorbitol no primeiro período experimental e de pastilhas com xilitol no segundo; X-S = uso de pastilhas com xilitol no primeiro período experimental e de pastilhas com sorbitol no segundo; n = número de voluntários

Tabela 5.2 - Médias $\pm$ desvio-padrão de % GDS de acordo com a seqüência e o período

Seqüência	Período		
	1	2	
1 (S-X)	15,91 $\pm$ 11,98 (n=5)	20,54 $\pm$ 5,50 (n=5)	18,23 $\pm$ 9,12 (n=10)
2 (X-S)	15,05 $\pm$ 6,42 (n=6)	19,76 $\pm$ 5,58 (n=6)	17,40 $\pm$ 6,24 (n=12)
	15,44 $\pm$ 8,84 (n=11)	20,11 $\pm$ 5,28 (n=11)	

% GDS = porcentagem de ganho de dureza de superfície; S-X = uso de pastilhas com sorbitol no primeiro período experimental e de pastilhas com xilitol no segundo; X-S = uso de pastilhas com xilitol no primeiro período experimental e de pastilhas com sorbitol no segundo; n = número de voluntários

No experimento de desmineralização, a média das concentrações de Ca no biofilme dos voluntários que participaram do estudo na seqüência sorbitol-xilitol foi significativamente menor ($p= 0,069$) do que a observada para os voluntários da seqüência xilitol-sorbitol (Tabela 5.3). No experimento de remineralização, não houve diferença entre as médias das concentrações de Ca apresentadas pelas duas seqüências ($p= 0,777$) e pelos dois períodos ($p= 0,144$; Tabela 5.4).

Tabela 5.3 - Médias $\pm$ desvio-padrão de Ca ($\mu\text{g}/\text{mg}$) no experimento de desmineralização de acordo com a seqüência e o período

Seqüência	Período		
	1	2	
1 (S-X)	4,93 $\pm$ 4,37 (n=5)	1,89 $\pm$ 0,88 (n=5)	3,41 $\pm$ 1,33 (n=10)
2 (X-S)	8,35 $\pm$ 7,55 (n=6)	7,84 $\pm$ 6,88 (n=6)	8,09 $\pm$ 1,21 (n=12)
	6,79 $\pm$ 6,27 (n=11)	5,13 $\pm$ 5,80 (n=11)	

Ca = cálcio; S-X = uso de pastilhas com sorbitol no primeiro período experimental e de pastilhas com xilitol no segundo; X-S = uso de pastilhas com xilitol no primeiro período experimental e de pastilhas com sorbitol no segundo; n = número de voluntários

Tabela 5.4 - Médias $\pm$ desvio-padrão de Ca ($\mu\text{g}/\text{mg}$) no experimento de remineralização de acordo com a seqüência e o período

Seqüência	Período		
	1	2	
1 (S-X)	21,38 $\pm$ 37,81 (n=5)	16,23 $\pm$ 18,33 (n=5)	18,81 $\pm$ 28,15 (n=10)
2 (X-S)	13,52 $\pm$ 14,60 (n=6)	23,69 $\pm$ 32,79 (n=6)	18,60 $\pm$ 24,77 (n=12)
	17,09 $\pm$ 26,37 (n=11)	20,30 $\pm$ 26,21 (n=11)	

Ca = cálcio; S-X = uso de pastilhas com sorbitol no primeiro período experimental e de pastilhas com xilitol no segundo; X-S = uso de pastilhas com xilitol no primeiro período experimental e de pastilhas com sorbitol no segundo; n = número de voluntários

A média das concentrações de P_i no biofilme da seqüência sorbitol-xilitol foi significativamente menor ($p= 0,053$) do que a observada para a seqüência xilitol-sorbitol, no experimento de desmineralização (Tabela 5.5). Pode-se observar também que houve uma maior variabilidade nas concentrações de P_i entre os voluntários no segundo período. Entre as médias das concentrações de P_i apresentadas pelas duas seqüências e os dois períodos no experimento de remineralização, não houve diferenças estatisticamente significantes ($p= 0,469$ e $p= 0,480$; respectivamente. Tabela 5.6).

Tabela 5.5 - Médias $\pm$ desvio-padrão de P_i ($\mu\text{g}/\text{mg}$) no experimento de desmineralização de acordo com a seqüência e o período

Seqüência	Período		
	1	2	
1 (S-X)	1,84 $\pm$ 0,04 (n=2)	1,91 $\pm$ 1,06 (n=4)	1,89 $\pm$ 0,82 (n=6)
2 (X-S)	5,90 $\pm$ 0,43 (n=3)	4,57 $\pm$ 3,87 (n=6)	5,01 $\pm$ 3,14 (n=9)
	4,27 $\pm$ 2,24 (n=5)	3,51 $\pm$ 3,25 (n=10)	

P_i = fósforo inorgânico; S-X = uso de pastilhas com sorbitol no primeiro período experimental e de pastilhas com xilitol no segundo; X-S = uso de pastilhas com xilitol no primeiro período experimental e de pastilhas com sorbitol no segundo; n = número de voluntários

Tabela 5.6 - Médias $\pm$ desvio-padrão de P_i ($\mu\text{g}/\text{mg}$) no experimento de remineralização de acordo com a seqüência e o período

Seqüência	Período		
	1	2	
1 (S-X)	14,22 $\pm$ 22,53 (n=4)	11,13 $\pm$ 12,75 (n=4)	12,67 $\pm$ 17,03 (n=8)
2 (X-S)	9,39 $\pm$ 7,73 (n=5)	12,62 $\pm$ 14,24 (n=6)	11,15 $\pm$ 11,32 (n=11)
	11,53 $\pm$ 15,06 (n=9)	12,02 $\pm$ 12,94 (n=10)	

P_i = fósforo inorgânico; S-X = uso de pastilhas com sorbitol no primeiro período experimental e de pastilhas com xilitol no segundo; X-S = uso de pastilhas com xilitol no primeiro período experimental e de pastilhas com sorbitol no segundo; n = número de voluntários

A seqüência sorbitol-xilitol apresentou média significativamente menor, também, das concentrações de F no biofilme ($p = 0,006$) em relação à seqüência xilitol-sorbitol no experimento de desmineralização (Tabela 5.7). Por sua vez, a variabilidade foi maior nos dados da seqüência xilitol-sorbitol quando comparada à variabilidade observada na seqüência sorbitol-xilitol, e esta observação é válida para os dois períodos. No experimento de remineralização, a média das concentrações de F da seqüência sorbitol-xilitol foi menor do que a observada para a seqüência xilitol-sorbitol, porém sem significância estatística ($p = 0,288$; Tabela 5.8). Foi observado efeito estatisticamente significativo de período ($p = 0,010$): a média das

concentrações de F obtida no segundo período foi maior do que a observada no primeiro período. Como as médias de ambos os tratamentos foram maiores no segundo período, este resultado não é importante.

Tabela 5.7 - Médias $\pm$ desvio-padrão de F ($\mu\text{g/g}$) no experimento de desmineralização de acordo com a seqüência e o período

Seqüência	Período		
	1	2	
1 (S-X)	6,01 $\pm$ 3,42 (n=5)	3,83 $\pm$ 0,80 (n=5)	4,92 $\pm$ 2,61 (n=10)
2 (X-S)	14,99 $\pm$ 11,51 (n=6)	12,79 $\pm$ 11,03 (n=6)	13,89 $\pm$ 10,81 (n=12)
	10,91 $\pm$ 9,64 (n=11)	8,71 $\pm$ 9,11 (n=11)	

F = flúor; S-X = uso de pastilhas com sorbitol no primeiro período experimental e de pastilhas com xilitol no segundo; X-S = uso de pastilhas com xilitol no primeiro período experimental e de pastilhas com sorbitol no segundo; n = número de voluntários

Tabela 5.8 - Médias $\pm$ desvio-padrão de F ($\mu\text{g/g}$) no experimento de remineralização de acordo com a seqüência e o período

Seqüência	Período		
	1	2	
1 (S-X)	26,17 $\pm$ 27,91 (n=4)	37,60 $\pm$ 28,18 (n=4)	31,88 $\pm$ 26,67 (n=8)
2 (X-S)	24,27 $\pm$ 17,80 (n=6)	59,63 $\pm$ 37,22 (n=6)	41,95 $\pm$ 33,39 (n=12)
	25,03 $\pm$ 20,90 (n=10)	50,82 $\pm$ 34,12 (n=10)	

F = flúor; S-X = uso de pastilhas com sorbitol no primeiro período experimental e de pastilhas com xilitol no segundo; X-S = uso de pastilhas com xilitol no primeiro período experimental e de pastilhas com sorbitol no segundo; n = número de voluntários

A tabela 5.9 mostra que a média das concentrações de PEC insolúvel no biofilme da seqüência sorbitol-xilitol foi maior do que a observada para a seqüência xilitol-sorbitol no experimento de desmineralização, com diferença estatisticamente significativa ($p=0,012$). Houve uma alta variabilidade de PEC insolúvel na seqüência sorbitol-xilitol no segundo período. A média das concentrações de PEC insolúvel da

seqüência sorbitol-xilitol também foi maior do que a observada para a seqüência xilitol-sorbitol no experimento de remineralização, entretanto, neste caso, a diferença não foi estatisticamente significativa ($p= 0,485$; Tabela 5.10). As médias não se diferenciaram entre os dois períodos ($p= 0,718$).

Tabela 5.9 - Médias $\pm$ desvio-padrão de PEC insolúvel ($\mu\text{g}/\text{mg}$) no experimento de desmineralização de acordo com a seqüência e o período

Seqüência	Período		
	1	2	
1 (S-X)	21,21 $\pm$ 10,77 (n=5)	129,78 $\pm$ 73,25 (n=4)	69,46 $\pm$ 73,10 (n=9)
2 (X-S)	15,94 $\pm$ 14,86 (n=5)	19,62 $\pm$ 6,86 (n=6)	17,95 $\pm$ 10,75 (n=11)
	18,58 $\pm$ 12,55 (n=10)	63,69 $\pm$ 71,07 (n=10)	

PEC insolúvel = polissacarídeo extracelular insolúvel; S-X = uso de pastilhas com sorbitol no primeiro período experimental e de pastilhas com xilitol no segundo; X-S = uso de pastilhas com xilitol no primeiro período experimental e de pastilhas com sorbitol no segundo; n = número de voluntários

Tabela 5.10 - Médias $\pm$ desvio-padrão de PEC insolúvel ($\mu\text{g}/\text{mg}$) no experimento de remineralização de acordo com a seqüência e o período

Seqüência	Período		
	1	2	
1 (S-X)	19,30 $\pm$ 4,55 (n=4)	13,87 $\pm$ 7,70 (n=3)	16,97 $\pm$ 6,21 (n=7)
2 (X-S)	12,31 $\pm$ 14,95 (n=5)	15,49 $\pm$ 10,56 (n=6)	14,04 $\pm$ 12,06 (n=11)
	15,41 $\pm$ 11,54 (n=9)	14,95 $\pm$ 9,23 (n=9)	

PEC insolúvel = polissacarídeo extracelular insolúvel; S-X = uso de pastilhas com sorbitol no primeiro período experimental e de pastilhas com xilitol no segundo; X-S = uso de pastilhas com xilitol no primeiro período experimental e de pastilhas com sorbitol no segundo; n = número de voluntários

As médias das concentrações de PIC não diferiram estatisticamente entre as duas seqüências ($p= 0,775$) e os dois períodos ($p= 0,590$) no experimento de desmineralização (Tabela 5.11) e no experimento de remineralização ($p= 0,507$ e $p= 0,140$; respectivamente. Tabela 5.12).

Tabela 5.11 - Médias $\pm$ desvio-padrão de PIC ($\mu\text{g}/\text{mg}$) no experimento de desmineralização de acordo com a seqüência e o período

Seqüência	Período		
	1	2	
1 (S-X)	0,22 $\pm$ 0,21 (n=5)	9,33 $\pm$ 13,13 (n=4)	4,27 $\pm$ 9,36 (n=9)
2 (X-S)	10,36 $\pm$ 10,98 (n=5)	0,24 $\pm$ 0,08 (n=5)	5,30 $\pm$ 9,06 (n=10)
	5,29 $\pm$ 9,01 (n=10)	4,28 $\pm$ 9,36 (n=9)	

PIC = polissacarídeo intracelular; S-X = uso de pastilhas com sorbitol no primeiro período experimental e de pastilhas com xilitol no segundo; X-S = uso de pastilhas com xilitol no primeiro período experimental e de pastilhas com sorbitol no segundo; n = número de voluntários

Tabela 5.12 - Médias $\pm$ desvio-padrão de PIC ($\mu\text{g}/\text{mg}$) no experimento de remineralização de acordo com a seqüência e o período

Seqüência	Período		
	1	2	
1 (S-X)	2,12 $\pm$ 3,85 (n=4)	0,19 $\pm$ 0,13 (n=5)	1,05 $\pm$ 2,57 (n=9)
2 (X-S)	0,34 $\pm$ 0,28 (n=3)	2,59 $\pm$ 4,06 (n=6)	1,84 $\pm$ 3,40 (n=9)
	1,36 $\pm$ 2,89 (n=7)	1,50 $\pm$ 3,13 (n=11)	

PIC = polissacarídeo intracelular; S-X = uso de pastilhas com sorbitol no primeiro período experimental e de pastilhas com xilitol no segundo; X-S = uso de pastilhas com xilitol no primeiro período experimental e de pastilhas com sorbitol no segundo; n = número de voluntários.

Pode-se observar na tabela 5.13 que a média das contagens de SM da seqüência 2 foi maior do que a média observada na seqüência 1 no experimento de desmineralização, mas sem diferença estatisticamente significativa ($p= 0,807$). As médias também não diferiram significativamente entre os períodos ($p= 0,843$). Já no experimento de remineralização, a média das contagens de SM foi maior na seqüência 1, mas também sem significância estatística para os efeitos de seqüência ($p= 0,192$) ou de período ($p= 0,528$; Tabela 5.14).

