DANIELLE TUPINAMBÁ EMMI

Influência dos óleos do tucumã (*Astrocaryum vulgare*) e da pupunha (*Bactris gasipae*) na composição do biofilme dental e dinâmica do processo de cárie em esmalte: um estudo *in situ*

São Paulo

2013

DANIELLE TUPINAMBÁ EMMI

Influência dos óleos do tucumã (*Astrocaryum vulgare*) e da pupunha (*Bactris gasipae*) na composição do biofilme dental e dinâmica do processo de cárie em esmalte: um estudo *in situ*

Versão Corrigida

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: Dentística

Orientadora: Profa. Dra. Margareth Oda

São Paulo

2013

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Emmi, Danielle Tupinambá.

Influência dos óleos do tucumã (*Astrocaryum vulgare*) e da pupunha (*Bactris gasipae*) na composição do biofilme dental e dinâmica do processo de cárie em esmalte: um estudo *in situ* / Danielle Tupinambá Emmi; orientador Margareth Oda.

-- São Paulo, 2013.

96 p. : fig., tab., graf. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Dentística. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida.

1. Biofilmes - Odontologia. 2. Desmineralização dentária. 3. Ácidos graxos. 4. Estresse oxidativo. 5. Óleos vegetais. I. Oda, Margareth. II. Título.

Emmi DT. Influência dos óleos do tucumã (*Astrocaryum vulgare*) e da pupunha (*Bactris gasipae*) na composição do biofilme dental e dinâmica do processo de cárie em esmalte: um estudo *in situ*. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Aprovado em: /   /2013

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

*Dedico este trabalho a **MINHA FAMÍLIA**....*

A minha **MÃE**, Ida Carmen, um exemplo de mulher forte, de mãe carinhosa, amorosa e dedicada. Sua presença sempre ao meu lado foi meu alicerce. Suas palavras de incentivo, resoavam aos meus ouvidos, todas as vezes que o desânimo e o cansaço insistiam em aparecer. Seu beijo e abraço no meio de uma madrugada dedicada aos estudos eram a força que eu precisava para continuar.

Muito obrigada por tudo!

Ao meu **PAI**, Domingos, minha inspiração como profissional íntegro e como escritor. Tentava me espelhar na sua fluência de ideias e facilidade na escrita cada vez que as ideias para a redação do trabalho, teimavam em não aparecer.

Obrigada pelo apoio e incentivo!

Aos meus **IRMÃOS**, Isabella e Domenico, exemplos de integridade, honestidade, carinho, amor, compreensão e dedicação. Muito obrigada pelo incentivo constante, pelo companheirismo fraterno, pela amizade, pelas conversas, conselhos e proteção permanente. Obrigada por me proporcionarem sempre o melhor e por estarem ao meu lado em todas as circunstâncias e ocasiões!

Aos meus **SOBRINHOS**, José Augusto, Fernanda, Giovanna, Dandara e Samara. Cada palavra, beijo, sorriso, abraço e carinho foram essenciais para que eu superasse os momentos de cansaço e dificuldade. Obrigada por compreenderem minha ausência, quando eu precisava me dedicar a esta pesquisa. Obrigada por fazerem parte da minha vida... "Avião sem asa, fogueira sem brasa, sou eu, assim sem vocês..."!

...sem o amor, carinho e incentivo de vocês, eu não chegaria até aqui.

AMO VOCÊS!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Não poderia chegar até aqui sem registrar meu agradecimento especial a uma pessoa que esteve presente em todas as fases de realização dessa pesquisa:

Profª Dra. Regina Fátima Feio Barroso. Você me acompanhou desde a graduação, inserindo-me nas pesquisas de iniciação científica. Participou da minha formação como cirurgiã-dentista, especialista e mestre. Traçou junto comigo as primeiras linhas do projeto que hoje se transformou na minha tese de doutorado, como parte de uma linha de pesquisa que nós fomos desbravadoras na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Pará (FO-UFGPA). Obrigada por ter segurado minhas ausências na disciplina de Saúde Coletiva da FO-UFGPA, todas as vezes que eu tinha atividades do doutorado a cumprir ou fases desta pesquisa a executar. Obrigada por procurar minimizar os contratempos da pesquisa, sempre buscando uma solução. Obrigada por sua presença constante, com palavras de incentivo e apoio quando as dificuldades insistiam em aparecer. Obrigada pela parceria. Obrigada por ser mais que uma professora, mais que uma amiga, obrigada por ser minha "mãe acadêmica".

Meu eterno agradecimento e admiração por você!

AGRADECIMENTOS

A **DEUS - Pai, Filho e Espírito Santo**, por me conceder saúde, sabedoria, força e inspiração para que eu concluísse mais essa etapa na minha vida. Nos momentos de desânimo, minha fé me fez acreditar que "...Nada poderia me abalar, nada poderia me derrotar, pois minha força e vitória vem de Ti Senhor".

A minha orientadora **Profª Dra. Margareth Oda**, pessoa a quem tenho enorme admiração, respeito e afeto. Muito obrigada pela confiança em aceitar ser minha orientadora. Obrigada pela amizade, pelos agradáveis momentos de convivência, pela compreensão, pelas palavras de otimismo e incentivo, pelo aprendizado que me proporcionou, por estar sempre disposta a ajudar e a minimizar as dificuldades enfrentadas ao decorrer deste estudo. Sinto-me privilegiada por ter sido sua orientada. Minha eterna gratidão!

A **Profª Dra. Eliane Bemerguy Alves**, que apesar de sermos colegas na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Pará (UFPA), as atribuições da rotina de trabalho, muitas vezes não permitiam que conversássemos. Contudo, a oportunidade de trabalharmos juntas neste Doutorado Interinstitucional (DINTER), possibilitou que estreitássemos nossos laços de amizade. Obrigada por sua colaboração, por sua alegria contagiante, por suas palavras de ânimo e incentivo sempre que precisei.

À **Profª Dra. Miriam Lacalle Tubino**, coordenadora do Programa de Doutorado Interinstitucional USP/ UFPA, pela atenção e competência com que conduziu esta atribuição.

À **Profª Dra. Cecy Martins Silva**, coordenadora operacional do Programa de Doutorado Interinstitucional USP/ UFPA, sobretudo pela amizade e incentivo, e por ter conduzido com maestria esta tarefa.

Ao **Prof. Dr. Emmanuel Zagury Tourinho**, Pró-Reitor de Pesquisa e Pós Graduação da UFPA, por incentivar a pesquisa e a qualificação profissional, por meio deste Programa de Doutorado Interinstitucional.

Aos alunos que participaram como voluntários da pesquisa: **Thamires Silva, Kelly Vilhena, Rui Guilherme Silva, Tamires Verçosa, Mayara Sabrina Miranda, Larissa Dias, Yasmin Gomes e Thais Abraçado**, cuja colaboração e compromisso em todas as fases do experimento *in situ* foram fundamentais para a realização deste estudo. Muito obrigada de coração! Vocês foram maravilhosos! Não poderia ter voluntários melhores.

A todos os cirurgiões dentistas que colaboraram com a doação dos dentes necessários para esta pesquisa, em especial ao **Prof. Dr. Newton Guerreiro** e **CD. Júlio Garofo**.

Ao amigo **Joel Conceição** pela doação dos frutos utilizados no estudo.

A professora **Dra. Nádia Cristina Fernandes Correa** e **Prof. Dr. Luiz Ferreira de França**, pelas orientações, cooperação e parceria, cedendo o espaço do Laboratório de Operações de Separação (LAOS) na UFPA para a extração e análises físico-químicas dos óleos utilizados neste estudo.

Ao professor **MSc. Miguel Braga**, pesquisador do Laboratório de Pesquisa e Análise de Combustíveis da UFPA, pela realização das análises cromatográficas dos óleos estudados.

Aos Professores **MSc. Aluísio Celestino Júnior** e **MSc. Mileide Paz Brito** responsáveis pela Central de Análises Físico-Química e Microbiológica de Medicamentos do Centro Universitário do Pará (CESUPA), pela cessão do Laboratório e orientações nas análises microbiológicas realizadas.

Ao **Prof. Dr. Sandro Percário** responsável pelo Laboratório de Pesquisas em Estresse Oxidativo (LAPEO) da UFPA, que cedeu o espaço para a realização das análises bioquímicas e, sobretudo pela disponibilidade, orientações e importante colaboração para facilitar meu entendimento dos resultados bioquímicos envolvidos nesta pesquisa.

Ao **Prof. Dr. Anderson Zanardi Freitas**, pela atenção, colaboração, disponibilidade e orientação nas análises de Tomografia por Coerência Óptica, mostrando-se sempre solícito em todos os momentos que precisei.

À **Profª Dra. Patrícia Moreira de Freitas**, pela colaboração e orientação durante o delineamento metodológico deste estudo.

Aos colegas **Profª Dra. Sueli Maria da Silva Kataoka** e **Prof. Dr. João de Jesus Viana Pinheiro** pela valiosa amizade e por contribuírem com a realização de algumas etapas desta pesquisa.

Ao **Prof. Dr. Antonio David Correa Normando** pela revisão estatística.

À técnica de laboratório em microbiologia do CESUPA **Maria Bernadete Santos Queiroz** que se mostrou sempre atenciosa e disponível, e, cuja colaboração foi fundamental para a realização das análises microbiológicas aqui realizadas.

Às alunas bolsistas de pesquisa da Faculdade de Odontologia da UFPa, **Tamea Lacerda Monteiro** e **Mayara Sabrina Luz Miranda**, e à **Msc. Etiane Prestes Batirola**, pela disponibilidade e importante colaboração, em algumas etapas laboratoriais deste estudo.

Aos alunos bolsistas do LAOS: **João Fernando**, **Wagner Reis** e **Jorge Albert** por colaborarem durante o processo de extração dos óleos e nas análises físico-químicas necessárias.

Ao doutorando do LAPEO, **Danilo Reymão Moreira** por mostrar-se sempre disponível, colaborando durante as análises bioquímicas.

À farmacêutica **Maria Louze Nobre Lamarão**, da Farmácia Escola da UFPa, pela disponibilidade e colaboração na manipulação das formulações com os óleos utilizados neste estudo.

A todos os colegas de turma deste Programa de Doutorado Interinstitucional: **Aladim Lameira, Ana Daniela Silveira, Andrea Cruz, Armando Chermont, Claudia Rothbarth, Jesuina Araújo, Leonardo Ferro, Luciana Moraes, Max Rocha, Newton Guerreiro, Noélia Leal, Renata Esteves, Roberta Couto e Simone Pedrosa** pelo aprendizado trocado e agradáveis momentos de convivência, tornando essa caminhada mais suave.