Tabela 5.13 - Médias $\pm$ desvio-padrão de SM (UFC/mg) no experimento de desmineralização de acordo com a seqüência e o período

Seqüência	Período		
	1	2	
1 (S-X)	24.915,2 $\pm$ 35.676,8 (n=5)	9.889,5 $\pm$ 12.410,2 (n=5)	17.402,4 $\pm$ 26.398,2 (n=10)
2 (X-S)	349.425,4 $\pm$ 852.705,0 (n=6)	500.495,8 $\pm$ 1.179.105,2 (n=6)	424.960,6 $\pm$ 984.213,6 (n=12)
	201.920,8 $\pm$ 626.723,3 (n=11)	277.493,0 $\pm$ 872.267,2 (n=11)	

SM = estreptococos do grupo mutans; S-X = uso de pastilhas com sorbitol no primeiro período experimental e de pastilhas com xilitol no segundo; X-S = uso de pastilhas com xilitol no primeiro período experimental e de pastilhas com sorbitol no segundo; n = número de voluntários

Tabela 5.14 - Médias $\pm$ desvio-padrão de SM (UFC/mg) no experimento de remineralização de acordo com a seqüência e o período

Seqüência	Período		
	1	2	
1 (S-X)	492.749,3 $\pm$ 465.154,2 (n=5)	21.680,6 $\pm$ 41.206,7 (n=5)	257.214,9 $\pm$ 398.194,5 (n=10)
2 (X-S)	913,3 $\pm$ 734,4 (n=6)	312.347,1 $\pm$ 608.105,2 (n=6)	156.630,2 $\pm$ 441.066,4 (n=12)
	224.475,1 $\pm$ 390.539,5 (n=11)	180.225,9 $\pm$ 456.746,2 (n=11)	

SM = estreptococos do grupo mutans; S-X = uso de pastilhas com sorbitol no primeiro período experimental e de pastilhas com xilitol no segundo; X-S = uso de pastilhas com xilitol no primeiro período experimental e de pastilhas com sorbitol no segundo; n = número de voluntários

A média das porcentagens de SM / TM da seqüência 2 foi menor do que a média observada na seqüência 1 no experimento de desmineralização (Tabela 5.15). A média também foi menor no primeiro período em relação ao segundo período, mas as diferenças não foram significantes nem entre as seqüências ($p=0,986$), nem entre os períodos ($p=0,337$). No experimento de remineralização, não houve efeito estatisticamente significativo de seqüência ($p=0,126$) ou de período ($p=0,084$) para as médias das porcentagens de SM / TM (Tabela 5.16).

Tabela 5.15 - Médias $\pm$ desvio-padrão de % SM / TM no experimento de desmineralização de acordo com a seqüência e o período

Seqüência	Período		
	1	2	
1 (S-X)	0,0028 $\pm$ 0,0044 (n=5)	0,00013 $\pm$ 0,00017 (n=5)	0,0015 $\pm$ 0,00033 (n=10)
2 (X-S)	0,00023 $\pm$ 0,00026 (n=6)	0,0014 $\pm$ 0,0018 (n=6)	0,00081 $\pm$ 0,0014 (n=12)
	0,0014 $\pm$ 0,0031 (n=11)	0,00081 $\pm$ 0,0014 (n=11)	

SM = estreptococos do grupo mutans; TM = total de microrganismos viáveis; S-X = uso de pastilhas com sorbitol no primeiro período experimental e de pastilhas com xilitol no segundo; X-S = uso de pastilhas com xilitol no primeiro período experimental e de pastilhas com sorbitol no segundo; n = número de voluntários

Tabela 5.16 - Médias $\pm$ desvio-padrão de % SM / TM no experimento de remineralização de acordo com a seqüência e o período

Seqüência	Período		
	1	2	
1 (S-X)	0,038 $\pm$ 0,042 (n=5)	0,00032 $\pm$ 0,00047 (n=5)	0,019 $\pm$ 0,034 (n=10)
2 (X-S)	0,000068 $\pm$ 0,000071 (n=6)	0,0037 $\pm$ 0,0076 (n=6)	0,0019 $\pm$ 0,0055 (n=12)
	0,017 $\pm$ 0,033 (n=11)	0,0022 $\pm$ 0,0057 (n=11)	

SM = estreptococos do grupo mutans; TM = total de microrganismos viáveis; S-X = uso de pastilhas com sorbitol no primeiro período experimental e de pastilhas com xilitol no segundo; X-S = uso de pastilhas com xilitol no primeiro período experimental e de pastilhas com sorbitol no segundo; n = número de voluntários

De acordo com a tabela 5.17, as duas seqüências ($p= 0,952$) e os dois períodos ($p= 0,289$) não diferiram em termos de média das porcentagens de SM / S no experimento de desmineralização. No experimento de remineralização, a média das porcentagens de SM / S foi maior na seqüência sorbitol-xilitol e no primeiro período, porém sem significância estatística ($p= 0,181$ e $p= 0,126$; respectivamente. Tabela 5.18).

Tabela 5.17 - Médias $\pm$ desvio-padrão de % SM / S no experimento de desmineralização de acordo com a seqüência e o período

Seqüência	Período		
	1	2	
1 (S-X)	0,048 $\pm$ 0,043 (n=5)	0,0026 $\pm$ 0,0047 (n=5)	0,025 $\pm$ 0,037 (n=10)
2 (X-S)	0,0033 $\pm$ 0,0038 (n=6)	0,04 $\pm$ 0,047 (n=6)	0,021 $\pm$ 0,037 (n=12)
	0,023 $\pm$ 0,036 (n=11)	0,023 $\pm$ 0,038 (n=11)	

SM = estreptococos do grupo mutans; S = total de estreptococos; S-X = uso de pastilhas com sorbitol no primeiro período experimental e de pastilhas com xilitol no segundo; X-S = uso de pastilhas com xilitol no primeiro período experimental e de pastilhas com sorbitol no segundo; n = número de voluntários

Tabela 5.18 - Médias $\pm$ desvio-padrão de % SM / S no experimento de remineralização de acordo com a seqüência e o período

Seqüência	Período		
	1	2	
1 (S-X)	0,52 $\pm$ 0,5 (n=5)	0,0052 $\pm$ 0,011 (n=5)	0,26 $\pm$ 0,43 (n=10)
2 (X-S)	0,0014 $\pm$ 0,0022 (n=6)	0,11 $\pm$ 0,22 (n=6)	0,054 $\pm$ 0,16 (n=12)
	0,24 $\pm$ 0,42 (n=11)	0,061 $\pm$ 0,16 (n=11)	

SM = estreptococos do grupo mutans; S = total de estreptococos; S-X = uso de pastilhas com sorbitol no primeiro período experimental e de pastilhas com xilitol no segundo; X-S = uso de pastilhas com xilitol no primeiro período experimental e de pastilhas com sorbitol no segundo; n = número de voluntários

Pode-se observar pela tabela 5.19 que a média das contagens de LB da seqüência 2 foi maior do que a média observada na seqüência 1, assim como no primeiro período em relação ao segundo período no experimento de desmineralização, mas as diferenças não foram significantes estatisticamente entre as seqüências ($p= 0,696$) e entre os períodos ($p= 0,537$). No experimento de remineralização, a média das contagens de LB foi maior na seqüência 2 e no segundo período, mas também sem diferença significativa ($p= 0,932$ e $p= 0,258$; respectivamente. Tabela 5.20).

Tabela 5.19 - Médias $\pm$ desvio-padrão de LB (UFC/mg) no experimento de desmineralização de acordo com a seqüência e o período

Seqüência	Período	
	1	2
1 (S-X)	1.712.624,8 $\pm$ 3.168.696,8 (n=5)	3.700.149,4 $\pm$ 6.827.974,3 (n=5)
2 (X-S)	6.741.120,3 $\pm$ 15.970.899,0 (n=6)	1.668.331,8 $\pm$ 2.550.572,9 (n=6)
	4.455.440,6 $\pm$ 11.766.358,0 (n=11)	2.591.885,3 $\pm$ 4.798.656,0 (n=11)

LB = lactobacilos; S-X = uso de pastilhas com sorbitol no primeiro período experimental e de pastilhas com xilitol no segundo; X-S = uso de pastilhas com xilitol no primeiro período experimental e de pastilhas com sorbitol no segundo; n = número de voluntários

Tabela 5.20 - Médias $\pm$ desvio-padrão de LB (UFC/mg) no experimento de remineralização de acordo com a seqüência e o período

Seqüência	Período	
	1	2
1 (S-X)	34.000 $\pm$ 40.000 (n=5)	15.000 $\pm$ 23.000 (n=5)
2 (X-S)	1.900 $\pm$ 2.400 (n=6)	420.000 $\pm$ 830.000 (n=6)
	17.000 $\pm$ 30.000 (n=11)	240.000 $\pm$ 620.000 (n=11)

LB = lactobacilos; S-X = uso de pastilhas com sorbitol no primeiro período experimental e de pastilhas com xilitol no segundo; X-S = uso de pastilhas com xilitol no primeiro período experimental e de pastilhas com sorbitol no segundo; n = número de voluntários

Para o parâmetro % LB / TM, as duas seqüências e os dois períodos não diferiram de maneira estatisticamente significativa ($p= 0,341$ e $p= 0,783$; respectivamente) no experimento de desmineralização (Tabela 5.21) e no experimento de remineralização ($p= 0,660$ e $p= 0,775$; respectivamente. Tabela 5.22).

Tabela 5.21 - Médias $\pm$ desvio-padrão de % LB / TM no experimento de desmineralização de acordo com a seqüência e o período

Seqüência	Período		
	1	2	
1 (S-X)	0,09 $\pm$ 0,11 (n=5)	0,05 $\pm$ 0,10 (n=5)	0,07 $\pm$ 0,10 (n=10)
2 (X-S)	0,01 $\pm$ 0,02 (n=6)	0,07 $\pm$ 0,11 (n=6)	0,04 $\pm$ 0,08 (n=12)
	0,05 $\pm$ 0,08 (n=11)	0,06 $\pm$ 0,10 (n=11)	

LB = lactobacilos; TM = total de microrganismos viáveis; S-X = uso de pastilhas com sorbitol no primeiro período experimental e de pastilhas com xilitol no segundo; X-S = uso de pastilhas com xilitol no primeiro período experimental e de pastilhas com sorbitol no segundo; n = número de voluntários

Tabela 5.22 - Médias $\pm$ desvio-padrão de % LB / TM no experimento de remineralização de acordo com a seqüência e o período

Seqüência	Período		
	1	2	
1 (S-X)	0,0019 $\pm$ 0,021 (n=5)	0,00029 $\pm$ 0,00043 (n=5)	0,0011 $\pm$ 0,0016 (n=10)
2 (X-S)	0,0033 $\pm$ 0,008 (n=6)	0,0037 $\pm$ 0,0057 (n=6)	0,0035 $\pm$ 0,0066 (n=12)
	0,0027 $\pm$ 0,0059 (n=11)	0,0021 $\pm$ 0,0044 (n=11)	

LB = lactobacilos; TM = total de microrganismos viáveis; S-X = uso de pastilhas com sorbitol no primeiro período experimental e de pastilhas com xilitol no segundo; X-S = uso de pastilhas com xilitol no primeiro período experimental e de pastilhas com sorbitol no segundo; n = número de voluntários

Quando as transformações logarítmicas dos dados originais foram submetidas ao modelo de ANOVA, foi verificado efeito estatisticamente significativo de seqüência para os parâmetros quantidade de Ca, de P_i , de F e de PEC insolúvel no biofilme no experimento de desmineralização, ou seja, houve efeito residual ou persistente do primeiro tratamento sobre o segundo período. Desta forma, as observações do segundo período foram abandonadas para estas variáveis e comparou-se o efeito dos tratamentos somente com as observações do primeiro período. Para todas as demais variáveis que não apresentaram efeito

estatisticamente significativa de seqüência, a análise do efeito dos tratamentos foi realizada com as observações dos dois períodos experimentais.

5.2 Análise do efeito dos tratamentos

Embora o teste estatístico não tenha detectado diferença significativa entre os tratamentos ($p = 0,066$), a % PDS dos blocos de esmalte expostos ao xilitol apresentou uma tendência a ser menor que a % PDS observada na presença de sorbitol (Figura 5.1). Já em relação à % GDS, não houve diferença entre os grupos ($p = 0,788$).

As médias das concentrações dos componentes inorgânicos do biofilme foram maiores em presença de xilitol no experimento de desmineralização e em presença de sorbitol no experimento de remineralização (Figura 5.2), contudo, o efeito dos tratamentos só foi estatisticamente significativo para P_i no experimento de desmineralização ($p < 0,001$). Este resultado deve ser avaliado com cautela, uma vez que para esta variável o teste foi realizado com apenas cinco observações. O teste estatístico não foi capaz de detectar diferenças significantes entre os tratamentos com xilitol ou sorbitol no experimento de desmineralização para as variáveis Ca ($p = 0,752$) e F ($p = 0,153$), e no experimento de remineralização para as variáveis Ca ($p = 0,544$), P_i ($p = 0,767$) e F ($p = 0,367$). Este fato pode ser atribuído à alta variabilidade e ao pequeno número de observações disponíveis para estes parâmetros.

Figura 5.1 - Médias das porcentagens de perda (% PDS) e de ganho (% GDS) de dureza de superfície dos blocos de esmalte, de acordo com o tratamento. Barras verticais representam os valores de desvio-padrão. Letras minúsculas iguais indicam ausência de diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos ($p > 0,05$). Letras minúscula e maiúscula indicam tendência à diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos ($0,05 < p < 0,1$). n = Número de voluntários

Os tratamentos com os diferentes poliálcoóis também não influenciaram de forma significativa as médias das concentrações de PEC insolúvel no biofilme no experimento de desmineralização ($p = 0,264$) e no experimento de remineralização ($p = 0,444$), assim como as médias das concentrações de PIC no biofilme no experimento de remineralização ($p = 0,328$; Figura 5.3). Já as médias das concentrações de PIC no biofilme no experimento de desmineralização foram significativamente menores ($p = 0,007$) no grupo do sorbitol em relação ao grupo do xilitol.