Às amigas **Andrea Cruz e Claudia Rothbarth**, cujo objetivo comum pelo título de Doutor fortaleceu nossa amizade, permitindo partilhar as angústias e anseios desta fase.

A minha querida amiga-irmã **Roberta Couto**. Estivemos juntas na preparação para a seleção do doutorado, nos momentos de "happy hour" dos módulos e hoje, estamos vendo a batalha chegar ao fim! Nossa antiga amizade, foi fortalecida diante das dificuldades e desafios que enfrentamos ao decorrer do curso e das nossas pesquisas. Muito obrigada por sua amizade, apoio, incentivo, parceria, pela força nos momentos de desânimo, pelas palavras amigas, e risadas para relaxar. Amigos são os irmãos que Deus nos permite escolher.

À amiga-irmã **Elise Tiemi Yamaguchi**, pela acolhida, companheirismo e amizade e, por ter sido, junto com a Roberta Couto, a família que eu ganhei em São Paulo, sendo o meu esteio e fazendo superar a ausência da minha família. O carinho e calor fraterno de vocês transformaram os dias mais frios, tristes e atribulados, em dias agradáveis e cheios de energia positiva para seguir em frente. Muito obrigada por tudo!

A **todos os professores da Faculdade de Odontologia da USP (FO-USP)**, que se disponibilizaram estar em Belém para ministrar os módulos do Dinter.

Aos **funcionários da FO-USP**, em especial, aos funcionários do Departamento de Dentística e aos da Pós-Graduação pela atenção e disponibilidade; aos funcionários da Biblioteca, principalmente a Glauci Fidelis, pela colaboração e dedicação na revisão desta tese.

Aos **colegas da disciplina de Odontologia em Saúde Coletiva da UFPA**, pela compreensão diante de minhas ausências para cumprir etapas do doutorado.

Aos eternos mestres e grandes amigos: **Izamir Carnevali de Araújo, Marizeli Viana Aragão Araújo e Alda França Costa**, pelo incentivo constante, por estarem sempre torcendo pelo meu sucesso e, sobretudo, pela preciosa amizade.

À **Curaden Swiss do Brasil** pela doação das escovas dentais Curaprox® utilizadas nesta pesquisa.

À **Colgate**, na pessoa da **CD Heloize Monteiro** e à **Trat Odontomédica** pela doação dos brindes aos voluntários, ao término da fase experimental deste estudo.

Aos meus **cunhados**, pelo incentivo e colaboração, sobretudo a **Sandra Helena**, sempre preocupada em controlar as brincadeiras da criançada para não atrapalhar minha concentração nos momentos de estudo.

As minhas **tias** pelas importantes orações que me fortaleceram nessa caminhada. Às **primas**, em especial à prima **Catti Arroyo** por sua presença constante acompanhando as atribulações dessa fase. Obrigada por suas palavras de incentivo e encorajamento.

À **Universidade Federal do Pará**, que permitiu meu licenciamento das atividades docentes para me dedicar integralmente à finalização deste curso.

À **Universidade de São Paulo**, pela acolhida.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pelo incentivo a pesquisa, e bolsa de estudos concedida.

Aos **amigos de sempre** e as **novas amigas conquistadas**, que torcem pelo êxito na conclusão desta pesquisa.

"Inovação não começa com ideias e sim, com perspectivas. Em vez de se preocupar com respostas, muito mais importante são as perguntas"

Arthur Schopenhauer

RESUMO

Emmi DT. Influência dos óleos do tucumã (*Astrocaryum vulgare*) e da pupunha (*Bactris gasipae*) na composição do biofilme dental e dinâmica do processo de cárie em esmalte: um estudo *in situ* [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2013. Versão Corrigida

A cárie dental ainda afeta grande número de pessoas no mundo todo. Sua ocorrência depende da formação, sobre a superfície dentária, de um biofilme microbiano. As interações entre microrganismos do biofilme e os componentes da dieta, podem interferir de diferentes formas nessa patologia, pois alguns componentes alimentares atuam favorecendo o aparecimento de lesões, tais como os carboidratos, enquanto outros, atuam inibindo, como ácidos graxos, polifenóis, caseína e lectina. O tucumã (*Astrocaryum vulgare*) e a pupunha (*Bactris gasipae*) são frutos oleaginosos nativos da Região Amazônica, que apresentam alto teor lipídico e de carotenos. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência dos óleos extraídos da polpa destes frutos na composição do biofilme dental e dinâmica do processo de desmineralização em esmalte. Os óleos foram extraídos sem adição de solventes, caracterizados e misturados a uma solução de 20% de sacarose, para serem testados por meio de um modelo de estudo *in situ*. Oito voluntários utilizaram dispositivos palatinos contendo 4 blocos de esmalte dental, durante 3 fases de 14 dias cada (n=96). As soluções controle (sacarose 20%) e as soluções com óleos testadas, foram aplicadas sobre os blocos de esmalte 8 vezes ao dia, de 2 em 2 horas. A cada 7 dias, foram coletados 2 blocos de esmalte e o biofilme formado sobre esses blocos. A análise do biofilme compreendeu avaliação da quantidade de unidades formadoras de colônia (UFC) de *Streptococcus mutans*, *Streptococcus totais* e *Lactobacillus casei*; dosagem de carboidratos totais e dosagem da capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC). A perda mineral dos blocos de esmalte foi avaliada por meio da microdureza superficial Knoop e Tomografia por Coerência Óptica (OCT). A análise do biofilme mostrou que o grupo tucumã (GT)-14dias e grupo pupunha (GP)-7dias apresentaram a menor quantidade de UFC do total de microrganismos, diferindo dos grupos sacarose (GS)-7 e 14dias, GT-7dias e GP-14dias (p<0,05). O grupo GT-7 e 14 dias mostraram dosagens de TEAC

semelhantes ao grupo GS-7 e 14dias. Os grupos GP-7 e 14dias apresentaram os menores valores de TEAC e de carboidratos totais. Não houve diferença intragrupos nos diferentes tempos experimentais, relacionados ao TEAC e carboidratos totais. A análise da perda de dureza superficial (PDS), coeficiente de atenuação óptica e área sob a curva do sinal de OCT mostraram que o grupo GP-7dias apresentou a menor perda mineral superficial e subsuperficial. A variável TEAC revelou correlação positiva moderada com carboidratos, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus totais* e PDS sugerindo que o ambiente redox possa ter influenciado e mediado as reações no biofilme. Concluiu-se que os óleos testados reduziram a agregação bacteriana e a perda mineral, sendo que o óleo de tucumã apresentou efeito tardio, enquanto que o óleo da pupunha mostrou resultado mais imediato. O óleo da pupunha por ter apresentado ação nos processos iniciais de formação do biofilme pode ser considerado mais efetivo na prevenção à cárie dental.

Palavras-chave: Biofilme dentário. Desmineralização dentária. Ácidos graxos. Estresse oxidativo. Óleos vegetais.

ABSTRACT

Emmi DT. Influence of tucumã (*Astrocaryum vulgare*) and peach palm (*Bactris gasipae*) oils on dental biofilm composition and dynamics of enamel caries: an *in situ* study [thesis]. São Paulo: São Paulo University, 2013. Versão Corrigida

Dental caries still affects many people worldwide. Its occurrence depends on the formation of a biofilm on the tooth surface. The interaction between biofilm microorganisms and the components of the diet can interfere in different ways in this pathology, as some food components act favoring the appearance of lesions, such as carbohydrates, while others, act by inhibiting it, such as fatty acids, polyphenols, casein and lectin. Tucumã (*Astrocaryum vulgare*) and peach palm (*Bactris gasipae*) are oleaginous fruits native from the Amazonia, which have a high lipid content and carotenes. The objective of this study was to evaluate the influence of the oils extracted from the pulp of these fruits on dental biofilm composition and dynamics of enamel demineralization. The oils were extracted without addition of solvents, characterized and mixed with a 20% sucrose solution, to be tested under an *in situ* study model. Eight volunteers wore palatal appliances containing 4 dental enamel blocks during 3 phases of 14 days each (n = 96). The control (20% sucrose) and experimental solutions (addition of the oils) were applied on the enamel blocks 8 times per day, every 2 hours. Every 7 days 2 enamel blocks were removed and biofilm formed on their surfaces were collected. The analysis comprised the assessment of biofilm forming units (CFU) of *Streptococcus mutans*, *Streptococcus total* and *Lactobacillus casei*, and the dosage of both the total carbohydrates and the Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC). The mineral loss of enamel blocks was evaluated by Knoop microhardness and Optical Coherence Tomography (OCT). The biofilm analysis showed the least amount of CFU of total microorganisms on group tucumã (GT)-14days and group pupunha (GP)-7days, differing from groups of sucrose (GS)-7 and 14days, GT-7days and GP-14days ($p < 0,05$). The GT-7 and 14days showed similar doses of TEAC compared to groups GS-7 and 14days. The GP-7 and 14 days group showed the lowest values of TEAC and total carbohydrates. With respect to TEAC and total carbohydrates, there was no difference among groups in different experimental times. The analysis of surface hardness (SMH) loss,

optical attenuation coefficient and area under the curve of the OCT signal showed that group GP-7days had the lowest surface and subsurface mineral loss. The TEAC variable showed moderate positive correlation with carbohydrates, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus total* and SMH, suggesting that the environment is influencing and mediating redox reactions in the biofilm. It was concluded that all the oils reduced bacterial aggregation and mineral loss, and that the tucumã oil presented a late effect, while the peach palm oil showed a most immediate result. As the peach palm oil was shown to act during the initial processes of biofilm formation it can be considered more effective in preventing dental caries.