Figura 5.2 - Médias das concentrações inorgânicas no biofilme total, de acordo com a condição e o tratamento. Barras verticais representam os valores de desvio-padrão. Letras diferentes sob a mesma condição indicam diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$)

No experimento de desmineralização, as contagens de SM ($p = 0,248$) e LB ($p = 0,818$), assim como as porcentagens de LB no biofilme ($p = 0,341$) não foram influenciadas de maneira significativa pelos dois tratamentos (Tabela 5.23). A média das porcentagens de SM / TM foi menor no grupo do xilitol em relação ao grupo do sorbitol, mas o teste estatístico não foi capaz de evidenciar tal diferença, apresentando um resultado apenas marginalmente significativo ($p = 0,051$). Para o parâmetro porcentagem de SM / S, os tratamentos apresentaram efeito estatisticamente significativo, ou seja, o grupo do xilitol apresentou média de porcentagem de SM / S estatisticamente menor do que a apresentada pelo grupo sorbitol ($p = 0,037$). No experimento de remineralização, a diferença entre o efeito dos tratamentos foi estatisticamente significativa para quase todos os parâmetros

microbiológicos, com exceção da porcentagem de LB / TM ($p= 0,109$). As contagens de SM ($p= 0,035$) e LB ($p= 0,048$), assim como as porcentagens de SM / TM ($p= 0,035$) e SM / S ($p= 0,017$) foram significativamente menores no biofilme formado em presença de xilitol (Tabela 5.23).

Figura 5.3 - Médias das concentrações de polissacarídeo extracelular insolúvel (PEC insolúvel) e de polissacarídeo intracelular (PIC) no biofilme, de acordo com a condição e o tratamento. Barras verticais representam os valores de desvio-padrão. Letras diferentes sob a mesma condição indicam diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$)

Tabela 5.23 - Médias $\pm$ desvio-padrão das variáveis microbiológicas do biofilme, de acordo com as condições e os tratamentos

Variáveis	Condições			
	Desmineralização		Remineralização	
	Tratamentos		Tratamentos	
	xilitol	sorbitol	xilitol	sorbitol
SM, UFC / mg biofilme $\times 10^4$	19,51 $\pm$ 62,85 ^a (n=11)	28,43 $\pm$ 87,03 ^a (n=11)	1,04 $\pm$ 2,82 ^a (n=11)	39,44 $\pm$ 52,95 ^b (n=11)
% SM / TM	0,0002 $\pm$ 0,0002 ^a (n=11)	0,002 $\pm$ 0,003 ^A (n=11)	0,0002 $\pm$ 0,0003 ^a (n=11)	0,019 $\pm$ 0,032 ^b (n=11)
% SM / S	0,003 $\pm$ 0,004 ^a (n=11)	0,043 $\pm$ 0,043 ^b (n=11)	0,003 $\pm$ 0,007 ^a (n=11)	0,297 $\pm$ 0,413 ^b (n=11)
LB, UFC / mg biofilme $\times 10^6$	5,36 $\pm$ 12,19 ^a (n=11)	1,69 $\pm$ 2,70 ^a (n=11)	0,01 $\pm$ 0,02 ^a (n=11)	0,25 $\pm$ 0,62 ^b (n=11)
% LB / TM	0,03 $\pm$ 0,07 ^a (n=11)	0,08 $\pm$ 0,15 ^a (n=11)	0,002 $\pm$ 0,006 ^a (n=11)	0,003 $\pm$ 0,004 ^a (n=11)

SM = estreptococos do grupo mutans; TM = total de microorganismos viáveis; S = total de estreptococos; LB = lactobacilos;
n = número de voluntários.

Letras minúsculas diferentes sob a mesma condição indicam diferença estatisticamente significante entre os tratamentos ($p < 0,05$).

Letras minúscula e maiúscula sob a mesma condição indicam tendência à diferença estatisticamente significante entre os tratamentos ($0,05 < p < 0,1$)

6 DISCUSSÃO

Os estudos *in situ* funcionam como uma ponte entre a situação clínica natural não controlada e a situação laboratorial altamente controlada. A intenção destes modelos é simular o que ocorre no processo natural da lesão de cárie através de um substrato dental exposto à saliva na cavidade bucal, com formação de biofilme cariogênico e presença de um desafio de carboidrato controlado experimentalmente, em função do tempo determinado pela longevidade do período experimental. Os modelos de cárie *in situ* podem prover informação clinicamente relevante e elucidar detalhes não compreendidos em estudos clínicos, em um período relativamente curto de tempo, sem causar alterações irreversíveis na dentição natural (ZERO, 1995). Estudos *in situ* randomizados, duplo-cegos e cruzados com a participação de 10 a 15 voluntários são amplamente utilizados para testar efeitos cariogênicos ou anticariogênicos de diversas substâncias (AIRES et al., 2006; CURY et al., 2000, 2001a, 2001b, 2003, 2005; CURY; REBELLO; DEL BEL CURY, 1997; LEACH; LEE; EDGAR, 1989; RIBEIRO et al., 2005; SMITS; ARENDS, 1985, 1988; TENUTA et al., 2003).

Quando os resultados do presente estudo foram submetidos a um modelo de análise de variância para estudos cruzados, pôde-se observar que o intervalo de uma semana mantido entre as fases experimentais (*wash-out*) foi insuficiente para evitar efeito residual dos polióis em alguns parâmetros (componentes inorgânicos e PEC insolúvel, no experimento de desmineralização, Tabelas 5.3, 5.5, 5.7 e 5.9), de maneira que o primeiro tratamento influenciou os resultados do segundo tratamento. No experimento de desmineralização, os voluntários que iniciaram o estudo no grupo

do sorbitol apresentaram um biofilme com quantidades significativamente menores de componentes inorgânicos e maiores de PEC insolúvel do que os voluntários que iniciaram o experimento no grupo do xilitol, tanto na primeira fase experimental quando na segunda. A exposição ao sorbitol no primeiro período produziu um biofilme com características de maior cariogenicidade (AIRES et al., 2006; CURY et al., 2000; CURY; REBELLO; DEL BEL CURY, 1997) em presença de sacarose e este efeito persistiu após sete dias, fazendo com que o biofilme formado em presença de xilitol no segundo período também tivesse estas características, o que, por sua vez, não aconteceu quando a exposição ao xilitol ocorreu no primeiro período. Este é um achado intrigante, mas que pode estar relacionado ao fato de as bactérias em presença de sorbitol estarem metabolicamente mais ativas do que em presença do xilitol, de maneira a utilizarem com mais eficiência os carboidratos disponíveis a ponto de interferir na composição bioquímica do biofilme. Esta maior eficiência metabólica parece ter minimizado uma inibição que poderia ter sido produzida pelo xilitol, quando este foi usado após o sorbitol. Desta maneira, para estes parâmetros (componentes inorgânicos e PEC insolúvel, no experimento de desmineralização) foram considerados apenas os resultados da primeira fase, o que diminuiu o número amostral e pode ter contribuído para a não observação de diferenças estatisticamente significantes entre os tratamentos (Figuras 5.2 e 5.3). Por sua vez, o uso do xilitol no primeiro período experimental não demonstrou efeito residual anti-mutans no biofilme quando este foi formado em presença de sorbitol no segundo período experimental, nem no experimento de desmineralização nem no experimento de remineralização (Tabelas 5.13 a 5.18). Ou seja, para os parâmetros microbiológicos o período de *wash-out* de sete dias foi adequado.

Os resultados de estudos clínicos de longa duração sugerem que a utilização freqüente de produtos contendo xilitol provoque uma mudança prolongada na homeostase e na cariogenicidade do biofilme dental (ALANEN; ISOKANGAS; GUTMANN; 2000; HUJOEL et al., 1999; ISOKANGAS et al., 1993, 2000; SÖDERLING et al., 2001). Contudo, estas alterações no biofilme só se tornam persistentes o bastante para resistirem à interrupção da exposição ao xilitol após longos períodos de contato com o açúcar (TRAHAN; MOUTON, 1987). Segundo Loesche et al. (1984), o consumo de chicletes com xilitol por curtos períodos (quatro semanas) causa mudanças na flora bucal, principalmente reduzindo os níveis salivares e a proporção de *S. mutans* no biofilme, porém estes valores retornam aos valores iniciais uma vez que a exposição é interrompida, de maneira a não mais diferir destes de forma significativa já na primeira avaliação realizada duas semanas após o fim do tratamento. O mesmo ocorreu no estudo de Trindade (2005): a redução nos níveis salivares de SM ocorrida após o uso regular de chicletes com xilitol não persistiu após 30 dias de interrupção do uso. No estudo de Birkhed et al. (1983), o uso por curtos períodos (quatro dias) de chicletes com sorbitol ou com uma mistura de sorbitol e xilitol não demonstrou efeito residual sobre a composição bioquímica do biofilme três horas após o encerramento das fases experimentais.

Os estudos que avaliaram produtos contendo xilitol e sorbitol em delineamento cruzado relataram diferentes períodos de *wash-out*, variando de dois dias (MÄKINEN et al., 1985; SMITS; ARENTS, 1985), até uma, seis ou sete semanas (BIRKHED et al., 1983; STEINBERG; ODUSOLA; MANDEL, 1992; WENNERHOLM et al., 1994). Alguns autores, inclusive, não relataram período de *wash-out* (LEACH; LEE; EDGAR, 1989; MANNING; EDGAR; AGALAMANYI, 1992; SMITS; ARENTS, 1988). Nenhuma menção foi encontrada na literatura sobre qual

seria um período de *wash-out* ideal ou mínimo para evitar efeito residual (*carry-over*) dos polióis sobre o próximo período experimental. De acordo com Hujoel et al. (1999), mais estudos são necessários para determinar a duração tanto do *lag period* (período entre o início do tratamento e o momento no qual este atinge sua efetividade máxima) quanto do *carry-over period* com produtos contendo xilitol.

Assim, adotou-se neste estudo um período de *wash-out* de sete dias entre os cruzamentos, que corresponde ao intervalo observado em vários estudos do tipo cruzado que serviram de base para a definição da metodologia empregada (AIRES et al., 2006; CCAHUANA-VÁSQUEZ et al., 2007; CURY et al., 2001a, 2003; PECHARKI et al., 2005; TENUTA et al., 2003, 2006a, 2006b).

É interessante investigar o papel do xilitol na desmineralização e na remineralização separadamente uma vez que os maiores benefícios de um agente anticariogênico são alcançados através de uma alternância na dinâmica de des-re em favor da remineralização durante a formação da lesão e, assim, prevenindo o desenvolvimento da mesma, em vez de apenas reparar lesões já bem estabelecidas (LEACH; LEE; EDGAR, 1989). O uso de diferentes desafios cariogênicos (*split-mouth*) no mesmo dispositivo palatino intrabucal se baseou na ausência de efeito cruzado em estudos prévios (AIRES et al., 2006; CCAHUANA-VÁSQUEZ et al., 2007; CURY et al., 2001a; PAES LEME et al., 2004; PECHARKI et al., 2005, RIBEIRO et al., 2005). O excesso de solução de sacarose era removido com gaze ou papel absorvente para evitar que este escorresse para o outro lado do dispositivo, sobre os blocos de esmalte previamente desmineralizados *in vitro* e que não deveriam ser expostos ao desafio cariogênico.

Vários autores (CURY et al., 2000, 2003; CURY; REBELLO; DEL BEL CURY, 1997; PAES LEME et al., 2004; PECHARKI et al., 2005; TENUTA et al., 2006a) já

havam relatado que exposição a solução de sacarose 20%, oito vezes ao dia, diminuía significativamente as concentrações de F, Ca e P_i e aumentava, também com significância estatística, a concentração de PEC insolúvel no biofilme dental formado sobre blocos de esmalte humano polidos em modelo *in situ* semelhante ao desenvolvido neste estudo, em comparação a não exposição a solução de sacarose. Embora estas diferenças não tenham sido testadas estatisticamente, a exposição à sacarose provocou efeito semelhante nesta pesquisa para todos os componentes inorgânicos avaliados, assim como para PEC insolúvel, tanto no grupo do xilitol quanto no grupo do sorbitol (Figuras 5.2 e 5.3). O aumento nas quantidades de PEC insolúvel em presença de sacarose pode ser explicado pelo fato de este tipo de polissacarídeo ser sintetizado exclusivamente na presença deste carboidrato. Ainda não há uma explicação conclusiva para a menor concentração inorgânica no biofilme formado em presença de sacarose (CCAHUANA-VÁSQUEZ et al., 2007; CURY et al., 2000; PAES LEME et al., 2006).

Considerando-se que a sacarose é substrato para a produção de ácidos pelas bactérias, e que promove a adesão e agregação de bactérias que expressam enzimas glicosiltransferases na superfície, um aumento na quantidade de espécies acidúricas como SM e LB (KRALJ et al., 2004; RØLLA, 1989; SÖDERLING et al., 1987) poderia ser esperado em presença deste dissacarídeo. Com relação aos SM, entretanto, sua contagem e proporção no biofilme não foi numericamente maior quando o grupo do sorbitol esteve exposto à sacarose (Tabela 5.23). No grupo do xilitol, as quantidades de SM foram numericamente maiores no biofilme formado em presença de sacarose (Tabela 5.23), mas este achado parece estar mais relacionado a um efeito diferenciado desta pentose sobre este grupo microbiano em presença ou ausência de sacarose, que será discutido mais adiante. Em estudos *in*

situ, nos quais a exposição a carboidratos e o acúmulo de biofilme são experimentalmente controlados, uma relação direta entre exposição à sacarose e aumento de SM no biofilme não foi demonstrada (CCAHUANA-VÁSQUEZ et al., 2007; CURY et al., 2001b; PAES LEME et al., 2004; TENUTA et al., 2006b).

In situ, LB costumam aumentar de quatro a dez vezes mais do que SM em biofilmes formados em presença de sacarose, quando comparados a biofilmes formados em ausência deste carboidrato (MINAH; LOVEKIN; FINNEY, 1981). Neste estudo, os LB predominaram proporcionalmente em relação aos SM no biofilme formado em presença de sacarose, tanto no grupo do xilitol quanto no grupo do sorbitol (Tabela 5.23). A seleção de LB já foi previamente demonstrada *in situ* quando o biofilme foi formado em presença de sacarose em protocolos semelhantes a este (CCAHUANA-VÁSQUEZ et al., 2007; PECHARKI et al., 2005; RIBEIRO et al., 2005; TENUTA et al., 2006b). Segundo Tenuta et al. (2006b), de alguma forma a maior acidogenicidade e aciduricidade do LB em relação ao SM pode promover sua seleção no biofilme durante freqüentes quedas de pH causadas pela sacarose. Mesmo no biofilme formado em ausência de sacarose, altas contagens de LB foram obtidas tanto no grupo do xilitol quanto no grupo do sorbitol (Tabela 5.23). No modelo experimental desenvolvido nesta tese, no qual o biofilme se forma e se mantém sem ser perturbado durante 14 dias, é possível que este se assemelhe mais ao biofilme de região interproximal ou mesmo de uma lesão cáries, rico em LB (LOESCHE; SYED, 1973; TENUTA et al., 2006b), do que ao biofilme de uma superfície lisa onde predominam SM. Os SM, que possuem uma vantagem competitiva na colonização de superfícies lisas, são menos prevalentes em estudos *in situ* nos quais blocos de esmalte são posicionados sob uma tela. Na presença de tela, ocorre uma alteração do perfil microbiano uma vez que a colonização se torna

menos dependente da capacidade de adesão (KOULOURIDES et al., 1976). Assim, o mecanismo através do qual a sacarose aumentaria as quantidades de SM e LB no biofilme por ser substrato para a formação de grandes quantidades de PEC insolúvel pode não ser muito importante *in situ*. Os resultados de Tenuta et al. (2006b) sugerem que PEC insolúveis não sejam mesmo relevantes na seleção de SM ou LB no biofilme *in situ*.

Segundo Leach, Lee e Edgar (1989), o uso de tela para promover retenção de biofilme pode ter dois efeitos. Na presença de dieta cariogênica (sacarose), pode dificultar o acesso de saliva à interface dente-biofilme, aumentar a retenção bacteriana e, com isso, induzir a desmineralização; alternativamente, as altas concentrações de cálcio, fósforo e flúor no biofilme em ausência de sacarose podem fazer com que este biofilme funcione como reservatório de íons, favorecendo a remineralização.

Neste estudo, os blocos de esmalte submetidos a desafio cariogênico desmineralizaram nos dois grupos de tratamento. Embora não tenha havido diferença estatisticamente significativa entre os grupos, chupar pastilhas com xilitol demonstrou uma tendência a diminuir a desmineralização em comparação a chupar pastilhas com sorbitol (Figura 5.1).

Estes resultados estão de acordo com os estudos clínicos longitudinais que compararam diretamente o efeito preventivo de cárie de chicletes adoçados com xilitol e com sorbitol, e que sugerem uma redução discretamente maior nos índices de cárie com o uso de chicletes adoçados com xilitol. Enquanto no estudo de Mäkinen et al. (1995b) o xilitol foi significativamente superior ao sorbitol em reduzir o risco ao ataque cariogênico em dentes permanentes, nos estudos de Machiulskiene, Nyvad e Baelum (2001) e Mäkinen et al. (1996) a superioridade preventiva do xilitol

sobre o sorbitol não foi suficiente para demonstrar diferenças estatisticamente significantes nos incrementos de cárie em dentes permanentes e decíduos, respectivamente. Os estudos clínicos que examinaram o efeito de produtos contendo xilitol ou sorbitol em comparação ao efeito de produtos adoçados com sacarose ou ao não consumo de chicletes ou pastilhas, no geral, demonstraram uma maior redução na incidência de cárie dentária para o xilitol, de 30% a 85% (ALANEN; ISOKANGAS; GUTMANN, 2000; HONKALA et al., 2006; ISOKANGAS; TIEKSO; ALANEN, 1988; KANDELMAN; GAGNON, 1990; MÄKINEN et al., 1995b; SCHEININ et al., 1975, 1985) do que para o sorbitol, de zero a 48% (BÁNÓCZY et al., 1981; MÄKINEN et al., 1996; MÖLLER; POULSEN, 1973; SLAKC; MILLWARD; MARTIN, 1964; VAN LOVEREN, 2004).

Problemas metodológicos presentes na maioria dos estudos *in situ* que investigaram os efeitos dos polióis na desmineralização, como falta de padronização sobre o desafio cariogênico instituído (KOULOURIDES et al., 1976; SMITS; ARENDS, 1988; WENNERHOLM et al., 1994) e ausência de um grupo controle adequado para o poliól (KOULOURIDES et al., 1976; SMITS; ARENDS, 1988) ou para o estímulo do fluxo salivar causado por seu veículo (KASHKET; YASKELL; LOPEZ, 1989), dificultam conclusões a partir dos mesmos.

Pastilha, balas ou chiclete aumentam o fluxo salivar como resultado de estímulos mecânicos (sucção ou mastigação intensas) e gustativos (doce). Quando as glândulas salivares são estimuladas, a composição salivar muda de predominantemente mucosa para predominantemente serosa, contribuindo para um aumento na remoção de alimentos e açúcares ingeridos da cavidade bucal. Além disso, um aumento no fluxo salivar aumenta automaticamente todas as características protetoras da saliva, como capacidade tampão, atividade imunológica

e antimicrobiana, remoção bacteriana por agregação, e manutenção de supersaturação de íons cálcio e fósforo em relação à hidroxiapatita (HICKS; GARCIA-GODOY; FLAITSZ, 2003). Assim, em ausência de um controle adequado para o estímulo do fluxo salivar fica difícil avaliar se o efeito preventivo de mascar chicletes sem açúcar está relacionado apenas ao processo de mastigação ou se há um efeito preventivo do poliól por si só.

Os estudos *in situ* não evidenciaram capacidade dos polióis em chicletes (WENNERHOLM et al., 1994) ou em solução (GONÇALVES et al., 2006) de diminuir a desmineralização do esmalte *in situ*, com comportamento semelhante para xilitol e sorbitol (WENNERHOLM et al., 1994). No estudo de Gonçalves et al. (2006), foi avaliado o efeito de uma única exposição por apenas um minuto às soluções com concentrações baixas dos polióis, e essas peculiaridades podem ter dificultado a observação de efeito destes açúcares sobre a desmineralização.

O fato de as concentrações de xilitol variarem muito entre os trabalhos também prejudica a comparação dos resultados de diferentes estudos. Nesta pesquisa, foi usado um produto comercial contendo xilitol 88,30%, o que representa 0,1766g de xilitol por pastilha (mini-pastilhas Smint[®], Chupa Chups S.A., Barcelona, Espanha). Os voluntários consumiram oito pastilhas por dia, o que equivale a 1,4128g de xilitol por dia. Uma vez que ainda não há evidência de uma dose preventiva mínima de xilitol (ALANEN; ISOKANGAS; GUTMANN, 2000; VAN LOVEREN, 2004), a dose de 1,4128g foi definida em função da frequência desejada e do momento conveniente para o emprego das pastilhas. Contudo, cuidado foi tomado para que a dose diária de xilitol não fosse inferior a 0,9g, dose mínima para a qual há relato de efeito preventivo de cárie na literatura (KANDELMAN; GAGNON, 1990). Os estudos clínicos sugerem que a frequência de uso do xilitol possa ser tão

ou até mais importante que a quantidade, de maneira que, para o controle da cárie dentária, é necessário que os chicletes ou pastilhas sejam consumidos pelo menos três vezes ao dia (VAN LOVEREN, 2004). Como a indicação mais constante observada na literatura para a utilização de produtos contendo xilitol é que esta seja feita em seguida a refeições ou lanches açucarados (LEACH; LEE; EDGAR, 1989), optou-se por instituir o consumo das pastilhas logo após os desafios cariogênicos e, portanto, na mesma frequência destes.

O fato das pastilhas terem sido usadas logo após o desafio cariogênico poderia ter tornado a estimulação do fluxo salivar ainda mais relevante neste estudo, pois é bem estabelecido que em presença de alto fluxo salivar o pH do biofilme não cai a valores críticos de desmineralização do esmalte, ou retorna mais rapidamente ao normal (CREANOR et al., 1992; LEACH; LEE; EDGAR, 1989). Contudo, como houve um adequado controle para este parâmetro, obtido através de pastilhas com sorbitol que demonstraram a mesma capacidade de estimular o fluxo salivar dos voluntários que as pastilhas teste com xilitol (APÊNDICE B), as porcentagens de perda e ganho de dureza de superfície foram influenciadas pelo aumento do fluxo salivar de maneira semelhante nos dois grupos. Assim, as diferenças encontradas podem ser atribuídas a diferenças entre os dois polióis.

A constatação de que a adição de altas concentrações de xilitol a soluções desmineralizadoras diminui a desmineralização *in vitro* (ARENDS et al., 1984, 1990) chamou a atenção para o fato de que o xilitol possa influenciar diretamente o processo carioso interagindo com os minerais do esmalte. Os autores consideraram que o mecanismo através do qual o xilitol inibe a dissolução ácida do esmalte *in vitro* está relacionado à sua capacidade de interferir no transporte dos componentes dissolvidos do esmalte, retardando a difusão de íons cálcio e fosfato para fora do

esmalte desmineralizado. Por sua vez, este processo foi sugerido com base na capacidade não específica demonstrada pelo xilitol de se associar a íons cálcio em solução aquosa, formando complexos estáveis (MÄKINEN; SÖDERLING, 1984). Esta capacidade de ligação a íons cálcio também é verificada para o sorbitol (MÄKINEN; SÖDERLING, 1984). O xilitol em concentrações menores não foi capaz de diminuir a desmineralização *in vitro* (AMAECHI; HIGHAM; EDGAR, 1999). Considerando que a dose utilizada nesta pesquisa foi muito inferior à dose eficaz nos trabalhos de Arends et al. (1984, 1990), e que os resultados para o xilitol têm por base os resultados do sorbitol, pode-se supor que um possível efeito direto dos polióis sobre os minerais do esmalte não tenha afetado de maneira importante os resultados deste trabalho.

No experimento de desmineralização, o uso de pastilhas com xilitol aumentou de maneira significativa as concentrações de P_i no biofilme, em relação ao uso de pastilhas com sorbitol (Figura 5.2). Maiores concentrações de P_i no biofilme e assim de tampão fosfato, podem provocar valores mais altos de pH (TENUTA et al., 2006a) e, com isso, menor desmineralização. Entretanto, seria precipitado traçar conclusões a respeito das concentrações de P_i neste estudo devido ao pequeno número de observações disponíveis para esta variável. Como as concentrações de Ca e F não diferiram no biofilme formado em presença de xilitol e de sorbitol (Figura 5.2), e foi observada uma tendência a maior perda de dureza do esmalte hígido no grupo do sorbitol (Figura 5.1), as concentrações destes minerais inorgânicos no biofilme total parecem não ter influenciado a desmineralização em presença de sacarose. Este efeito havia sido sugerido em alguns trabalhos (CURY et al., 2000; CURY; REBELLO; DEL BEL CURY, 1997; TENUTA et al., 2003). A composição inorgânica do biofilme estabelece condições de sub ou supersaturação em relação ao esmalte

que favorecem ou a desmineralização ou a remineralização. Estes minerais são importantes para manterem o ambiente supersaturado em relação ao conteúdo mineral do esmalte dental, de maneira que quando o pH cai os compostos minerais no biofilme serão dissolvidos antes da hidroxiapatita e da fluorapatita (HICKS; GARCIA-GODOY; FLAITZ, 2003). Porém, é preciso ressaltar que são apenas os níveis de Ca, P_i e F presentes no fluido do biofilme que efetivamente determinam a saturação mineral do ambiente bucal em relação ao dente (MARGOLIS; MORENO, 1992; VOGEL et al., 1990), e que, assim, controlam se está ocorrendo desmineralização ou remineralização dental. A importância da concentração destes íons no biofilme total em relação à cárie dentária ainda precisa ser esclarecida (CCAHUANA-VÁSQUEZ et al., 2007). Alguns estudos também não encontraram diferenças entre as concentrações de Ca (MÄKINEN et al., 1985; STEINBERG; ODUSOLA; MANDEL, 1992) e P_i (MÄKINEN et al., 1985) no biofilme formado *in vivo* em presença de sorbitol ou de xilitol, e ambos os polióis quando usados em chicletes aumentaram significativamente a quantidade de Ca no biofilme em relação ao não uso de chicletes (STEINBERG; ODUSOLA; MANDEL, 1992). O presente estudo não dosou a quantidade destes íons no biofilme formado sem o uso de pastilhas, assim, um possível efeito dos polióis de aumentar as concentrações de Ca no biofilme não pôde ser estimado.

A tendência a uma maior desmineralização observada no grupo do sorbitol em relação ao grupo do xilitol sugere um potencial cariogênico maior deste biofilme em presença de sacarose, o que pode estar relacionado à composição e à atividade bacteriana do mesmo. A porcentagem de SM em relação ao total de estreptococos foi significativamente maior no biofilme formado em presença de sorbitol do que no biofilme formado em presença de xilitol (Tabela 5.23). A mesma tendência foi

observada para a porcentagem de SM em relação ao total de microrganismos viáveis. Embora a contagem de SM (UFC/mg de biofilme) tenha sido numericamente maior no grupo do sorbitol, não foi atingida diferença estatisticamente significativa entre os grupos para este parâmetro. Os parâmetros proporcionais são considerados mais confiáveis nas análises microbiológicas porque minimizam possíveis distorções na pesagem de biofilme fresco, cujo peso é influenciado pela sua umidade. A proporção de SM nas amostras de biofilme é importante, uma vez que estes são os causadores primários de lesões iniciais de cárie em superfícies lisas (GEHRING et al., 1976). A ocorrência de *S. mutans* esteve relacionada à incidência de cárie dentária (GEHRING et al., 1974; SCHEININ; MÄKINEN; YLITALO, 1976) e a quantidade de SM no biofilme foi considerada como fator indicativo de atividade de cárie (KÖHLER; PETTERSSON; BRATTHALL, 1981) em alguns trabalhos, embora outros autores não tenham demonstrado correlação significativa entre a proporção de SM no biofilme e a % PDS *in situ* (TENUTA et al., 2003). É preciso considerar que, como foi mencionado anteriormente, o biofilme formado *in situ* pode se assemelhar mais ao biofilme de região interproximal ou mesmo de uma lesão cáriosa do que ao biofilme de uma superfície lisa, de maneira que outras bactérias bucais podem estar também envolvidas no seu potencial cariogênico. Investigações epidemiológicas e ecológicas adicionais neste campo podem ajudar a esclarecer esta correlação.