Keywords: Dental biofilm. Tooth demineralization. Fatty acids. Oxidative stress. Vegetable oils.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Gráfico 5.1 - Mediana, Q1, Q3 e desvio interquartílico da dosagem de TEAC nos diferentes grupos e tempos experimentais.....	68
Gráfico 5.2 - Mediana, Q1, Q3 e desvio interquartílico da dosagem de carboidratos totais nos diferentes grupos e tempos experimentais.....	69
Gráfico 5.3 - Média do coeficiente de atenuação óptica nos grupos estudados.....	71
Gráfico 5.4 - Distribuição dos valores do coeficiente de atenuação óptica entre as amostras.....	71
Gráfico 5.5 - Área sob a curva para a profundidade de 20 a 120µm, obtido a partir do gráfico de intensidade de sinal de OCT por profundidade, nos grupos estudados.....	72

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1 -	Biometria do tucumã.....	46
Figura 4.2 -	A: Despolpamento do fruto; B: Polpa do tucumã.....	46
Figura 4.3 -	Óleo e frutos de tucumã.....	47
Figura 4.4 -	Biometria da pupunha.....	48
Figura 4.5 -	A: Despolpamento do fruto; B: Polpa da pupunha.....	48
Figura 4.6 -	Óleo e frutos da pupunha.....	50
Figura 4.7 -	Obtenção dos blocos de esmalte.....	51
Figura 4.8 -	A: Polimento dos espécimes em politriz; B: Análise de microdureza Knoop.....	52
Figura 4.9 -	Dispositivo palatino com blocos de esmalte fixados cobertos pela tela plástica.....	53
Figura 4.10 -	Material entregue aos voluntários.....	55
Figura 4.11 -	Esquema ilustrativo do processamento das amostras para análise microbiológica em técnica do <i>pour plate</i>	58
Figura 4.12 -	A: Posicionamento da amostra sob o led de OCT; B: Obtenção da imagem.....	62
Figura 4.13 -	Interface do programa utilizado na análise das imagens de OCT.....	63
Figura 4.14 -	Organização dos grupos para as análises estatísticas.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 -	Valores médios e desvio padrão da biometria do tucumã.....	46
Tabela 4.2 -	Valores médios e desvio padrão da biometria da pupunha.....	48
Tabela 5.1 -	Comparação da Média e Desvio Padrão da microdureza Knoop (KHN) superficial inicial e final e perda de dureza superficial (PDS) em relação aos grupos.....	65
Tabela 5.2 -	Mediana (Mi) e Desvio Interquartilico (Dj) de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) dos diferentes microorganismos pesquisados e do total de microorganismos, entre os grupos.....	66
Tabela 5.3 -	Correlação entre a Perda de Dureza Superficial (PDS) e as Unidades Formadoras de Colônias de <i>Streptococcus mutans</i> , <i>Streptococcus totais</i> e <i>Lactobacillus casei</i>	67
Tabela 5.4 -	Correlação entre TEAC, Carboidratos, PDS e Unidades Formadoras de Colônias de <i>Streptococcus totais</i> e <i>Streptococcus mutans</i>	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg/g	Micrograma por grama
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
µs	Microsegundos
ABTS+	Radical [2,2'-azino-bis-(3-etil-benzotiazolina)-6-sulfônico]
ANOVA	Análise de variância
CNEN	Comissão Nacional de Energia Nuclear
CESUPA	Centro Universitário do Pará
Dj	Desvio Interquartilico
DP	Desvio Padrão
g	Grama
GP	Grupo Pupunha
GS	Grupo Sacarose
GT	Grupo Tucumã
GTF	Glicosiltransferase
ICPO-D	Índice de dentes cariados, perdidos e obturados
IPEN	Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
Kg	Kilograma
KHN	Microdureza Superficial Knoop
L/min	Litro por minuto
LAOS	Laboratório de Operações de Separação
LAPEO	Laboratório de Pesquisas em Estresse Oxidativo
Ltda.	Limitada
mg	Miligrama
mg/dL	Miligrama por decilitro
mgF/L	Miligrama de flúor por litro
mg/mL	Miligrama por mililitro
Mi	Mediana
mL	Mililitro
mm	Milímetro

mM/L	Milimolar por Litro
MPa	Mega Pascal
mW	Miliwatts
nm	Nanômetro
OCT	Tomografia por Coerência Óptica
P.A.	Pró-análise
PBS	Tampão fosfato salino
PDS	Perda de Dureza Superficial
PEC	Polissacarídeos extracelulares
pH	Potencial hidrogeniônico
PIC	Polissacarídeos intracelulares
rpm	Rotações por minuto
rs	Coeficiente de correlação de Spearman
TEAC	Capacidade antioxidante equivalente ao Trolox
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UFC/mg	Unidades Formadoras de Colônia por miligrama
UFPA	Universidade Federal do Pará
UI/mL	Unidade Internacional por mililitro
USP	Universidade de São Paulo

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Percentual
β	Beta
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
®	Marca Registrada
α	Alfa

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	REVISÃO DA LITERATURA	25
2.1	BIOFILME DENTAL	25
2.2	CÁRIE DENTAL.....	27
2.3	ALIMENTOS CARIOGÊNICOS.....	29
2.4	FATORES ALIMENTARES PROTETORES.....	31
2.4.1	Lipídios/ Ácidos graxos	31
2.4.2	Polifenóis	33
2.4.3	Caseína	34
2.4.4	Outros componentes alimentares com ação protetora	35
2.5	TUCUMÃ (<i>Astrocaryum vulgare</i>).....	36
2.6	PUPUNHA (<i>Bactris gasipae</i>).....	37
2.7	ESTRESSE OXIDATIVO.....	38
2.8	MICRODUREZA SUPERFICIAL KNOOP (KHN).....	40
2.9	TOMOGRAFIA POR COERÊNCIA ÓPTICA (OCT).....	41
3	OBJETIVO	44
4	MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1	ASPECTOS ÉTICOS.....	45
4.2	EXTRAÇÃO DOS ÓLEOS VEGETAIS.....	45
4.2.1	Extração do óleo do tucumã (<i>Astrocaryum vulgare</i>)	45
4.2.2	Extração do óleo da pupunha (<i>Bactris gasipae</i>)	47
4.3	PREPARO DOS BLOCOS DE ESMALTE.....	50
4.4	ANÁLISE DA MICRODUREZA SUPERFICIAL INICIAL E SELEÇÃO DOS BLOCOS DE ESMALTE.....	51
4.5	SELEÇÃO DE VOLUNTÁRIOS.....	52
4.6	PREPARO DOS DISPOSITIVOS PALATINOS.....	53
4.7	PROCEDIMENTOS INTRABUCAIS.....	53
4.8	ANÁLISE DO BIOFILME DENTAL.....	56
4.8.1	Análise microbiológica	56
4.8.2	Análise bioquímica	58

4.8.2.1	Dosagem da capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC)...	59
4.8.2.2	Dosagem de carboidratos totais.....	60
4.9	AVALIAÇÃO DA MICRODUREZA SUPERFICIAL FINAL.....	61
4.10	ANÁLISE DA PERDA DE CONTEÚDO MINERAL POR TOMOGRAFIA POR COERÊNCIA ÓPTICA.....	62
4.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	63
5	RESULTADOS	65
6	DISCUSSÃO	73
7	CONCLUSÃO	80
	REFERÊNCIAS	81
	APÊNDICES	93
	ANEXOS	96

1 INTRODUÇÃO

O biofilme dental é considerado como uma estrutura de significado fundamental na indução do processo de cárie, pois está firmemente aderido a superfície do esmalte, funcionando como um sítio de proliferação e crescimento de microorganismos, produção de polissacarídeos e ácidos decorrente do metabolismo das bactérias.

A formação do biofilme acontece naturalmente sobre a superfície dental, e contribui, assim como a microflora de outras partes do corpo, ao desenvolvimento fisiológico e defesa do hospedeiro (Marsh, 2006). Entretanto, o alto consumo de carboidratos pode alterar a composição bioquímica e microbiológica deste biofilme levando a um aumento de espécies patogênicas, o que influenciará a atividade de cárie.

Ao longo dos anos, muitas estratégias tem sido desenvolvidas com o objetivo de controlar a formação do biofilme e consequentemente, a cárie dental. Além da consagrada utilização dos fluoretos para promover a remineralização dos tecidos dentais, outras medidas, como utilização de soluções antimicrobianas e mudanças na dieta, são sugeridas como capazes de alterar a composição do biofilme dental.

Sabe-se que os alimentos apresentam um importante papel na etiologia da cárie, entretanto, a dieta pode influenciar a atividade de cárie favorecendo a doença, ou a inibindo. Todavia, há vários achados na literatura relacionados aos fatores cariogênicos, enquanto que, estudos relacionados aos alimentos inibidores dessa patogenia são restritos. Contudo, Gazzani et al. (2012) relataram a presença de compostos com atividade antibacteriana, antiaderente e inibidora da formação da matriz do biofilme em diferentes produtos alimentares, como queijos, chás, castanhas, sementes, cereais e alimentos gordurosos em geral.

Dentre os componentes alimentares, os constituintes lipídicos dos alimentos e os polifenóis tem recebido atenção especial nos últimos anos. Evidências recentes (Hanning et al., 2013; Kenshe et al., 2013) ressaltam que os compostos lipídicos são capazes de alterar a ultraestrutura da película, modulando a bioadesão bacteriana. Enquanto que, os polifenóis podem inibir a ação da amilase salivar, da glicosiltransferase e a síntese de glucanos (Ferrazzano et al., 2011a; Wang et al., 2013).

Segundo Lima (2007), muitos alimentos naturais apesar de fornecerem carboidratos fermentáveis, possuem substâncias que exercem efeito antimetabólico ou que potencializam a remineralização, reduzindo assim, a ação cariogênica. Por isso, os vegetais tem sido valorizados como fonte de produtos naturais importantes para a manutenção da saúde. Além disso, Rolim et al. (2013) afirmam que os vegetais podem oferecer ampla variedade de moléculas antioxidantes, como polifenóis e carotenos.

O Brasil, especialmente a Amazônia, possui grande diversidade vegetal e por isso, um elevado potencial para o desenvolvimento de fitoterápicos, até mesmo na Odontologia. Vários vegetais e frutos apresentam potencial econômico, tecnológico e nutricional que vem despertando o interesse de estudos científicos. Espécies vegetais oleaginosas estão sendo alvo de muitos trabalhos, devido sua eficiência antimicrobiana, bem como, pela ausência de efeitos secundários. Explorar a biodiversidade amazônica estudando suas espécies na prevenção à cárie assume relevância considerável para a região.

O tucumã (*Astrocaryum vulgare*) e a pupunha (*Bactris gasipae*) são frutos nativos da região Amazônica, pertencentes à família *Arecaceae*. Apesar da importância sócio econômica regional e diversidade de aplicações, poucos estudos tem sido realizados com essas espécies, sobretudo na área da saúde.

Os frutos de tucumã tem formato elipsóide, são alaranjados e medem de 3 a 5cm de comprimento. Apresentam alto teor de lipídios, carotenos, tocoferol e fibras, que conferem a este fruto alto valor energético e nutritivo (Ferreira et al., 2008). A pupunha apresenta diferentes formatos, coloração e tamanho de frutos. Normalmente, são ovoides ou cônicas e apresentam coloração variando entre o vermelho, laranja e amarelo. A polpa é rica em carboidratos, proteínas, lipídios, fibras, elevado teor de carotenos e elementos minerais (Yuyama et al., 2003; Melhorança-Filho; Pereira, 2012).

Considerando a composição química desses frutos, principalmente relacionada ao alto teor lipídico e presença de carotenóides, assim como as evidências científicas de que lipídios podem apresentar potencial antimicrobiano, a proposta deste estudo, foi testar os óleos extraídos da polpa do tucumã e da pupunha na formação do biofilme dental *in situ*, avaliando as mudanças na sua composição microbiológica e bioquímica, bem como sua ação na perda mineral do esmalte dental.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 BIOFILME DENTAL

O biofilme dental é uma comunidade microbiana estruturalmente organizada que se adere a superfície dental apresentando complexas interações interespecies e uma matriz orgânica derivada de produtos extracelulares (Marsh, 2003; Hojo et al., 2009; Ccahuana-Vásquez; Cury, 2010; Zijng et al., 2010).

Garcia-Godoy e Hicks (2008), Hojo et al. (2009), Hara e Zero (2010) relatam que os microorganismos não colonizam diretamente a superfície do esmalte, pois os dentes são sempre cobertos por uma camada proteica acelular que se forma nas superfícies dentais, imediatamente após a escovação dos dentes. Seus constituintes principais são glicoproteínas salivares, fosfoproteínas e lipídios, que agem como receptores para as bactérias que se aproximam. Essa película acelular tem apenas 0,1 a 1,0µm de espessura e funciona como base para o desenvolvimento do biofilme dental. As bactérias colonizadoras iniciais aderem passivamente a película, através de estaterinas e fosfoproteínas da saliva, que atuam como receptores, permitindo que os microorganismos se fixem firmemente às superfícies dentais por forças eletrostática, hidrofobicidade iônica ou forças de Van der Waals.

Hara e Zero (2010) mencionam que a película, além de atuar como substrato para adesão bacteriana inicial e posterior desenvolvimento do biofilme dental, principalmente pela ação das proteínas que modulam a ação dessas bactérias, esta película atua também como barreira física prevenindo a desmineralização e como reservatório de íons que atuam na remineralização.

Outras bactérias, sem a capacidade de se ligar diretamente a película, unem-se ao biofilme através de ligações específicas, favorecendo a aderência interbacteriana, num processo chamado co-adesão, caracterizando-os como colonizadores secundários (Almeida et al., 2008). Este processo permite a diversidade de bactérias no biofilme dental com espécies aeróbias, aeróbias facultativas e anaeróbios coexistentes (Garcia-Godoy; Hicks, 2008).

De acordo com Marsh (2006), Do et al. (2013) a microbiota do biofilme continua a aumentar em diversidade até ser alcançada uma situação de

homeostasia, denominada comunidade clímax. Se ocorrer uma mudança nesta comunidade microbiana, decorrente, por exemplo, de alterações da dieta ou higiene bucal, ocorre desequilíbrio da microbiota, o que pode acarretar a cárie dental.

Os *Streptococcus* sp. correspondem a quase 60% dos microorganismos colonizadores iniciais, onde o *Streptococcus sanguinis* é uma das primeiras espécies a se aderir a película (Arthur et al., 2013). Além desses, também são encontrados no biofilme *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus orallis*, *Lactobacillus* sp., *Actinomyces* sp. e *Veillonella*. Entretanto, são os *S. mutans* os principais patógenos relacionados a cárie dental (Garcia-Godoy; Hicks, 2008).

Para Schilling e Bowen (1992), Pandit et al. (2011), um dos mais importantes fatores de virulência das bactérias que constituem o biofilme dental é a capacidade do microorganismo produzir glicosiltransferase (GTF) e sintetizar polissacarídeos extracelulares a partir da sacarose, pois isso permite a aderência da bactéria na superfície do dente e contribui para a formação do biofilme dental. Além disso, a produção de ácidos e a tolerância ácida da bactéria também servem como fator de virulência, porque produtos finais ácidos formados durante o metabolismo dos carboidratos da dieta e a capacidade da bactéria resistir ao meio ácido, são essenciais para o desenvolvimento de cáries.

Neste aspecto, os *S. mutans* merecem destaque, pois, por meio da síntese de polissacarídeos extracelulares (PEC) e intracelulares (PIC), ocorre aderência da bactéria à superfície dental, contribuindo para a integridade estrutural do biofilme alterando sua porosidade e, conseqüentemente, aumentando a desmineralização do esmalte (Ccahuana-Vásquez; Cury, 2010).

Para Arthur et al. (2007), Borges et al. (2008), Ccahuana-Vásquez e Cury (2010), os *S. mutans* são considerados os microorganismos mais cariogênicos do biofilme, devido sua capacidade de aderência, de produção de ácidos orgânicos e síntese de polissacarídeos extracelulares a partir dos carboidratos da dieta, principalmente a sacarose, além de suas propriedades acidúricas e acidogênicas. São cocos Gram positivos, com morfologia ovalada e que se encontram unidos aos pares, ou em cadeias, curtas ou médias. São anaeróbios facultativos. O melhor meio seletivo para isolar *S. mutans* é o ágar mitis salivarius bacitracina, associado com 20% de sacarose e 0,2 UI/mL de bacitracina, crescendo unicamente o *S. mutans* e suprimindo a maioria dos outros estreptococos (De Lorenzo, 2010).

As bactérias do gênero *Lactobacillus* compreendem um grupo com papel mais importante na progressão, do que na instalação da cárie dental. São bastonetes Gram-positivos, anaeróbios facultativos e às vezes, microaerófilos. Também possuem capacidade de tolerar ambientes com baixo pH (Leites et al., 2006).

De acordo com Daglia et al. (2002) a interferência em algum desses mecanismos de formação do biofilme pode prevenir a formação da cárie ou, pelo menos, retardar o processo carioso.

2.2 CÁRIE DENTAL

A cárie dental é definida como a dissolução química localizada resultante do metabolismo que ocorre na superfície do esmalte e o biofilme dental. É uma doença multifatorial e complexa. Alguns fatores que determinam este processo estão relacionados ao elemento dental, enquanto outros estão relacionados com o indivíduo, como comportamento, atitude, conhecimento, educação e condição sócio-econômica (Garcia-Godoy; Hicks, 2008; Maltz et al., 2010).

Segundo Borges et al. (2008), o desenvolvimento da cárie é um processo dinâmico, que envolve a composição e propriedades da matriz do biofilme dental; mudanças ecológicas provocadas pela dieta e interações bacterianas com a superfície dental.

Hara e Zero (2010) mencionam que a cárie está relacionada com a frequência de ingestão de carboidratos fermentáveis e que somente mudanças no padrão dietético e aumento no uso do fluoreto podem alterar esta relação.

O processo carioso inicia-se com a atividade metabólica das bactérias cariogênicas no biofilme microbiano, havendo a degradação de carboidratos da dieta, o que resulta na produção de vários ácidos orgânicos e consequentemente, queda do pH. Esta atividade metabólica ocorre de forma constante e resulta em flutuações de pH na interface dente-biofilme dental, o que gera, na presença de pH ácido, subsaturação de íons cálcio e fosfato na saliva e biofilme, ocasionando a saída desses íons dos tecidos duros do dente, durante o tempo em que o pH permanecer baixo (desmineralização). A partir do momento que houver a neutralização do pH pelo sistema tampão salivar, há a restituição desses íons para o

tecido dentário (remineralização). Assim, o desequilíbrio entre os processos de desmineralização e remineralização acarreta desde pequenas perdas minerais em nível ultra-estrutural, até lesões visíveis e cavitadas, caso não se intervenha no processo carioso (Aires et al., 2006; Garcia-Godoy; Hicks, 2008; Wolff; Larson, 2009).

Segundo Lingström et al. (2012) a redução do pH do biofilme se deve a liberação dos ácidos orgânicos, principalmente ácido lático, acético e propiônico, que ocorre como produto da fermentação de carboidratos pelos microorganismos cariogênicos.

Burne et al. (2009) afirmam que o pH do biofilme dental pode ser o fator mais importante para determinar a ecologia do biofilme e o desenvolvimento de cáries, pois a queda do pH, a profundidade e a duração da acidificação do meio são as diferenças químicas mais consistentes entre biofilmes saudáveis e biofilmes de cárie. Além disso, a manutenção do baixo pH do biofilme diminui o tempo da saliva de repor os íons minerais perdidos pelo dente (Cury et al., 1997).

De acordo com Marsh (2006), as bactérias cariogênicas podem ser encontradas naturalmente no biofilme dental, mas estes microorganismos são apenas fracamente competitivos a um pH neutro, e estão presentes como uma pequena parte de toda a comunidade do biofilme. Assim, com uma dieta convencional, os níveis de tais bactérias potencialmente cariogênicas são clinicamente insignificantes, e os processos de desmineralização e remineralização estão em equilíbrio. Se a frequência de ingestão de carboidratos fermentáveis aumentar, o biofilme fica mais tempo com pH abaixo do pH crítico (5,5) e ocorre a perda mineral do esmalte. Pode-se dizer então, que o desenvolvimento da cárie é mediada pelo biofilme que sofreu quebra dos mecanismos homeostáticos, que normalmente mantêm uma relação benéfica entre a microflora oral e o hospedeiro. Ao avaliar as opções de tratamento, a valorização da ecologia da cavidade oral vai permitir uma abordagem mais holística, além de outros fatores que precisam ser considerados, como a nutrição, fisiologia, as defesas do hospedeiro e o bem-estar geral do paciente e, como estes irão afetar o equilíbrio e atividade da microbiota bucal residente.

Para Gazzani et al. (2012) a prevenção da cárie deve ser baseada na eliminação de pelo menos um dos fatores causais. A utilização de fluoretos em suas mais variadas formas tem sido muito efetiva, assim como o uso de adoçantes como

substituto aos açúcares da dieta e compostos naturais presentes em muitas frutas e vegetais.

Maltz et al. (2010) mencionam que, para prevenção e tratamento da doença cárie devem ser levados em consideração os fatores determinantes e modificadores, como fatores comportamentais, educacionais, o acesso a informação, dieta, hábitos de higiene bucal, acesso ao flúor e aos serviços de saúde públicos ou privados.

Apesar dos índices de cárie dental terem diminuído em muitos países desenvolvidos, ela ainda permanece como uma doença dispendiosa e que afeta uma grande parte da população no mundo todo (Zero, 2004). No Brasil, a cárie ainda é a doença bucal de maior prevalência e de maior razão de perda dentária. De acordo com a Pesquisa Nacional de Saúde Bucal, o SB Brasil 2010, apesar do índice de dentes cariados, perdidos e obturados (ICPO-D) ter baixado, de 2,8 em 2003 para 2,1 em 2010, ainda existem regiões, como a Região Norte, onde houve aumento deste índice. Isso mostra que precisam ser realizadas políticas públicas adaptadas às características territoriais desta região (Brasil, 2011).