Em relação aos SM, a literatura já demonstrou claramente que este grupo bacteriano tem seu metabolismo e crescimento inibido pelo xilitol *in vitro*, através do estabelecimento de um “ciclo energético fútil”: ao entrar na célula via sistema frutose fosfotransferase fosfoenol piruvato (^Cfru-PTS), o xilitol é acumulado como xilitol-5-fosfato. Uma vez que esse metabólito não é utilizado pela célula de SM, ele acaba

sendo desfosforilado e expelido na forma de xilitol puro. Esse ciclo consome energia resultando, em última instância, em inibição do crescimento bacteriano. Por sua vez, o acúmulo intracelular do composto xilitol-5-fosfato inibe o metabolismo dos açúcares úteis, interrompendo a via glicolítica (glicólise) da bactéria logo nos primeiros estágios por inibir enzimas importantes neste processo (ASSEV; RÖLLA, 1986; HRIMECH et al., 2000; TRAHAN, 1995; TRAHAN et al., 1985; TRAHAN; NÉRON; BAREIL, 1991). Contudo, este “ciclo fútil” parece não ocorrer em presença de frutose ou sacarose (ASSEV; SCHEIE, 1986; MÜHLEMANN et al., 1977; TRAHAN; MOUTON, 1987; TRAHAN; NÉRON; BAREIL, 1991), uma vez que altas quantidades de frutose (seja pelo fornecimento direto deste monossacarídeo ou pela liberação de frutose a partir da hidrólise extracelular da sacarose) previnem a captação do xilitol para o interior da célula bacteriana por competir com este pelo mesmo sistema ^Cfru-PTS que dá preferência à captação de frutose (TRAHAN et al., 1985; TRAHAN; MOUTON, 1987; TRAHAN; NÉRON; BAREIL, 1991). *In vivo*, dependendo das condições e da natureza dos açúcares exógenos disponíveis, um “ciclo energético fútil” pode ou não ser estabelecido a partir do xilitol, resultando apenas na redução ou até na exaustão da energia celular (TRAHAN; NÉRON; BAREIL, 1991), e se refletindo em bactérias menos ativas metabolicamente e até mesmo em uma redução na proporção de SM no biofilme.

Enquanto os estudos clínicos mostram que o consumo regular de xilitol geralmente diminui os níveis e a proporção de SM no biofilme (ISOKANGAS et al., 1991; ISOTUPA et al., 1995; LOESCHE et al., 1984; MÄKINEN et al., 1989, 2002; SÖDERLING et al., 1989, 1997), indivíduos que consomem habitualmente quantidades consideráveis de sorbitol e pouco ou nenhum xilitol costumam exibir níveis aumentados destes microrganismos no biofilme (LOESCHE et al., 1984;

MÄKINEN et al. 2002; SÖDERLING et al. 1989). O efeito mutans-estimulador do sorbitol parece ser mais evidente quando o sorbitol é consumido em alta frequência entre as refeições, ou seja, em momentos sem disponibilidade de outros carboidratos, o que leva a indução das enzimas necessárias para metabolização do sorbitol pelos SM (LOESCHE et al., 1984). Em presença de outro carboidrato de fácil metabolização, os microrganismos geralmente não utilizam o sorbitol como fonte de energia (BOWEN, 1996; BROWN; WITTENBERGER, 1973; SLEE; TANZER, 1983).

É difícil distinguir entre um efeito de estimulação do sorbitol e um efeito de inibição do xilitol nos SM. Provavelmente os resultados deste experimento, assim como os dos demais trabalhos que comparam o efeito dos dois polióis, sejam consequência da combinação destes dois efeitos sobre SM. A alta frequência do uso da sacarose pode ter impedido a evidência de diferenças mais expressivas entre as contagens e porcentagens de SM no biofilme formado em presença de xilitol e de sorbitol no experimento de desmineralização, pois a presença deste dissacarídeo tem potencial para minimizar ao mesmo tempo o efeito mutans-redutor do xilitol e o efeito mutans-estimulador do sorbitol.

Em relação à contagem e porcentagem de LB no biofilme, não houve diferença entre os tratamentos (Tabela 5.23), resultado corroborado por alguns estudos clínicos que também não mostram efeito nem do xilitol nem do sorbitol sobre as proporções de LB no biofilme (BIRKHED et al., 1979; LOESCHE et al., 1984).

Neste estudo, o metabolismo das bactérias presentes no biofilme não foi diretamente testado, mas é possível que este tenha sido inibido em algum grau pela exposição ao xilitol através das pastilhas, o que pode ter influenciado na tendência deste biofilme de ser menos cariogênico. Se esta inibição metabólica realmente ocorreu, ela pode também estar relacionada à concentração significativamente

menor de PIC observada no biofilme exposto ao sorbitol em relação ao biofilme exposto ao xilitol no experimento de desmineralização (Figura 5.3). Alguns microrganismos da cavidade bucal têm a habilidade de sintetizar PIC do tipo glicogênio na presença de excesso de carboidratos exógenos como sacarose (BIRKHED et al., 1983). Ao contrário dos PEC insolúveis que desempenham uma função estrutural e dificilmente são quebrados para produção de energia (CURY et al., 2003), os PIC são facilmente metabolizados. Como as dosagens foram feitas cerca de dez horas após o último desafio cariogênico, é possível que as bactérias expostas ao sorbitol, estando mais ativas metabolicamente que as bactérias expostas ao xilitol, tenham consumido suas reservas energéticas intracelulares de glicogênio durante o período noturno de “fome”, produzindo ácidos. Foi sugerido que PIC podem contribuir para a desmineralização, prolongando a exposição das superfícies dentais a ácidos orgânicos e mantendo um pH baixo na matriz do biofilme durante períodos de restrição de carboidratos externos (CCAHUANA-VÁSQUEZ et al., 2007; TENUTA et al., 2006a).

Não houve diferença significativa entre os efeitos do sorbitol e do xilitol sobre a quantidade de PEC insolúvel no biofilme no experimento de desmineralização (Figura 5.3). Estas observações estão de acordo com os resultados do estudo *in vivo* de Mäkinen et al. (1985), mas a princípio parecem inconsistentes com os resultados dos estudos *in vitro*. Estudos *in vitro* (HRIMECH et al., 2000; JANDA; KURAMITSU, 1978; SHEMESH et al., 2006; SÖDERLING et al., 1987) sugerem que o xilitol possa ter efeito inibitório sobre a síntese de PEC insolúvel por *S. mutans* a partir da sacarose, possivelmente como resultado de uma inibição no metabolismo geral destas bactérias e de uma perturbação na síntese de proteínas relacionadas com a produção de polissacarídeos como as glicosiltransferases. Por sua vez, sorbitol

parece aumentar a síntese de enzimas glicosiltransferases e frutossiltransferases (SHEMESH et al., 2006), e a quantidade de PEC insolúvel produzida por *S. mutans* (SÖDERLING et al., 1987). Porém, não há consenso sobre esses resultados, uma vez que o sorbitol não afetou a capacidade de *S. mutans* de produzir glicosiltransferases extracelulares responsáveis pela síntese de PEC insolúveis no trabalho de Janda e Kuramitsu (1978), e que as quantidades de glucanos insolúveis produzidas por *S. mutans* a partir da sacarose não foram afetadas nem por xilitol nem por sorbitol no trabalho de Imai et al. (1984). Faz-se necessário ressaltar que estes estudos *in vitro* trabalharam com altas concentrações de sorbitol e de xilitol, em culturas puras de *S. mutans*, de maneira que ainda não se sabe qual a real importância dos efeitos relatados acima para um biofilme dental humano *in vivo*. PEC insolúveis podem ser produzidos por outras bactérias além de SM no biofilme dental. Outras espécies de estreptococos orais assim como algumas espécies de lactobacilos também produzem enzimas glicosiltransferases e polissacarídeos ricos em ligações glicosídicas 1-3, insolúveis em água (KRALJ et al., 2004). Thurnheer et al. (2006) observaram que cerca de 30% do PEC produzido por um biofilme dental supragengival típico se deve a outras espécies bacterianas não estreptococos, provavelmente a *Actinomyces naeslundii*, importante bactéria acidogênica do biofilme dental com conhecida capacidade de produzir polissacarídeos extracelulares de baixa solubilidade em água (ROSAN; HAMMOND, 1974). *Actinomyces naeslundii* ocuparam uma porcentagem considerável (10,4%) do total de microrganismos viáveis no biofilme formado *in situ* em presença de sacarose, durante 14 dias, em protocolo semelhante a este (RIBEIRO et al., 2005). Estas bactérias parecem ser menos eficientes que os estreptococos orais na habilidade de usar sorbitol como fonte de energia. Foi demonstrado, também, que o sorbitol inibe o

seu metabolismo de açúcar *in vitro* (TAKAHASHI; KALFAS; YAMADA, 1994). É possível que o sorbitol tenha algum efeito inibidor sobre a síntese de PEC destas bactérias, o que poderia compensar um também possível efeito inibidor do xilitol em outros grupos microbianos como SM. Porém, o efeito dos polióis sobre a produção de PEC no biofilme *in vivo* ainda precisa ser melhor esclarecido.

A concentração de PEC insolúvel não foi determinada em biofilme formado sem o consumo de pastilhas, desta maneira, o resultado de Mäkinen et al. (1985) de que biofilme formado após exposição ao xilitol possuía quantidades significativamente menores de PEC insolúvel em relação aos valores iniciais não pôde ser testado neste estudo. Embora as concentrações de PEC insolúvel, tanto no biofilme do grupo do xilitol quanto no biofilme do grupo do sorbitol, tenham sido menores do que as concentrações destes polissacarídeos verificadas no biofilme formado em presença de apenas sacarose em estudos prévios (AIRES et al., 2006; CCAHUANA-VÁSQUEZ et al., 2007; CURY et al., 2000, 2003; CURY; REBELLO; DEL BEL CURY, 1997; PECHARKI et al., 2005; RIBEIRO et al., 2005; TENUTA et al., 2006b), nenhuma conclusão pode ser tirada a respeito de um efeito dos polióis em diminuir as concentrações de PEC insolúvel no biofilme, pois comparações quantitativas entre diferentes estudos *in situ* não são válidas, uma vez que os voluntários não são os mesmos e há grande variação individual entre os eles.

Alguns autores observaram correlação estatisticamente significativa entre a quantidade de PEC insolúveis no biofilme e a % PDS do esmalte *in situ* (TENUTA et al., 2003) ou entre PEC insolúvel e cárie dentária na dentição decídua *in vivo* (NOBRE DOS SANTOS et al., 2002). O potencial cariogênico de um biofilme rico em PEC insolúvel foi demonstrado por vários estudos *in situ* (AIRES et al., 2006; CCAHUANA-VÁSQUEZ et al., 2007; CURY et al., 2000; CURY; REBELLO; DEL BEL

CURY, 1997; RIBEIRO et al., 2005). Dibdin e Shellis (1988) consideraram que biofilme dental com maior quantidade de PEC insolúveis seria mais cariogênico por apresentar porosidades na sua matriz extracelular que facilitariam a difusão de açúcares até a interface dente-biofilme, onde estes são fermentados em ácidos, provocando maiores quedas no pH (ZERO et al., 1992). Grandes quantidades de PEC insolúvel também aumentam a cariogenicidade por aumentar a adesão bacteriana. No entanto, adesão bacteriana pode não ser um fator importante quando se utilizam dispositivos nos quais blocos de esmalte são posicionados sob uma tela. Os dados sugerem que a concentração de PEC insolúvel no biofilme não esteve relacionada à desmineralização neste trabalho, uma vez que a diferença entre os grupos não atingiu significância estatística (Figuras 5.1 e 5.3).

A remineralização de lesões artificiais de cárie em esmalte ocorreu de forma semelhante com o uso de xilitol e de sorbitol em pastilhas (Figura 5.1). Estes resultados estão de acordo com a literatura disponível até agora, que não suporta um efeito terapêutico dos polióis em relação à cárie dentária. Estudos clínicos longitudinais sugerem que o consumo regular e por longos períodos de balas ou chicletes contendo xilitol possa promover a remineralização de lesões de cárie (HONKALA et al., 2006; KANDELMAN; GAGNON, 1987; SCHEININ et al., 1975). O uso de chiclete com xilitol demonstrou tendência de ser mais efetivo do que o uso de chiclete com sorbitol (MÄKINEN et al., 1995a). Porém, problemas metodológicos como falta de clareza quanto aos critérios de diagnóstico e ausência de controle adequado para o estímulo do fluxo salivar dificultam a avaliação da real participação dos polióis sobre as relatadas remineralizações destes estudos. Ausência de controle para o estímulo do fluxo salivar também impossibilita conclusões sobre o efeito dos polióis na remineralização a partir dos estudos *in situ* (CREANOR et al.,

1992; LEACH; LEE; EDGAR, 1989; SCHEININ et al., 1993). Os dois trabalhos que contaram com controles adequados, não evidenciaram nenhuma vantagem específica nem do sorbitol (MANNING; EDGAR; AGALAMANYI, 1992), nem do xilitol (SMITS; ARENTS, 1985; MANNING; EDGAR; AGALAMANYI, 1992) em favorecer a remineralização. Resultados controversos são obtidos pelos estudos *in vitro*. Mäkinen e Söderling (1984) relataram, com base em estudos de precipitação, que tanto xilitol quanto sorbitol retardam de maneira significativa a precipitação de fosfato de cálcio a partir de uma solução contendo os íons cálcio e fosfato, e apresentam habilidade de se ligarem ao cálcio em solução aquosa, formando complexos estáveis. Estes mecanismos foram usados para explicar comportamentos opostos do xilitol frente à remineralização *in vitro*. Miake et al. (2003) justificaram a maior remineralização nas camadas intermediárias e profundas de lesões cariosas observadas no seu estudo quando xilitol foi acrescentado à solução remineralizadora ao fato de este poliól agir como um carregador de cálcio, ou seja, facilitar a movimentação e o acesso de íons Ca^{2+} da solução remineralizadora para as regiões mais internas da lesão. Já Amaechi, Higham e Edgar (1999) explicaram os menores valores de remineralização obtidos no seu trabalho quando o xilitol foi adicionado à solução remineralizadora também através dos processos bioquímicos descritos por Mäkinen e Söderling (1984): a ligação do xilitol aos íons cálcio e fosfato formando compostos teria exaurido a solução circundante nestes íons, que são de fundamental importância na remineralização de lesões de cárie.