2.3 ALIMENTOS CARIOGÊNICOS

A dieta tem um importante papel na etiologia da cárie. Neste aspecto devem ser considerados a retentividade do alimento à superfície dental, a presença de fatores alimentares protetores e o tipo de carboidrato presente na dieta (Hara; Zero, 2010).

Segundo Hara e Zero (2010), Scardina e Messina (2012), o potencial cariogênico dos alimentos é relacionado ao conteúdo dos diversos açúcares (monossacarídeos – glicose e frutose; dissacarídeos – sacarose, maltose e lactose e polissacarídeos – amido), que podem difundir-se no biofilme dental e serem metabolizados, dando origem a ácidos, o que poderá influenciar na quantidade e qualidade dos agregados microbianos sobre os dentes e levar à desmineralização do esmalte. Os carboidratos de cadeia complexa, como o amido, são considerados menos cariogênicos, pois não se difundem facilmente no biofilme dental, ao passo que carboidratos de cadeias simples (sacarose, glicose, frutose) são considerados como mais cariogênicos.

Neste contexto, a sacarose assume importante papel, sendo considerada o carboidrato mais cariogênico da dieta, pois se difunde facilmente no biofilme dental sendo convertida por enzimas bacterianas (glicosiltransferase e frutossiltransferase) em glucanos e frutanos. Os glucanos contribuem na composição da matriz extracelular do biofilme dental, proporcionando maior viscosidade ao biofilme e maior adesão dos microorganismos às superfícies dentais, favorecendo o acúmulo de *S. mutans* e outras bactérias cariogênicas (Schilling; Bowen, 1992; Zero, 2004; Hara; Zero, 2010).

Cury et al. (2000) realizaram pesquisas para avaliar a cariogenicidade de diferentes açúcares formados no biofilme dental *in situ*, constatando que tanto a sacarose quanto a glicose+frutose podem induzir a formação de biofilme quando comparado ao biofilme formado na ausência destes carboidratos. Entretanto, os açúcares mostraram diferentes potenciais cariogênicos, sendo o biofilme formado na presença de sacarose, o que apresentou maior quantidade de matriz extracelular e o que causou maior desmineralização dos blocos de esmalte.

Aires et al. (2006) realizaram estudo *in situ* para avaliar o efeito de diferentes concentrações de sacarose na acidogenicidade e composição do biofilme dental. Testaram soluções de sacarose a 1%, 5%, 10%, 20% e 40%, concluindo que a solução de 1% é a menos cariogênica, enquanto que a solução de 5% apresentou o mesmo potencial cariogênico que as soluções de 10% e 20%, sendo considerada capaz de promover o desenvolvimento de cáries dentais.

Estudo *in vitro* realizado por Borges et al. (2008) com a sacarose, lactose e glicose+frutose demonstrou que, o potencial cariogênico dos monossacarídeos associados, glicose+frutose, foi o menor quando comparado à sacarose e à lactose, pois esta combinação de monossacarídeos (glicose+frutose) apresentou menor produção de biofilme.

2.4 FATORES ALIMENTARES PROTETORES

Zero (2004) relatou que a cariogenicidade dos alimentos que contém açúcares pode ser modificada por muitos fatores, incluindo a quantidade e tipo de carboidrato (sacarose ou outros açúcares), componentes protetores (proteínas, gorduras, cálcio, fosfato, fluoretos) e propriedades físicas e químicas (líquido ou sólido, retentividade, solubilidade, sistema tampão e fluxo salivar).

De acordo com Ferrazzano et al. (2011b) a dieta pode influenciar a experiência de cárie, inibindo ou favorecendo o aparecimento de lesões.

2.4.1 Lipídios/ Ácidos graxos

Segundo Hayes (1984), Aguiar e Saliba (2004), os alimentos gordurosos têm demonstrado um potencial benéfico para a prevenção de cáries, pois estes interferem no processo de aderência bacteriana, sendo capazes de formar uma barreira protetora no esmalte, interferindo na adesão das bactérias do biofilme às superfícies dentárias, reduzindo-as. Além disso, as gorduras dos alimentos podem circundar os carboidratos e torná-los menos disponíveis às bactérias, facilitando sua eliminação da cavidade bucal.

De acordo com Hayes e Berkowitz (1979), Quivery-Jr et al. (2000), Duarte et al. (2006b), os ácidos graxos atuam como surfactantes aniônicos, possuem propriedades antibacteriana a baixos valores de pH e, além disso, podem alterar a estrutura e função de paredes celulares bacterianas afetando a capacidade da bactéria de tolerar ácidos.

Dentre esses ácidos graxos, os ácidos oleico (monoinsaturado) e linoleico (poliinsaturado) foram identificados por Osawa et al. (2001) como sendo os principais agentes bactericidas da semente de cacau em células de *S. mutans*. Os referidos autores atribuem esta propriedade às suas características lipofílicas e efeitos membranotrópicos, gerando danos na integridade da membrana celular do microorganismo.

Óleos vegetais são fontes de ácidos graxos mono e poliinsaturados, que são considerados efetivos para promoção de saúde (De Lorgeril; Salen, 2006). Podem ser obtidos de plantas oleaginosas ou sementes e tem diversidade de usos em muitas culturas ao longo dos séculos. Sua incorporação já ocorreu em diversos ramos do conhecimento, como indústria de cosméticos, alimentos, produtos para saúde e novas tecnologias (Kensche et al., 2013).

De acordo com Reich et al. (2012), os lipídios compreendem em média 25% do peso seco da película e assumem importância considerável para proteção do esmalte. Estudo conduzido por estes autores para determinar a composição de ácidos graxos da película mostrou que os ácidos palmítico, esteárico e oleico foram os principais encontrados.

Estudos conduzidos por Gibbons e Etherden (1983) constataram que a extração experimental *in vitro* dos lipídios da película resultou no aumento do número de *Streptococcus mutans*. Trinta anos depois, Kensche et al. (2013) afirmam que o enriquecimento de lipídios na formação da película pode alterar suas propriedades físico-químicas, dificultando a adesão bacteriana, pois os lipídios conferem características hidrofóbicas a superfície dental dificultando a colonização de bactérias e diminuindo a susceptibilidade a cárie

Green e Hartles (1966) incorporaram 5% de óleo de amendoim na dieta cariogênica de ratos, observando que houve redução significativa da incidência de cárie nos animais.

Aguiar e Saliba (2004) realizaram um estudo para avaliar a eficácia do óleo de amêndoas na eliminação do biofilme dental e concluíram que o dentifrício experimental, com o óleo de amêndoas, foi capaz de reduzir o biofilme quando comparado a um dentifrício comum de baixa abrasividade.

Da mesma forma, Filogônio et al. (2011) testaram a incorporação de um óleo vegetal proveniente da *Bertholletia excelsa* (castanha-do-Pará) em um dentifrício comercial para o controle do biofilme dental, constatando que a inserção do óleo trouxe efeitos benéficos para a saúde bucal, pois foi capaz de reduzir o quantitativo de biofilme em comparação ao dentifrício sem o óleo vegetal.

Asokan et al. (2011) mencionam que em muitas culturas, a lavagem da boca com óleos comestíveis como óleo de cártamo, gergelim e linhaça, faz parte dos cuidados corporais, para eliminação de bactérias da cavidade oral. Com base nisso, Hanning et al. (2012) em um estudo combinado *in situ* e *in vitro*, avaliaram as

propriedades protetoras do óleo de cártamo na película, bem como na erosão do esmalte dental. Constataram que o óleo de cártamo alterou a ultraestrutura da película pelo acúmulo de vesículas lipídicas, entretanto, não retardou sua desintegração diante de um desafio erosivo, aumentando a perda de cálcio e fosfato do esmalte.

Hanning et al. (2013) avaliaram o efeito de bochechos com os óleos de cártamo, oliva e linhaça na colonização bacteriana inicial do biofilme dental. Observaram que estes óleos comestíveis não tiveram impacto significativo no padrão inicial e quantidade de bactérias colonizadoras do biofilme.

Kensche et al. (2013) relatam que os óleos e alimentos contém grande número de substâncias químicas e que estas podem reagir de diferentes formas. Por isso, é imprescindível que se identifique as frações dos óleos ou alimentos utilizados nos estudos que exerce o efeito protetor.

2.4.2 Polifenóis

Os compostos polifenólicos são encontrados em uma grande variedade de vegetais, sementes e frutas. Apresentam propriedades antioxidantes e antimicrobianas. Em relação a cárie, os efeitos dos polifenóis em estudos *in situ* e *in vivo* tem demonstrado ação bactericida contra *S. mutans*, interação com proteínas da membrana microbiana inibindo a adesão de células bacterianas na superfície do dente, a inibição da glicosiltransferase (Ferrazzano et al., 2011a) e a inibição da atividade da amilase salivar, reduzindo a cariogenicidade de alimentos que contém amido (Wang et al., 2013). Entre os polifenóis, as biomoléculas que parecem mediar as reações são as catequinas e os flavonóides (Tomczyk et al., 2010).

Duarte et al. (2006a) demonstraram em seus estudos com o *Vaccinium macrocarpon* (cranberry) que os efeitos de redução de células bacterianas, redução na formação de biofilme dental e inibição da glicosiltransferase, foram decorrentes da atividade biológica de um complexo de polifenóis.

Tomczyk et al. (2010) avaliaram *in vitro* o potencial inibitório, do extrato de 10 espécies de *Potentilla* em *S. mutans* e observaram que, a alta concentração de

polifenóis encontrado nas espécies foi capaz de inibir a atividade antimicrobiana de *S. mutans* e inibir a formação do biofilme dental.

Devido ao alto consumo de chá principalmente em países de cultura oriental, esta bebida tem sido muito estudada nos últimos anos (Gazzani et al., 2012). Sendo assim, Ferrazzano et al. (2011b) realizaram um estudo *in vivo* para testar a efetividade de um bochecho com extrato de chá verde na redução dos níveis de *S. mutans* e *Lactobacillus* na saliva. O experimento mostrou redução significativa dos níveis salivares dessas bactérias cariogênicas, sendo esta ação atribuída às propriedades antibacterianas dos polifenóis associada à inibição da aderência de células bacterianas à superfície dental.

Com o objetivo de verificar o mecanismo de ação dos polifenóis na inibição de *S. mutans*, Wang et al. (2013) investigaram 5 marcas de chá comercializadas na Malásia e, constataram que o extrato de um chá parcialmente fermentável (oolong tea) reduziu a adesão das bactérias à superfície dental, sugerindo que esta ação ocorreu devido aos flavonóides e catequinas que provavelmente cobriram a superfície das células bacterianas, afetando a interação entre estas e o substrato dental.