Xilitol e sorbitol se comportam de maneira semelhante em experimentos de remineralização provavelmente devido à natureza comum de poliól dos dois açúcares e ao efeito inespecífico de estimulação do fluxo salivar de seus veículos. O potencial remineralizador é determinado pela interação entre o dente e o ambiente

ao seu redor. O fator principal neste processo é a saturação da saliva e do biofilme em íons cálcio (GRON, 1973). Sais de cálcio existem em estado de equilíbrio dinâmico entre esmalte, saliva e biofilme e sua difusão em direção ou para fora do esmalte pode promover remineralização e desmineralização, respectivamente, por uma mudança nos gradientes de concentração (LOESCHE, 1985). Tanto o xilitol quanto o sorbitol parecem ter potencial para agir como moléculas fisicoquimicamente ativas, contribuindo para a estabilização de cálcio e fosfato na saliva e no biofilme e sendo capazes de trabalhar como carregadores destes íons (MÄKINEN; SÖDERLING, 1984). De fato, neste experimento de remineralização também não foram verificadas diferenças significantes entre as concentrações de Ca, P_i e F no biofilme formado quando os indivíduos estiveram expostos ao xilitol ou ao sorbitol (Figura 5.2). Como citado previamente, o desenho experimental usado nesta pesquisa não mediu os possíveis efeitos bioquímicos específicos dos polióis, uma vez que não foram feitas dosagens inorgânicas no biofilme formado na ausência destes açúcares, mas também não exclui a possibilidade da ocorrência destes efeitos, principalmente para concentrações maiores dos polióis. Embora estes e outros efeitos químicos possam estar envolvidos, o conhecimento atual suporta, sobretudo, um efeito microbiológico do xilitol. Os efeitos microbiológicos são mais fáceis de serem entendidos, descritos e demonstrados do que os efeitos chamados de bioquímicos. Uma pequena dose de xilitol pode ser suficiente para afetar o crescimento de SM e, entretanto, não provocar mudanças bioquímicas significativas. Alterações bioquímicas ficam mais evidentes com o aumento da dose de xilitol.

No experimento de remineralização, chupar pastilhas com xilitol afetou significativamente quase todas as variáveis microbiológicas, com exceção das porcentagens de LB no biofilme (Tabela 5.23). As contagens de SM e LB, assim

como as porcentagens de SM em relação ao total de microrganismos e ao total de estreptococos, foram reduzidas no biofilme formado em presença de xilitol quando comparado ao biofilme exposto ao sorbitol. É interessante notar que o efeito antibacteriano do xilitol foi mais evidente, inclusive se estendendo aos LB, no biofilme formado em ausência de sacarose, ou em presença de pequenas quantidades de sacarose proveniente de resíduos deste dissacarídeo remanescente na saliva dos voluntários após a ingestão de alimentos, situação que favorece o estabelecimento de um “ciclo energético fútil” nas células bacterianas a partir do xilitol. Há relatos de que um “ciclo energético fútil” a partir do xilitol, semelhante ao observado para SM, possa ocorrer também em *Lactobacillus casei* (HAUSMAN; THOMPSON; LONDON, 1984). Por outro lado, em ausência de sacarose, a maior parte das cepas de *S. Mutans*, assim como de *Lactobacillus casei*, são capazes de fermentar facilmente o sorbitol para obtenção de energia (VADEBONCOEUR; PELLETIER, 1997). Embora nos estudos de Birkhed et al. (1979) e Loesche et al. (1984) nem o xilitol nem o sorbitol tenham demonstrado efeito sobre as proporções de LB no biofilme, Wennerholm et al. (1994) observaram quantidades maiores de LB no biofilme quando os voluntários usaram chicletes com sorbitol em relação ao uso de chicletes com xilitol, porém sem diferença estatisticamente significativa.

Comparar os efeitos de pastilhas contendo xilitol sobre as bactérias do biofilme em ausência e em presença de sacarose (Tabela 5.23) sugere um questionamento sobre a indicação de produtos contendo xilitol após as refeições e lanches açucarados. Esta indicação se baseia nos efeitos benéficos de um aumento no fluxo salivar logo após os desafios cariogênicos. Entretanto, o consumo destes produtos nos intervalos de refeições e lanches talvez possa potencializar os efeitos antibacterianos do xilitol, sendo mais interessante na prevenção da cárie dentária.

A ausência de diferença entre os valores de % GDS dos dois grupos sugere que a capacidade do xilitol de inibir significativamente as contagens de SM e LB, assim como as porcentagens de SM no biofilme, não tenha relevância com respeito à remineralização em um período curto de tempo (Figura 5.1, Tabela 5.23). O presente estudo não exclui uma possível influência do xilitol sobre a remineralização em consequência de um efeito antimicrobiano quando os produtos contendo xilitol são usados por longos períodos.

De maneira semelhante ao observado para PEC insolúvel no experimento de desmineralização, as concentrações de PEC insolúvel e de PIC no biofilme não foram influenciadas de maneira significativa pelo açúcar das pastilhas no experimento de remineralização (Figura 5.3).

Por todos os resultados expostos, pode-se considerar que talvez o sorbitol não seja o controle ideal para estudos que pretendem investigar os efeitos do xilitol sobre o substrato e o biofilme dental. Substâncias mais inertes em relação aos processos des-re e ao biofilme, de outra natureza que não poliól, e com maior poder adoçante (o que possibilitaria a sua utilização em quantidades mínimas) como os adoçantes utilizados no chiclete placebo do estudo de Machiulskiene, Nyvad e Baelum (2001) parecem mais adequadas. Contudo, a produção de pastilhas-controle exclusivamente com estes adoçantes é dificultada pelo fato de que, para estes produtos, o poliól (xilitol ou sorbitol) tem função não apenas de adoçante, mas também de umectante, sendo responsável pela consistência final das pastilhas.

No presente estudo, optou-se por utilizar pastilhas como veículo para o xilitol uma vez que já foi demonstrado que estas são tão efetivas na prevenção de cárie quanto chicletes contendo xilitol (ALANEN; ISOKANGAS; GUTMANN, 2000) e, no entanto, são consideradas mais inofensivas para um público infantil. O ato de

mascar chicletes é dificultado pela presença de poucos dentes, gera resíduo ambiental, trás preocupações quanto ao esforço mastigatório excessivo imposto à articulação têmporo-mandibular, além ser um hábito inaceitável em certas sociedades e situações.

Por fim, os resultados estão de acordo com o que se poderia esperar de ação do xilitol nos processos de desmineralização e remineralização dental com base nos conhecimentos atuais: um efeito indireto por agir sobre a ecologia bacteriana do biofilme. Ao reduzir especificamente as contagens de importantes grupos de microrganismos cariogênicos como SM e LB, assim como as porcentagens de SM, no biofilme, o xilitol estaria suprimindo a etapa desmineralização do ciclo des-re que ocorre constantemente *in vivo* e, conseqüentemente, favorecendo a remineralização em longo prazo. Porém, o período de 14 dias não foi suficiente para evidenciar estes efeitos, principalmente em relação à remineralização. Sabe-se que o processo de remineralização *in vivo* é complexo, sendo por volta de três a quatro vezes mais lento que o processo de desmineralização (ARENDS et al., 1984).

Uma vez que o efeito do xilitol em pastilhas sobre os processos de desmineralização e remineralização ainda não havia sido testado através de um delineamento experimental adequado, optou-se por trabalhar na ausência de dentifrício fluoretado. Os fluoretos são os agentes mais efetivos na prevenção da cárie dentária nos dias atuais, diminuindo drasticamente a desmineralização do esmalte e ainda aumentando a remineralização. Estudo prévio demonstrou que os fluoretos são cerca de nove vezes mais efetivos que o xilitol em diminuir a desmineralização do esmalte *in vitro*, mas que os dois agentes apresentam mecanismos de ação diversos, podendo ter efeito aditivo (ARENDS et al., 1990). Desta forma, se a tendência demonstrada por pastilhas contendo xilitol de diminuir a

desmineralização do esmalte se confirmar em períodos experimentais mais longos, seria interessante testar o produto também em presença de dentifrício fluoretado, o que corresponde à realidade da maioria da população, para saber se o xilitol em pastilhas representaria alguma vantagem ao uso de fluoretos em dentifrício, que, por si só, é reconhecidamente um bom método preventivo de cárie dentária.

7 CONCLUSÕES

O uso de pastilhas com xilitol por curtos períodos de tempo não apresentou vantagem efetiva nem em diminuir a desmineralização, nem em favorecer a remineralização do esmalte em comparação ao uso de pastilhas com sorbitol.

A composição inorgânica e a concentração de polissacarídeos extracelulares insolúveis do biofilme dental, formado na presença ou na ausência de sacarose, foram semelhantes quando o biofilme foi exposto a pastilhas com xilitol ou com sorbitol.

O uso por períodos curtos de tempo de pastilhas com alta concentração de xilitol alterou a ecologia bacteriana do biofilme, reduzindo as contagens e as porcentagens de estreptococos do grupo mutans em relação ao uso de pastilhas com alta concentração de sorbitol.

O efeito antibacteriano do xilitol foi mais evidente em ausência de sacarose, situação na qual o poliól foi capaz de reduzir também as contagens de lactobacilos no biofilme.

Bactérias expostas ao sorbitol demonstraram menores concentrações de polissacarídeos intracelulares de reserva após períodos (cerca de 10 horas) de restrição de carboidratos externos (sacarose) do que bactérias expostas ao xilitol.

REFERÊNCIAS¹

- 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, Tenuta LMA, Del Bel Cury AA, Koo H, Cury JA. An approach to extracting polysaccharides from mutans streptococci biofilms and in situ biofilm [abstract 44]. *Caries Res* 2007;41(4):283-4.
- Alanen P, Isokangas P, Gutmann K. Xylitol candies in caries prevention: Results of a field study in Estonian children. *Community Dent Oral Epidemiol* 2000;28(3):218-24.
- Amaechi BT, Higham SM, Edgar WM. Caries inhibition and remineralizing effect of xylitol in vitro. *J Oral Sci* 1999;41(2):71-6.
- Arends J, Christoffersen J, Schuthof J, Smits MT. Influence of xylitol on demineralization of enamel. *Caries Res* 1984;18(4):296-301.
- Arends J, Smits MT, Ruben JL, Christoffersen J. Combined effect of xylitol and fluoride on enamel demineralization in vitro. *Caries Res* 1990;24(4):256-7.
- Assev S, Röllä G. Sorbitol increases the growth inhibition of xylitol on *Streptococcus mutans* OMZ 176. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand Sect B* 1986;94(4):231-7.
- Assev S, Scheie AA. Xylitol metabolism in xylitol-sensitive and xylitol-resistant strains of streptococci. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand Sect B* 1986;94(4):239-43.
- Assev S, Stig S, Scheie AA. Cariogenic traits in xylitol-resistant and xylitol-sensitive mutans streptococci. *Oral Microbiol Immunol* 2002;17(2):95-9.
- Assev S, Vegarud G, Röllä G. Growth inhibition of *Streptococcus mutans* strains OZM 176 by xylitol. *Acta Pathol Microbiol Scand Sect B* 1980;88(1):61-3.
- Bánóczy J, Hadas E, Esztáry I, Marosi I, Nemes J. Three-year results with sorbitol in clinical longitudinal experiments. *J Int Assoc Dent Child* 1981;12(2):59-63.
- Birkhed D, Edwardsson S, Ahlén ML, Frostell G. Effects of 3 months frequent consumption of hydrogenated starch hydrolysate (Lycasin[®]), maltitol, sorbitol and xylitol on human dental plaque. *Acta Odontol Scand* 1979;37(2):103-15.
- Birkhed D, Edwardsson S, Wikesjö U, Ahlén M-L, Ainamo J. Effect of 4 days consumption of chewing gum containing sorbitol or a mixture of sorbitol and xylitol on a dental plaque and saliva. *Caries Res* 1983;17(1):76-88.

¹ De acordo com Estilo Vancouver. Abreviatura de periódicos segundo base de dados MEDLINE.

Bowen WH. Clinical relevance of adaptation to sorbitol by plaque bacteria: a review. J Clin Dent 1996;7(1):1-5.

Brown AT, Wittenberger CL. Mannitol and sorbitol catabolism in *Streptococcus mutans*. Arch Oral Biol 1973;18(1):117-26.

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

Creanor SL, Strang R, Gilmour WH, Foye RH, Brown J, Geddes DAM, et al. The effect of chewing gum use on *in situ* enamel lesion remineralisation. J Dent Res 1992;71(12):1895-900.

Cury JA, Hashizume LN, Del Bel Cury AA, Tabchoury CPM. Effect of dentifrice containing fluoride and/or baking soda on enamel demineralization / remineralization: an *in situ* study. Caries Res 2001a;35(2):106-10.

Cury JA, Francisco SB, Del Bel Cury AA, Tabchoury CPM. *In situ* study of sucrose exposure, mutans streptococci in dental plaque and dental caries. Braz Dent J 2001b;12(2):101-4.

Cury JA, Marques AS, Tabchoury CPM, Del Bel Cury AA. Composition of dental plaque formed in the presence of sucrose and after its interruption. Braz Dent J 2003;14(3):147-52.

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

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

Cury JA, Simões GS, Del Bel Cury AA, Gonçalves NC, Tabchoury CPM. Effect of a calcium carbonate-based dentifrice on *in situ* enamel remineralization. Caries Res 2005;39(3):255-7.

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

Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal Chem 1956;28(3):350-6.

Fiske CM, Subbarow Y. The colorimetric determination of phosphorus. J Biol Chem 1925;66(2):375-400.

Gauthier L, Vadeboncoeur C, Mayrand D. Loss of sensibility to xylitol by *Streptococcus mutans* LG-1. Caries Res 1984;18(4):289-95.

Gehring F, Mäkinen KK, Larmas M, Scheinin A. Turku sugar studies. IV. An intermediate report on the differentiation of polysaccharide-forming streptococci (*S. mutans*). *Acta Odontol Scand* 1974;32(6):436-44.

Gehring F, Mäkinen KK, Larmas M, Scheinin A. Turku sugar studies. X. Occurrence of polysaccharide-forming streptococci and ability of the mixed plaque microbiota to ferment various carbohydrates. *Acta Odontol Scand* 1976;34(6):329-43.

Gold OG, Jordan HV, van Houte J. A selective medium for *Streptococcus mutans*. *Archs Oral Biol* 1973;18(11):1357-64.

Gonçalves NCLA, Del Bel Cury AA, Simões GS, Hara AT, Rosalen PL, Cury JA. Effect of xylitol: sorbitol on fluoride enamel demineralization reduction in situ. *J Dent* 2006;34(9):662-7.

Grizzle JE. The two period change-over design and its use in clinical trials. *Biometrics* 1965;21:467-80.

Gron P. Saturation of human saliva with calcium phosphates. *Arch Oral Biol* 1973;18(11):1385-92.

Hausman SZ, Thompson J, London J. Futile xylitol cycle in *Lactobacillus casei*. *J Bacteriol* 1984;160(1):211-5.

Havenaar R, Huis in't Veld JHJ, Stoppelaar JD, Backer Dirks O. Anti-cariogenic and remineralizing properties of xylitol in combination with sucrose in rats inoculated with *Streptococcus mutans*. *Caries Res* 1984;18(3):269-77.

Hicks J, Garcia-Godoy F, Flaitz C. Biological factors in dental caries: role of saliva and dental plaque in the dynamic process of demineralization and remineralization (part 1). *J Clin Pediatr Dent* 2003;28(1):47-52.

Honkala E, Honkala S, Shyama M, Al-Mutawa SA. Field trial on caries prevention with xylitol candies among disabled school students. *Caries Res* 2006;40(6):508-13.

Hrimech M, Mayrand D, Grenier D, Trahan L. Xylitol disturbs protein synthesis, including the expression of HSP-70 and HSP-60, in *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol Immunol* 2000;15(4):249-57.

Hujoel PP, Mäkinen KK, Bennett CA, Isotupa KP, Isokangas PJ, Allen P, et al. The optimum time to initiate habitual xylitol gum-chewing for obtaining long-term caries prevention. *J Dent Res* 1999;78(3):797-803.

Igarashi K, Lee IK, Schachtele CF. Comparison of in vivo human dental plaque pH changes within artificial fissures and at interproximal sites. *Caries Res* 1989;23(6):417-22.

Imai S, Takeuchi K, Shibata K, Yoshikawa S, Kitahata S, Okada S, et al. Screening of sugar inhibitory against sucrose-dependent synthesis and adherence of insoluble

glucan and acid production by *Streptococcus mutans*. J Dent Res 1984;63(11):1293-7.

Isokangas P, Mäkinen KK, Tiekso J, Alanen P. Long-term effect of xylitol chewing gum in the prevention of dental caries: A follow-up 5 years after termination of a prevention program. Caries Res 1993;27(6):495-8.

Isokangas P, Söderling E, Pienihäkkinen K, Alanen P. Occurrence of dental decay in children after maternal consumption of xylitol chewing gum, a follow-up from 0 to 5 years of age. J Dent Res 2000;79(11):1885-9.

Isokangas P, Tenovuo J, Söderling E, Männistö H, Mäkinen KK. Dental caries and mutans streptococci in the proximal areas of molars affected by habitual use of xylitol chewing gum. Caries Res 1991;25(6):444-8.

Isokangas P, Tiekso J, Alanen P. Xylitol chewing gum in caries prevention: A field study in children. J Am Dent Assoc 1988;117(2):315-22.

Isotupa KP, Gunn S, Chen C-Y, Lopatin D, Mäkinen KK. Effect of polyol gums on dental plaque in orthodontic patients. Am J Orthod Dentofacial Orthop 1995;107(5):497-504.

Janda WM, Kuramitsu HK. Production of extracellular and cell-associated glucosyltransferase activity by *Streptococcus mutans* during growth on various carbon sources. Infect Immun 1978;19(1):116-22.

Kandelman D, Gagnon G. Clinical results after 12 months from a study of the incidence and the progression of dental caries in relation to consumption of chewing-gum containing xylitol in school preventive programs. J Dent Res 1987;66(8):1407-11.

Kandelman D, Gagnon G. A 24-month clinical study of the incidence and progression of dental caries in relation to consumption of chewing gum containing xylitol in school preventive programs. J Dent Res 1990;69(11):1771-5.

Kashket S, Yaskell T, Lopez LR. Prevention of sucrose-induced demineralization of tooth enamel by chewing sorbitol gum. J Dent Res 1989;68(3):460-2.

Knuuttila MLE, Mäkinen KK. Effect of xylitol on the growth and metabolism of *Streptococcus mutans*. Caries Res 1975;9(2):177-89.

Knuuttila MLE, Mäkinen KK. Extracellular hydrolase activity of the cells of the oral bacterium *Streptococcus mutans* isolated from man and grown on glucose or xylitol. Arch Oral Biol 1981;26(11):899-904.

Köhler B, Bratthall D. Practical method to facilitate estimation of *Streptococcus mutans* levels in saliva. J Clin Microbiol 1979;9(5):584-8.

Köhler B, Pettersson B-M, Bratthall D. *Streptococcus mutans* in plaque and saliva and the development of caries. Scand J Dent Res 1981;89(1):19-25.

Koulourides T, Bodden R, Keller S, Manson-Hing L, Lastra J, Housch T. Cariogenicity of nine sugars tested with an intraoral device in man. *Caries Res* 1976;10(6):427-41.

Kralj S, van Geel-Schutten GH, Dondorff MMG, Kirsanovs S, van der Maarel MJEC, Dijkhuizen L. Glucan synthesis in the genus *Lactobacillus*: isolation and characterization of glucansucrase genes, enzymes and glucan products from six different strains. *Microbiology* 2004;150(11):3681-90.

Leach SA, Lee GTR, Edgar WM. Remineralization of artificial caries-like lesions in human enamel *in situ* by chewing sorbitol gum. *J Dent Res* 1989;68(6):1064-8.

Loesche WJ. The rationale for caries prevention through the use of sugar substitutes. *Int Dent J* 1985;35(1):1-8.

Loesche WJ, Grossman NS, Earnest R, Corpron R. The effect of chewing xylitol gum on the plaque and saliva level of *Streptococcus mutans*. *J Am Dent Assoc* 1984;108(4):587-92.

Loesche WJ, Syed SA. The predominant cultivable flora of carious plaque and carious dentine. *Caries Res* 1973;7(3):201-16.

Machiulskiene V, Nyvad B, Baelum V. Caries preventive effect of sugar-substituted chewing gum. *Community Dent Oral Epidemiol* 2001;29(4):278-88.

Mäkinen KK. New biochemical aspects of sweeteners. *Int Dent J* 1985;35(1):23-35.

Mäkinen KK, Mäkinen P-L, Pape Jr HR, Allen P, Bennett C, Iskoangas PJ, et al. Stabilizations of rampant caries: polyol gums and arrest of dentine caries in two long-term cohort studies in young subjects. *Int Dent J* 1995a;45(1):93-107.

Mäkinen KK, Bennett CA, Hujoel PP, Isokangas PJ, Isotupa KP, Pape HR, et al. Xylitol chewing gums and caries rates: A 40-month cohort study. *J Dent Res* 1995b;74(12):1904-13.

Mäkinen KK, Hujoel PP, Bennett CA, Isotupa KP, Mäkinen P-L, Allen P. Polyol chewing gums and caries rates in primary dentition: A 24-month cohort study. *Caries Res* 1996;30(6):408-17.

Mäkinen KK, Isotupa KP, Kivilompolo T, Mäkinen P-L, Murtomaa S, Petäjä J, et al. The effect of polyol-combinant saliva stimulants on *S. mutans* levels in plaque and saliva of patients with mental retardation. *Spec Care Dentist* 2002;22(5):187-93.

Mäkinen KK, Scheinin AS. Xylitol and dental caries. *Ann Rev Nutr* 1982;2:133-50.

Mäkinen KK, Söderling E. Solubility of calcium salts, enamel, and hydroxyapatite in aqueous solution of simple carbohydrates. *Calcif Tissue Int* 1984;36(1):64-71.

Mäkinen KK, Söderling E, Hurttia H, Lehtonem OP, Luukkala E. Biochemical, microbiologic and clinical comparisons between two dentifrices that contain different mixtures of sugar alcohols. *J Am Dent Assoc* 1985;111(5):745-51.

Mäkinen KK, Söderling E, Isokangas P, Tenovuo J, Tiekso J. Oral biochemical status and depression of *Streptococcus mutans* in children during 24- to 36-month use of xylitol chewing gum. *Caries Res* 1989;23(4):261-7.

Manning RH, Edgar WM, Agalamanyi EA. Effects of chewing gums sweetened with sorbitol or a sorbitol/xylitol mixture on the remineralisation of human enamel lesions in situ. *Caries Res* 1992;26(2):104-9.

Margolis HC, Moreno EC. Composition of pooled plaque fluid from caries-free and caries-positive individuals following sucrose exposure [published erratum appears in *J Dent Res* 1993;72(1):87]. *J Dent Res* 1992;71(11):1776-84

Marsh PD. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res* 1994;8(2):263-71.

Miake Y, Saeki Y, Takahashi M, Yanagisawa T. Remineralization effects of xylitol on demineralized enamel. *J Electron Microscopy* 2003;52(5):471-6.

Minah GE, Lovekin GB, Finney JP. Sucrose-induced ecological response of experimental dental plaques from caries-free and caries-susceptible human volunteers. *Infect Immun* 1981;34(3):662-75.

Moreno EC, Zahradnik RT. Chemistry of enamel subsurface demineralization in vitro. *J Dent Res* 1974;53(2):226-35.

Mouton C, Scheinin A, Mäkinen KK. Effect of a xylitol chewing gum on plaque quantity and quality. *Acta Odontol Scand* 1975a;33(5):251-7.

Mouton C, Scheinin A, Mäkinen KK. Effect on plaque of a xylitol-containing chewing-gum: A clinical and biochemical study. *Acta Odontol Scand* 1975b;33(1):33-40.

Mouton C, Scheinin A, Mäkinen KK. Effect on plaque of a xylitol-containing chewing-gum: A pilot study. *Acta Odontol Scand* 1975c;33(1):27-31.

Möller AJR. Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth. *Methodological Studies. Odontol Tidskr* 1966;74(5):Suppl:371-80.

Möller IJ, Poulsen S. The effect of sorbitol-containing chewing gum on the incidence of dental caries, plaque and gingivitis in Danish schoolchildren. *Community Dent Oral Epidemiol* 1973;1(2):58-67.

Mühlemann HR, Schmid R, Noguchi T, Imfeld T, Hirsch RS. Some dental effects of xylitol under laboratory and *in vivo* conditions. *Caries Res* 1977;11(11):263-76.

Nobre dos Santos M, Melo dos Santos L, Francisco SB, Cury JA. Relationship among dental plaque composition, daily sugar exposure and caries in primary dentition. *Caries Res* 2002;36(5):347-52.

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 CM, Bedi G, Cury JA. The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation: New insight. *J Dent Res* 2006;85(10):878-87.

Pecharki GD, Cury JA, Paes Leme AF, Tabchoury CPM, Del Bel Cury AA, Rosalen PL, et al. Effect of sucrose containing iron (II) on dental biofilm and enamel demineralization in situ. *Caries Res* 2005;39(2):123-9.

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(1):44-50.

Rosan B, Hammond BF. Extracellular polysaccharides of *Actinomyces viscosus*. *Infect Immun* 1974;10(2):304-8.

Rølla G. Why is sucrose so cariogenic? The role of glucosyltransferase and polysaccharides. *Scand J Dent Res* 1989;97(2):115-9.

Sato Y, Yamamoto Y, Kizaki H. Xylitol-induced elevated expression of the *gfpC* gene in a population of *Streptococcus mutans* cells. *Eur J Oral Sci* 2000;108(6):538-45.

Scheinin A, Mäkinen KK, Tammisalo E, Rekola M. Turku sugar studies. XVIII. Incidence of dental caries in relation to 1-year consumption of xylitol chewing gum. *Acta Odontol Scand* 1975;33(5):269-78.

Scheinin A, Mäkinen KK, Ylitalo K. Turku sugar studies. V. Final report on the effect of sucrose, fructose and xylitol diets on caries incidence in man. *Acta Odontol Scand* 1976;34(4):179-216.

Scheinin A, Pienihäkkinen K, Tiekso J, Bánóczy J, Szöke J, Esztári I, et al. Collaborative WHO xylitol field studies in Hungary. VII. Two-year caries incidence in 976 institutionalized children. *Acta Odontol Scand* 1985;43(6):381-7.

Scheinin A, Söderling E, Scheinin U, Glass RL, Kallio M-L. Xylitol-induced changes of enamel microhardness paralleled by microradiographic observations. *Acta Odontol Scand* 1993;51(4):241-6.