2.4.3 Caseína

De acordo com Aimuts (2004), Shetty et al. (2011) o leite e seus derivados contêm vários agentes que podem apresentar efeitos cariostáticos. Isso pode estar relacionado ao conteúdo de cálcio e fósforo, ao tamponamento de ácidos ou ao conteúdo de caseína fosfopeptídeos. Com base nesta premissa, Ferrazzano et al. (2008) testaram a capacidade deste composto, presente naturalmente no iogurte, em prevenir a desmineralização e promover a remineralização em molares humanos *in vitro*, e observaram que o extrato do iogurte mostrou ação remineralizante. A caseína apresentou atividade anticariogênica devido sua capacidade de se unir a hidroxiapatita, reduzindo sua solubilidade e inibindo a glicosiltransferase, o que dificulta a adesão de *S. mutans* à película. Além disso, ainda elevou o pH do biofilme dental e estabilizou os níveis de fósforo de cálcio sobre a superfície do esmalte.

Levine (2001) propõe que, a adsorção de proteínas ou da gordura do leite pela superfície do esmalte, ou ainda, a redução do crescimento bacteriano ocasionado pelas enzimas presentes no leite, causam diminuição nos processos de desmineralização.

Shetty et al. (2011) compararam a desmineralização do esmalte humano *in vitro* com a ação do leite bovino e leite humano na ausência das frações sugeridas como protetoras (caseína, proteínas do soro do leite e gordura). Os resultados encontrados mostraram que a remoção das frações protetoras aumentaram a dissolução da hidroxiapatita. Além disso, observaram que a caseína é o fator protetor mais importante do leite humano, enquanto as proteínas do soro do leite são as frações protetoras mais importantes do leite bovino.

2.4.4 Outros componentes alimentares com ação protetora

A lectina é uma proteína encontrada em plantas. Segundo Ramstorp et al. (1982) cenouras e sementes apresentam lectina em sua composição, que contém receptores específicos para determinadas bactérias, levando-as a agregação, como acontece com os *S. mutans*, o que inibe sua aderência à película. Bowen (1994) relata que as lectinas podem reagir com os carboidratos e/ou com constituintes salivares, e mudar a composição da película, dificultando a adesão bacteriana. Isso foi mostrado no estudo de Moura et al. (2005) em que a lectina encontrada na semente de *Canavalia brasiliensis* (feijão-bravo-do-Ceará) foi capaz de se ligar à película e inibir a adesão de estreptococos.

Lingström et al. (2012) mostraram em seu estudo, com o extrato do cogumelo shiitake, que bochechos frequentes com este extrato reduz a atividade metabólica do biofilme dental.

2.5 TUCUMÃ (*Astrocaryum vulgare*)

O tucumanzeiro é uma palmeira nativa do norte da América do Sul, encontrada principalmente no Pará, leste da Amazônia, Guiana Francesa e Suriname. Desenvolve-se bem em regiões de solo pobre, próximo a rios, em áreas não cobertas por água. No Pará, a espécie mais comumente encontrada é o *Astrocaryum vulgare*. A espécie é reconhecida por ter vários troncos e frutos pequenos e alaranjados. Os frutos servem para alimentação humana e animal, sendo caracterizados como fonte alimentícia altamente calórica, devido ao alto teor de lipídios da polpa e expressiva quantidade de caroteno, fibras e vitamina E (Ferreira et al., 2008).

De acordo com Shanley e Medina (2005), o tucumanzeiro frutifica na época chuvosa, de janeiro a abril e os frutos, produzidos em cachos, apresentam em sua polpa cerca de três vezes mais vitamina A que a cenoura. Além desta, também apresenta grande quantidade de vitamina B1, vitamina C, proteínas e óleo.

Os frutos possuem cerca de 32% de polpa, 55% de semente e 13% de casca, onde a semente tem 51% de óleo e a polpa 45%, sendo ambos potencialmente extraíveis (Pastore-Júnior et al., 2005).

Segundo Clement et al. (2005), apesar das características organolépticas e nutritivas do tucumã, poucos estudos têm sido realizados com este fruto a fim de contribuir para o seu aproveitamento, sendo sua comercialização caracterizada por um mercado meramente local. Entretanto devido riqueza de óleo em seus frutos, apresenta potencial para aplicação na indústria farmacêutica, alimentícia e cosmética (Santos et al., 2013).

De acordo com Ferreira et al. (2008), Rodrigues AMC et al. (2010), Bony et al. (2012), Santos et al. (2013) o óleo de tucumã, extraído da polpa, contém, em média, 29% de ácidos graxos saturados e 69% de insaturados. Dentre os ácidos graxos insaturados, o ácido oléico foi o que apresentou maior proporção, representando, em média, 65%. Já dentre os ácidos saturados, o ácido palmítico foi o que apresentou maior concentração (22% em média).

Bony et al. (2012) realizaram um estudo para caracterizar o óleo da polpa do tucumã e testar suas propriedades anti-inflamatórias *in vivo*. Constataram a presença de várias moléculas com capacidade antioxidante e anti-inflamatórias,

como ácido oleico (63,5%), carotenóides (1637µg/g) e tocoferóis (148µg/g). No experimento *in vivo*, os autores utilizaram um modelo experimental em ratos, que foram submetidos a processos inflamatórios agudo e crônico. O tratamento com o óleo da polpa do tucumã foi capaz de reduzir as citocinas pró-inflamatórias e aumentar as citocinas anti-inflamatórias, mediando o processo inflamatório. Os autores sugerem que este resultado se deve a presença dos ácidos graxos, principalmente do ácido oleico e, em menor proporção, aos demais componentes do óleo como carotenóides.

Pesquisa realizada por Jobim et al. (2013) testou a atividade antimicrobiana do tucumã frente a 37 microorganismos, assim como o papel do extrato no mecanismo de equilíbrio do metabolismo oxidativo. Os resultados mostraram que o extrato da polpa e casca do tucumã apresentou atividade antibacteriana (bactérias Gram-positivas) e antifúngica (*Candida albicans*), sendo que o mecanismo de ação parece envolver o desequilíbrio redox, causando a morte dos microorganismos. Essa ação é atribuída pelos autores, à combinação dos componentes químicos do fruto, como carotenos e polifenóis, que tem a capacidade de sequestrar os radicais livres.

2.6 PUPUNHA (*Bactris gasipae*)

A pupunheira é uma palmeira encontrada na América Central e no Nordeste da América do Sul. No Brasil é uma planta nativa da região amazônica, bastante comum nos estados do Pará, Amazonas, Acre e Amapá (Yuyama et al., 2003). Frutifica entre dezembro e março e seu fruto, a pupunha, é formada de 90% de polpa e 10% de semente. A polpa fresca tem entre 1% a 9% de proteína, 2% a 30% de óleo e 10% a 40% de carboidrato (Shanley; Medina, 2005). Apresenta considerável quantidade de β-caroteno (pró-vitamina A), vitaminas B2 e C, além de ser fonte de óleos vegetais e ácidos graxos (Araújo et al., 2000; Pastore-Júnior et al., 2005). Atualmente, a utilização da pupunha é limitada ao consumo direto após o cozimento, apesar de estudos mostrarem a aplicação da farinha da polpa para o enriquecimento de alimentos, devido ao seu alto poder nutritivo (Oliveira; Marinho, 2010).

De acordo com Hammond et al. (1982), dentre os ácidos graxos presentes no mesocarpo da pupunha, o ácido oléico foi o que se apresentou em maior proporção, 50,3%. Yuyama et al. (2003), Santos et al. (2013) mencionam que a polpa da pupunha apresenta alto teor de lipídios (17% em média) sendo o ácido oleico (monoinsaturado) o mais abundante, variando na composição entre 42 a 60%, seguida pelo ácido saturado palmítico, que se apresenta entre 25 e 40% do total de lipídios.

Jatunov et al. (2010) avaliaram os carotenóides presentes em diferentes espécies de pupunha e encontraram que independente da espécie, a quantidade de carotenóides variou entre 11 a 223 µg/g, sendo o β-caroteno, o principal.

De acordo com Melhorança-Filho e Pereira (2012), a pupunha é uma das espécies amazônicas que precisa de mais estudos, inclusive na avaliação de suas propriedades em bactérias causadoras de doenças. Assim, os autores avaliaram o potencial antimicrobiano do óleo extraído da casca, polpa e semente da pupunha no desenvolvimento de *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. Observaram que o óleo da casca foi efetivo contra *Staphylococcus aureus*, mas não exerceu efeito inibidor em *Pseudomonas aeruginosa*. Os óleos da polpa e da semente não apresentaram inibição nas espécies bacterianas estudadas.

2.7 ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse oxidativo se constitui no desequilíbrio entre a produção de radicais livres e substâncias antioxidantes presentes no meio, que resulta na indução de danos celulares (Bianchi; Antunes, 1999).

O aumento na produção desses radicais pode ocorrer devido ao aumento na quantidade de oxigênio em tecidos e órgãos e à exposição das células ou indivíduos a certos componentes químicos, à radiação ou à inflamação tecidual (Silva et al., 2011).

Segundo Barreiros et al. (2006) os radicais livres apresentam elétron desemparelhado centrado no átomo de oxigênio ou nitrogênio. Isso faz com que se tornem moléculas instáveis e altamente reativas (Halliwell, 1994). Os principais radicais livres são hidroxila ($\text{OH}^\cdot$), superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), nitritos ($\text{NO}_2^\cdot$) e os não-radicais

oxigênio singlete e peróxido de hidrogênio, mas que são facilmente convertidos em radicais. Enquanto alguns deles podem reagir atacando lipídios, proteínas e DNA, outros são reativos apenas com os lipídios, apresentando efeitos prejudiciais como a peroxidação dos lipídios das membranas celulares (Halliwell; Whitman, 2004).

Os radicais livres são formados constantemente pelo organismo, pois a oxidação faz parte da vida aeróbia e do metabolismo celular. De uma certa forma, eles contribuem para o funcionamento normal do organismo. Entretanto, a concentração de radicais livres pode superar a capacidade do organismo de eliminá-los, devido maior produção intracelular ou então, ineficiência dos mecanismos antioxidantes (Castelo-Branco; Torres; 2011).

De acordo com Bianchi e Antunes (1999), o primeiro mecanismo de defesa contra os radicais livres é impedir sua formação. As substâncias antioxidantes do próprio organismo, ou obtidas da dieta exercem essa função, principalmente impedindo a ação dos radicais nas duplas ligações dos ácidos graxos e nas proteínas.

Os antioxidantes são considerados como qualquer substância que quando presente em baixas concentrações comparada ao do substrato oxidável, previne significativamente a sua oxidação (Halliwell, 1994). Funcionam como antioxidantes o α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno (pró-vitamina A), ácido ascórbico (vitamina C) e os compostos polifenólicos, como os flavonóides. Estas substâncias agem de diferentes formas, seja impedindo as reações em cadeia ou sequestrando os radicais livres (Halliwell, 2009). No entanto, sabe-se que muitos compostos tradicionalmente considerados como antioxidantes, muitas vezes exercem funções não antioxidantes, incluindo a manutenção do equilíbrio redox pela estimulação à resposta antioxidante (Wootton-Beard; Ryan, 2011).

Muitos métodos tem sido usados para a mensuração da capacidade antioxidante em diferentes tecidos e diversos fluidos biológicos, como sangue, saliva, lágrima e urina (Halliwell, 2009; Fraga et al., 2013). É frequente a utilização do análogo sintético da vitamina E (Trolox) como composto de referência para essa detecção, sendo a capacidade antioxidante medida em equivalência ao Trolox (Niki, 2010). O ensaio da capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC) estima a capacidade dos agentes antioxidantes presentes na amostra em eliminar o radical cromóforo ABTS+ [2,2'-azino-bis-(3-etil-benzotiazolina)-6-sulfônico], que tem sua

absorbância reduzida à medida que reage com os antioxidantes presentes na amostra analisada (Castelo-Branco; Torres, 2011).

2.8 MICRODUREZA SUPERFICIAL KNOOP (KHN)

De acordo com Donassollo et al. (2007), a dureza superficial é a medida da resistência à deformação plástica que os materiais ou os diferentes substratos apresentam. É uma propriedade bastante utilizada para mensurar o conteúdo mineral de tecidos biológicos, como um indicativo de mineralização, desmineralização ou remineralização ou o estado de reação de presa e grau de polimerização de materiais (Rodrigues RA et al., 2010).

Zero (1995) considera que o ensaio de microdureza superficial é um método sensível e confiável para mensurar as perdas minerais iniciais.

Segundo Meredith et al. (1996), as médias de dureza Knoop para o esmalte estão entre 272 e 440 KHN e para a dentina, entre 50 e 70 KHN.

Tenuta et al. (2003) utilizaram o ensaio de microdureza Knoop para testar o efeito *in situ* do acúmulo de biofilme dental na desmineralização do esmalte em 3 períodos distintos (4, 7 e 10 dias), observando que a perda mineral foi crescente com o avançar do tempo e que com 4 dias já são notadas perdas minerais significantes na superfície do esmalte.

Palti et al. (2008) avaliaram a microdureza superficial do esmalte dental em diferentes estágios eruptivos de dentes humanos (dentes inclusos; dentes após 3 anos de irrompidos; até 10 anos e com mais de 10 anos de erupção) e verificaram a tendência de aumento na microdureza ao longo dos anos, mostrando que os dentes não erupcionados foram os que apresentaram menor dureza de superfície (375,8 KHN), enquanto os dentes erupcionados a mais de 10 anos foram os que exibiram maior KHN (390,7). Entretanto o valor de KHN foi estatisticamente diferente apenas entre os dentes não irrompidos e os dentes com mais de 10 anos após erupção.

Estudo *in situ* conduzido por Brighenti et al. (2012) avaliou o efeito do extrato de folhas de *Psidium cattleianum* (araçá) na desmineralização do esmalte dental, utilizando o ensaio de microdureza Knoop superficial. Os resultados mostraram

considerável redução da desmineralização do esmalte no grupo que testou o extrato, sendo estes resultados atribuídos a composição química de polifenóis.

2.9 TOMOGRAFIA POR COERÊNCIA ÓPTICA (OCT)

Tomografia por coerência óptica é uma tecnologia de diagnóstico por imagem, baseado na interferometria de baixa coerência, capaz de produzir imagens transversais de alta resolução, da microestrutura interna de tecidos vivos (Freitas et al., 2006; Freitas et al. 2009).

De acordo com Otis et al. (2000) e Jones et al. (2006), o princípio da interferometria de baixa coerência em que se baseia a OCT é semelhante ao ultra-som, visto que as duas técnicas estão relacionadas com as medidas de “ecos” provenientes de estruturas presentes nos tecidos, medindo o sinal refletido ou retroespalhado. Entretanto, o OCT utiliza luz ao invés de ondas acústicas, e pode atingir uma resolução espacial até 10 vezes maior que o ultra-som sem necessitar de contato direto com o tecido a ser analisado.

Esta técnica tem sido muito utilizada para diagnósticos de tecidos biológicos em diferentes áreas da saúde, entretanto, apenas no século passado aconteceram os primeiros estudos para a avaliação da imagem de tecidos mole e duro da cavidade bucal (Fried et al., 2005). Desde então, o método tem sido testado em diversas aplicações na Odontologia, como avaliação da interface dente-restauração (Melo et al., 2005), análise da performance de materiais (Braz et al., 2009), diagnóstico de cáries iniciais (Freitas et al., 2009) e avaliação da remineralização do esmalte dental (Mandurah et al., 2013).

Para Popescu et al. (2008), na formação da imagem de OCT, cada sinal corresponde a uma varredura axial da amostra (A-scan) e sua amplitude é proporcional à intensidade da luz retroespalhada em função da profundidade. A translação do feixe de luz em relação à amostra gera uma série destes sinais em função da posição transversal (B-scan). Assim, há uma associação entre o sinal de intensidade de luz retroespalhada captada para a posição A-scan e para o B-scan. A conversão dos valores de intensidade do B-scan em tonalidades numa escala de cores falsas possibilita a obtenção de imagens bidimensionais da

amostra. As cores brancas e pretas representam os sinais de alta e baixa intensidade, respectivamente, com níveis de cinza intermediários que não são visíveis a olho nu (Azevedo et al., 2011).

Segundo Karlsson (2010), o aumento da porosidade no esmalte decorrente da desmineralização resulta em mudanças nas propriedades ópticas do tecido dental. Neste aspecto, Choo-Smith et al. (2008) mencionam que o esmalte sadio causa alta intensidade de retroespalhamento de luz, que diminui rapidamente com a profundidade. Em contraste, as lesões incipientes causam retroespalhamento de luz na superfície e subsuperfície, indicando a presença de porosidades decorrentes da desmineralização. De acordo com White e Featherstone (1987), o limitante da penetração óptica do OCT em profundidade é principalmente o processo de espalhamento da luz em relação a sua absorção. Por isso, a profundidade da amostra avaliada deve variar de 1 a 3mm, pois devido à natureza destes tecidos, o coeficiente de espalhamento e coeficiente de absorção que dependem do comprimento de onda, podem prejudicar a quantidade de luz retroespalhada em profundidades maiores (Freitas et al., 2010).

As imagens obtidas pelo método de OCT podem ser avaliadas de forma qualitativa, como as realizadas no estudo de Maia et al. (2010) e Azevedo et al. (2011) ou quantitativamente, por análise dos parâmetros relacionados a amplitude do sinal, como o coeficiente de atenuação óptica, executadas nas pesquisas de Popescu et al. (2008) e Mandurah et al. (2013). A amplitude do sinal de OCT detectado é maior para o esmalte desmineralizado quando comparado ao esmalte sadio (Popescu et al., 2008).

Para a medição quantitativa das propriedades ópticas baseadas na propagação de luz, o coeficiente de atenuação óptica tem mostrado resultados promissores em discriminar entre estados saudáveis e doentes de vários tecidos, incluindo o tecido dental (Mandurah et al., 2013).

Popescu et al. (2008) utilizaram a medida do sinal de atenuação óptica pelo método de OCT para detectar lesões de cárie incipiente em esmalte de 21 molares extraídos. Observaram que a média do coeficiente de atenuação para dentes sadios foi maior (média de $1,35\text{mm}^{-1}$) do que em dentes com lesão (média de $0,77\text{mm}^{-1}$).

Arnaud et al. (2010) empregaram a técnica qualitativa do OCT para avaliar *in vitro* o efeito da quitosana na desmineralização e remineralização do esmalte dental, constatando que a quitosana penetrou nos poros do esmalte desmineralizado,

revelando pelas imagens de OCT, o espalhamento de luz, com intenso brilho apenas na área onde foi aplicado o produto. Isso favoreceu uma proteção contra a desmineralização.

De Cara (2012) utilizou o coeficiente de atenuação óptica para mensurar a perda mineral *in vitro* de espécimes submetidas a indução de desmineralização nos tempos experimentais de 7, 14 e 21 dias, observando que o coeficiente de atenuação foi maior com 21 dias, devido o processo de desmineralização criar espaços vazios na estrutura do esmalte dental, fazendo aumentar o espalhamento da luz. Da mesma forma, observou tendência de aumento na área sob a curva do sinal de atenuação de OCT, à medida que aumentava o tempo de desmineralização induzida.

Em seu estudo, Mandurah et al. (2013) avaliaram as mudanças ópticas e o coeficiente de atenuação durante a remineralização do esmalte e concluíram que o coeficiente de atenuação foi capaz de monitorar as mudanças que ocorrem no esmalte, mostrando-se maior na desmineralização, e diminuindo após a aplicação de substâncias remineralizadoras.

3 OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL:

Analisar a influência dos óleos do tucumã e da pupunha na dinâmica do processo de desmineralização do esmalte, relacionado à composição do biofilme dental e formação da cárie dentária inicial.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Analisar a interferência dos óleos do tucumã e da pupunha:

- a. Na agregação de microorganismos cariogênicos;
- b. Na atividade antioxidante dos óleos no biofilme;
- c. No processo de perda mineral do esmalte dental.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

Por envolver a participação de seres humanos, e de acordo com a Resolução do Conselho Nacional de Saúde 466/2012, o presente estudo foi submetido a apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará (CAEE 0043.0.073.000-11) sendo aprovado sob nº 049/11 (Anexo A). Suas fases foram conduzidas no sentido de garantir exposição mínima a riscos e proteção à integridade dos indivíduos.

4.2 EXTRAÇÃO DOS ÓLEOS VEGETAIS

Os óleos da pupunha e do tucumã foram extraídos no Laboratório de Operações de Separação (LAOS) da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Federal do Pará.

4.2.1 Extração do óleo do tucumã (*Astrocaryum vulgare*)

Para a extração do óleo do tucumã foram utilizados 22Kg de fruto adquiridos na época de alta estação do fruto, em uma plantação particular na cidade de São Caetano de Odivelas, no Estado do Pará. Após a retirada dos frutos do cacho, estes foram sanificados com água corrente e selecionados.

Uma amostra de 100 frutos foi utilizada para biometria, com o intuito de caracterização da espécie adquirida, sendo avaliados: comprimento, diâmetro, massa do fruto e massa do fruto sem a semente (polpa + casca), de acordo com protocolo estabelecido pelo LAOS.