Shemesh M, Tam A, Feldman M, Steinberg D. Differential expression profiles of *Streptococcus mutans* *ftf*, *gtf* and *vicR* genes in the presence of dietary carbohydrates at early and late exponential growth phases. *Carbohydrate Res* 2006;341(12):2090-7.

Slack GL, Millward E, Martin WJ. The effect of tablets stimulating salivary flow on the incidence of dental caries: A two-year clinical trial. *Br Dent J* 1964;116(3):105-8.

Slee AM, Tanzer JM. The repressible metabolism of sorbitol (D-Glucitol) by intact cells of the oral plaque-forming bacterium *Streptococcus mutans*. Arch Oral Biol 1983;28(9):839-45.

Smits MT, Arends J. Influence of xylitol- and/or fluoride-containing toothpastes on the remineralization of surface softened enamel defects in vivo. Caries Res 1985;19(6):528-35.

Smits MT, Arends J. Influence of extraoral xylitol and sucrose dippings on enamel demineralization in vivo. Caries Res 1988;22(3):160-5.

Söderling E, Alaräisänen L, Sheinin A, Mäkinen KK. Effect of xylitol and sorbitol on polysaccharide production by and adhesive properties of *Streptococcus mutans*. Caries Res 1987;21(2):109-16.

Söderling E, Isokangas P, Pienihäkkinen K, Tenovuo J, Alanen P. Influence of maternal xylitol consumption on mother-child transmission of mutans streptococci: 6-year follow-up. Caries Res 2001;35(3):173-7.

Söderling E, Mäkinen KK, Chen CY, Pape-Jr HR, Loesche W, Mäkinen PL. Effect of sorbitol, xylitol and xylitol / sorbitol chewing gums on dental plaque. Caries Res 1989;23(5):378-84.

Söderling E, Trahan L, Tammiala-Salonen T, Häkkinen L. Effects of xylitol, xylitol-sorbitol, and placebo chewing gums on the plaque of habitual xylitol consumers. Eur J Oral Sci 1997;105(2):170-7.

Steinberg LM, Odusola F, Mandel ID. Remineralizing potential, antiplaque and anti-gingivitis effects of xylitol and sorbitol sweetened chewing gum. Clin Prev Dent 1992;14(5):31-4.

Takahashi-Abbe S, Abbe K, Takahashi N, Tamazawa Y, Yamada T. Inhibitory effect of sorbitol on sugar metabolism of *Streptococcus mutans* in vitro and on acid production in dental plaque in vivo. Oral Microbiol Immunol 2001;16(2):94-9.

Takahashi N, Kalfas S, Yamada T. The role of the succinate pathway in sorbitol fermentation by oral *Actinomyces viscosus* and *Actinomyces naeslundii*. Oral Microbiol Immunol 1994;9(4):218-23.

Tanzer JM, Thompson A, Wen ZT, Burne RA. *Streptococcus mutans*: Fructose transport, xilitol resistance, and virulence. J Dent Res 2006;85(4):369-73.

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

Tenuta LMA, Ricomini Filho AP, Del Bel Cury AA, Cury JA. Effect of sucrose on the selection of mutans streptococci and lactobacilli in dental biofilm formed in situ. Caries Res 2006b;40(6):546-9.

Tenuta LMA, Lima JEO, Cardoso CL, Tabchoury CPM, Cury JA. Effect of plaque accumulation and salivary factors on enamel demineralization and plaque composition in situ. *Pesqui Odontol Bras* 2003;17(4):326-31.

Thurnheer T, van der Ploeg JR, Giertsen E, Guggenheim B. Effects of *Streptococcus mutans* *gtfC* deficiency on mixed oral biofilms in vitro. *Caries Res* 2006;40(2):163-71.

Trahan L. Xylitol: a review of its action on mutans streptococci and dental plaque – its clinical significance. *Int Dent J* 1995;45(1):77-92.

Trahan L, Bareil M, Gauthier L, Vadeboncoeur C. Transport and phosphorylation of xylitol by a fructose phosphotransferase system in *Streptococcus mutans*. *Caries Res* 1985;19(1):53-63.

Trahan L, Bourgeau G, Breton R. Emergence of multiple xylitol-resistant (fructose PTS⁻) mutants from human isolates of mutans streptococci during growth on dietary sugars in the presence of xylitol. *J Dent Res* 1996;75(11):1892-900.

Trahan L, Mouton C. Selection for *Streptococcus mutans* with an altered xylitol transport capacity in chronic xylitol consumers. *J Dent Res* 1987;66(5):982-8.

Trahan L, Néron S, Bareil M. Intracellular xylitol-phosphate hydrolysis and efflux of xylitol in *Streptococcus sobrinus*. *Oral Microbiol Immunol* 1991;6(1):41-50.

Trahan L, Söderling E, Dréan M-F, Chevrier M-C, Isokangas P. Effect of xylitol consumption on the plaque-saliva distribution of mutans streptococci and the occurrence and long-term survival of xylitol-resistant strains. *J Dent Res* 1992;71(11):1785-91.

Trindade CP. Efeito do uso de goma de mascar contendo xilitol sobre os níveis salivares de Estreptococos do grupo mutans, sobre os genótipos de *S. mutans* e sobre a presença de amostras xilitol-tolerantes na saliva [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2005.

Vadeboncoeur C, Pelletier M. The phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system of oral streptococci and its role in the control of sugar metabolism. *FEMS Microbiol Rev* 1997;19(3):187-207.

Vadeboncoeur C, Trahan L, Mouton C, Mayrand D. Effect of xylitol on the growth and glycolysis of acidogenic oral bacteria. *J Dent Res* 1983;62(8):882-4.

Van Loveren C. Sugar alcohols: What is the evidence for caries-preventive and caries-therapeutic effects? *Caries Res* 2004;38(3):286-93.

Vogel GL, Carey CM, Chow LC, Tatevossian A. Microanalysis of plaque fluid from single-site fasted plaque. *J Dent Res* 1990;69(6):1316-23.

Wennerholm K, Arends J, Birkhed D, Ruben J, Emilson CG, Dijkman AG. Effect of xylitol and sorbitol in chewing-gums on mutans streptococci, plaque pH and mineral loss of enamel. *Caries Res* 1994;28(1):48-54.

Wolff JB, Kaplan NO. Hexitol metabolism in *Escherichia coli*. J Bacteriol 1956;71(5):557-64.

Wunder D, Bowen WH. Action of agents on glucosyltransferases from *Streptococcus mutans* in solution and adsorbed to experimental pellicle. Arch Oral Biol 1999;44(3):203-14.

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

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO*

Título da Pesquisa

“Efeito do xilitol em pastilhas na composição do biofilme dental e na desmineralização e remineralização do esmalte”

Justificativa e Objetivo da Pesquisa

Apesar dos conhecimentos já existentes sobre o xilitol, estamos longe de entender completamente suas múltiplas influências sobre um complexo ecossistema como o biofilme dental e sobre os também complexos fenômenos de perda e ganho mineral do esmalte. Ainda há necessidade de maiores esclarecimentos a respeito dos mecanismos de ação do xilitol em relação à doença cárie, principalmente diante de um adequado controle para o estímulo do fluxo salivar. O objetivo do presente estudo é determinar o efeito de altas concentrações de xilitol administrado na forma de pastilhas na composição microbiana e bioquímica do biofilme dental e nos processos de desmineralização e remineralização do esmalte, comparado a um controle com pastilhas contendo sorbitol.

Procedimentos

Este estudo será realizado utilizando-se um modelo intrabucal de longa duração, do tipo cruzado e duplo-cego. Os voluntários utilizarão, em duas fases experimentais de 14 dias, dispositivos palatinos contendo seis blocos de esmalte humano, sendo três blocos de esmalte hígido para avaliação da desmineralização e mais três blocos de

* Os voluntários foram selecionados entre alunos dos cursos de Graduação e Pós-Graduação da FO-USP, assim, os termos técnicos foram mantidos por acreditarmos serem de fácil entendimento para os mesmos.

esmalte previamente desmineralizado *in vitro* para avaliação da remineralização. Sobre os blocos de esmalte hígido, será gotejada solução de sacarose a 20%, oito vezes ao dia, para indução de desafio cariogênico. Os blocos previamente desmineralizados não deverão ser expostos à sacarose. Os voluntários serão aleatoriamente alocados por sorteio simples em um dos grupos (teste ou controle) e, após o cumprimento da primeira fase, os grupos serão invertidos. Na fase em que estiverem participando do grupo teste, os voluntários chuparão minipastilhas contendo xilitol e aspartame (Smint[®], Chupa Chups S.A., Barcelona, Espanha) cinco minutos após cada gotejamento de sacarose sobre os blocos hígidos do aparelho. No grupo controle, cinco minutos após cada gotejamento de sacarose, os voluntários chuparão minipastilhas contendo sorbitol e aspartame. A utilização das pastilhas teste ou controle oito vezes ao dia se iniciará uma semana antes da respectiva fase experimental, quando ainda nenhum dispositivo palatino estará presente na boca. Durante todo o experimento e na semana que preceder cada uma de suas fases, os voluntários escovarão seus dentes naturais normalmente, fazendo uso de dentifrício sem flúor, que lhes será fornecido gratuitamente. Ao final de cada fase experimental, o biofilme dental formado sobre os blocos de esmalte será coletado e os fragmentos de esmalte serão removidos do dispositivo para análise. Um novo dispositivo acrílico palatino será construído para cada voluntário em cada fase.

Desconfortos e Riscos

Será feito uso de solução de sacarose, não implicando em qualquer aumento do risco de cárie dentária aos voluntários, pois os mesmos estarão com os dentes naturais escovados e a sacarose só é cariogênica na presença de biofilme. O dispositivo intrabucal pode causar um leve desconforto, que é, entretanto, semelhante ao desconforto causado por um aparelho ortodôntico móvel. Os

voluntários utilizarão, antes e durante cada fase da pesquisa, dentifrício não fluoretado, o que não trará nenhum prejuízo para sua saúde bucal por se tratarem de Cirurgiões-dentistas esclarecidos em relação ao controle da cárie dentária e que estarão fazendo uso de água fluoretada.

Forma de acompanhamento e assistência

Os pesquisadores envolvidos na pesquisa estarão à disposição dos voluntários para ajuste no aparelho intrabucal a fim de minimizar qualquer desconforto.

Garantia de esclarecimento

O voluntário tem garantia de que receberá resposta ou esclarecimento a 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 com o dispositivo intrabucal, favor entrar em contato o mais breve possível.

Tel: 11 3091 7835 (Sala dos alunos de pós-graduação – Odontopediatria)

11 3091 7835 (Secretaria da disciplina de Odontopediatria)

11 5083 2873 (Residência Fernanda) 11 8227 9748 (Celular Fernanda)

Formas de indenização

Não há danos previsíveis decorrentes desta pesquisa.

Garantia de sigilo

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

Liberdade para se recusar em participar da pesquisa

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

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

Nome do voluntário: _____

Data de nascimento: _____ Documento: _____

Endereço: _____

CEP: _____ Telefone: _____ E-mail: _____

Assinatura do voluntário

Assinatura do pesquisador

São Paulo, _____ de _____ de _____.

ATENÇÃO: A SUA PARTICIPAÇÃO EM QUALQUER TIPO DE PESQUISA É VOLUNTÁRIA. EM CASO DE DÚVIDA QUANTO AOS SEUS DIREITOS, ESCREVA PARA O **COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA FO-USP** (Av. Prof. Lineu Prestes, 2227, São Paulo, SP. CEP 05508-900).

APÊNDICE B – Tabela de Fluxo Salivar Estimulado

Tabela A.1 – Resultado do teste *t*-pareado para comparação das médias ($\pm$ desvio-padrão) do fluxo salivar dos voluntários ($n = 9$) estimulado por pastilha com xilitol ou sorbitol

Variável	Pastilha com xilitol	Pastilha com sorbitol	<i>p</i> -valor
Fluxo salivar (ml/min)	1,00 $\pm$ 0,39 (n=9)	0,87 $\pm$ 0,39 (n=9)	0,0973

n = Número de voluntários

APÊNDICE C – Termo de Doação de Dentes

TERMO DE DOAÇÃO DE DENTES

Identificação do Doador:

Nome (legível): _____

Data de Nascimento: ____/____/____ Naturalidade: _____ UF: ____

RG nº.: _____ CPF nº.: _____

Endereço (Rua ou Avenida / nº. / complemento): _____

Cidade: _____ UF: ____ CEP: _____

Telefones para contato: _____

E-mail: _____

DECLARAÇÃO

Declaro ter sido esclarecido sobre quais os motivos que levaram à necessidade de remoção do(s) dente(s) _____:
(razão)_____. **Concordo que os mesmos sejam utilizados na pesquisa de título “Efeito do xilitol em pastilhas na composição do biofilme dental e na desmineralização e remineralização do esmalte”,** que objetiva avaliar se pastilhas contendo o adoçante xilitol podem diminuir a formação de cárie dentária e a quantidade de bactérias causadoras de cárie dentária na placa bacteriana.

Fui, ainda, esclarecido pelo pesquisador que minha identidade não será divulgada por qualquer meio e que o material recolhido será utilizado unicamente para pesquisa citada acima.

Assinatura do Doador

São Paulo, ____ de _____ de _____.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

Faculdade de Odontologia
Universidade de São Paulo

PARECER DE APROVAÇÃO
Protocolo 244/04

O Grupo de Trabalho indicado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, **APROVOU** o protocolo de pesquisa *"Efeito de pastilhas contendo Xilitol na composição do biofilme dental e na desmineralização do esmate em modelo de alto desafio cariogênico in situ"*, de responsabilidade da Pesquisadora **Fernanda de Moraes Ferreira**, sob orientação da Professora Doutora **Célia Regina Martins Delgado Rodrigues**.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios anuais referentes ao andamento da pesquisa e ao término cópia do trabalho em "cd". Qualquer emenda do projeto original deve ser apresentada a este CEP para apreciação, de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 20 de dezembro de 2004

Profª Drª **ROSA HELENA MIRANDA GRANDE**
Coordenadora do CEP-FOUSP