Tabela 4.1 - Valores médios e desvio padrão da biometria do tucumã

	Comprimento (mm)	Diâmetro (mm)	Massa do fruto (g)	Polpa + Casca (g)
Média e DP	38,77 ± 2,38	33,87 ± 1,62	27,14 ± 3,97	14,29 ± 2,68

Figura 4.1 - Biometria do tucumã. A: Comprimento; B: Diâmetro; C: Massa do fruto; D: Polpa+Casca

Os frutos foram despulpados, produzindo um rendimento de 9800g de polpa úmida. Esta massa foi levada para a estufa de circulação de ar (Fabbe Ltda., São Paulo, Brasil) durante 24 horas, à 60°C, para que fosse removido 95% da umidade da polpa.

Figura 4.2 - A: Despulpamento do fruto; B: Polpa do tucumã

Após a desidratação, os 5877g de massa seca foram prensados a frio, isento de solventes, em prensa hidráulica (Siwa Equipam. Hidráulicos Ltda., Atibaia, Brasil), e a torta resultante desta prensagem foi levada à prensa mecânica MPE40AC (Ecirtec Ltda., Bauru, Brasil) para maior aproveitamento do óleo. O óleo obtido foi filtrado utilizando um filtro de Büchner. Ao final da filtragem, o óleo foi dispensado em recipiente de vidro tampado, protegido da luz, e refrigerado a 5°C. Ao todo foram obtidos aproximadamente 500g de óleo de tucumã.

Procedeu-se análises físico-químicas com o óleo e a matéria-prima, de acordo com protocolos estabelecidos no LAOS. Assim, foram executados: teor de umidade, teor de lipídios, índice de saponificação, análise de cinzas e espectrofotometria de acordo com método proposto por Souza et al. (2004) para determinar o teor de carotenos (Apêndice A). Para a determinação do teor de ácidos graxos foi utilizada a cromatografia gasosa, realizada no Laboratório de Análises de Combustíveis da Universidade Federal do Pará (Apêndice B).

Figura 4.3 - Óleo e frutos de tucumã

4.2.2 Extração do óleo da pupunha (*Bactris gasipae*)

Para a extração do óleo da pupunha foram utilizados 17Kg de fruto adquiridos na época de alta estação do fruto, em uma plantação particular na cidade de Vigia, Estado do Pará. Após a retirada dos frutos do cacho, estes foram sanificados com água corrente e selecionados.

Uma amostra de 100 frutos foi utilizada para biometria, com o intuito de caracterização da espécie adquirida, sendo avaliados: comprimento, diâmetro, massa do fruto, polpa e casca, de acordo com protocolo estabelecido pelo LAOS.

Tabela 4.2 - Valores médios e desvio padrão da biometria da pupunha

	Comprimento (mm)	Diâmetro (mm)	Massa do fruto (g)	Polpa (g)	Casca (g)
Média e DP	41,14 ± 3,67	37,14 ± 4,20	32,58 ± 7,35	23,97 ± 5,44	5,00 ± 1,26

Figura 4.4 - Biometria da pupunha. A: Comprimento; B: Diâmetro; C: Massa do fruto; D: Polpa; E: Casca

Os frutos foram despulpados, produzindo um rendimento de 12150g de polpa úmida. Esta massa foi levada para a estufa de circulação de ar (Fabbe Ltda., São Paulo, Brasil) durante 24 horas, à 60°C, para que fosse removido 95% da umidade da polpa.

Figura 4.5 - A: Despulpamento do fruto; B: Polpa da pupunha

Após a desidratação, obteve-se 6440g de massa seca. Devido as características do óleo da pupunha não permitirem a extração por prensagem, utilizou-se como método, a extração por fluido supercrítico, que tem como objetivo, a obtenção de produtos isentos de resíduos tóxicos e que geralmente possuem uma qualidade elevada quando comparados aos produtos obtidos por técnicas convencionais (Araújo et al., 2000). O dióxido de carbono é o fluido supercrítico mais utilizado como solvente por ser de baixo custo, não inflamável, obtido com abundância e alta pureza, não deixando resíduos no óleo obtido.

A massa seca da pupunha foi triturada em moinhos de facas e de rotor (TE048 tipo Willye e TE090 de marca TECNAL) e acondicionada em sacos plásticos.

A extração foi realizada a pressão de 25 MPa, temperatura de 50°C e vazão de gás carbônico (CO₂) de 10L/min. A polpa seca e moída foi introduzida em um leito de aço inox adaptado no extrator. O equipamento foi inicialmente carregado com gás carbônico até o extrator atingir a pressão de trabalho. Quando a pressão de extração foi atingida, o dióxido de carbono supercrítico iniciou a extração no conjunto extrator/leito de inox, permanecendo em contato com a polpa durante 15 minutos (tempo estacionário). Isto foi feito para que o extrato entrasse em contato com o gás e se solubilizasse. Em seguida, as válvulas que permitem a passagem de gás para o coletor foram abertas e o extrato foi coletado em recipiente de vidro, levado à estufa microprocessada de circulação forçada de ar (Quimis, mod. Q314M122) a 60°C até que o material obtido descongelasse e ficasse isento de CO₂. Após a retirada da estufa, o frasco com o extrato foi acondicionado em dessecador com sílica durante 30 minutos, para entrar em equilíbrio térmico e armazenado em refrigerador a 5°C. Foram obtidos aproximadamente 400g de óleo de pupunha.

Procedeu-se análises físico-químicas com o óleo e a matéria-prima, de acordo com protocolos estabelecidos no LAOS. Assim, foram executados: teor de umidade, teor de lipídios, índice de saponificação, análise de cinzas e espectrofotometria de acordo com método proposto por Souza et al. (2004) para determinar o teor de carotenos (Apêndice A). Para a determinação do teor de ácidos graxos foi utilizada a cromatografia gasosa, realizada no Laboratório de Análises de Combustíveis da Universidade Federal do Pará (Apêndice B).

Figura 4.6 - Óleo e frutos de pupunha

4.3 PREPARO DOS BLOCOS DE ESMALTE

Foram utilizados 90 terceiros molares humanos não irrompidos, extraídos por indicação terapêutica e não relacionados a esta pesquisa, para obtenção dos 96 blocos de esmalte nas dimensões de 3mm x 3mm x 3mm, obtidos das faces mais planificadas dos dentes, podendo ser vestibular, lingual, mesial e distal.

Após a exodontia, os dentes foram esterilizados por imersão em formaldeído 2% e pH 7,0, por no mínimo, 30 dias, sendo a solução trocada periodicamente (White, 1987; Ccauhana-Vásques; Cury, 2010).

Para a confecção e secção dos blocos de esmalte, os dentes foram fixados em cera utilidade (Newwax, Technew Com. Ind. Ltda., Rio de Janeiro, Brasil) para manterem-se rígidos e, primeiramente, seccionados ao nível da junção amelocementária, separando a coroa da raiz. Com uma régua milimetrada foi marcado um quadrado nas dimensões 4mm x 4mm com grafite 0.7mm 2B (Pentel) nas superfícies da coroa a serem cortadas.

Para seccionar os blocos foram utilizados discos flexíveis diamantados dupla face (KG Sorensen, Cotia, São Paulo, Brasil) adaptados a peças de mão movidas a um motor elétrico de baixa rotação da marca DabiAtlante (peça reta), sob refrigeração à base de água deionizada para evitar trincas no esmalte.

Após a obtenção dos espécimes, as medidas foram checadas com o auxílio de um paquímetro digital e armazenados em recipientes plásticos com tampa, envoltos por gaze umedecida com água deionizada e guardados em refrigerador.

Figura 4.7 - Obtenção dos blocos de esmalte. A: Seccionamento do dente ao nível de junção amelocementária; B: Marcação da área da coroa a ser cortada; C: Obtenção dos blocos de esmalte; D: Checagem de medidas com paquímetro digital; E: Blocos de esmalte utilizados no estudo

4.4 ANÁLISE DA MICRODUREZA SUPERFICIAL INICIAL E SELEÇÃO DOS BLOCOS DE ESMALTE

Para análise da microdureza superficial, os blocos de esmalte foram planificados e polidos, em politriz universal Aropol-E (Arotec, São Paulo, Brasil) com 50 rotações por minuto (rpm), utilizando-se lixas d'água com granulação seqüenciada de 1200, 1500 e 2000 sob refrigeração à água deionizada, para obtenção de uma superfície plana.

A medida da microdureza superficial inicial foi realizada em microdurômetro (FM-700, Future Tech Corp., Tokyo, Japan) utilizando-se um penetrador de diamante piramidal tipo Knoop, com carga estática de 25g aplicada por 5 segundos (Moi et al., 2008; Queiroz et al., 2008; Ccahuana-Vásques; Cury, 2010).

Na superfície de cada bloco foram realizadas três endentações paralelas e com 50µm de distância uma da outra e, no mínimo, a 1000µm da lateral do bloco. Esta área não apresentava trincas e permitia a realização de outras três endentações a 100µm de distância das primeiras, para análise da microdureza superficial, após os desafios cariogênicos.

Foi medido o comprimento da diagonal maior das endentações, utilizando-se o software do microdurômetro. Para cada bloco de esmalte foi obtida a média

aritmética das três endentações realizadas. A média de dureza do esmalte (272 a 440KHN) proposta por Meredith et al. (1996) foi utilizada como padrão. Assim, foram excluídos os blocos de esmalte que apresentaram valores de KHN fora desses parâmetros, assim como, os blocos com 20% abaixo ou 20% acima da média de KHN de todos os blocos, para a redução do desvio padrão e menor variabilidade de dureza entre os espécimes.

Após selecionados, os blocos de esmalte foram identificados, embalados individualmente em papel grau cirúrgico e esterilizados em autoclave, sendo distribuídos aleatoriamente para cada grupo de tratamento.

Figura 4.8 - A: Polimento dos espécimes em politriz; B: Análise de microdureza Knoop

4.5 SELEÇÃO DE VOLUNTÁRIOS

Foram selecionados 08 adultos jovens, com idade entre 21 e 25 anos, alunos de graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Pará (UFPA). Para isso, foram considerados como critérios de exclusão: fumantes, gestantes, utilização recente ou atual de antibióticos e medicamentos que alterem o fluxo salivar, estar em tratamento de radioterapia ou quimioterapia, apresentar doenças sistêmicas que gerem manifestações orais, presença de doença periodontal ou lesões de cárie ativa, fazer uso de prótese, aparelho ortodôntico ou placas oclusais e não aceitar firmar o termo de consentimento livre e esclarecido.

Oito dias antes do início do experimento e após a finalização do período experimental, todos os voluntários do estudo receberam profilaxia profissional e aplicação tópica de flúor neutro (Flúor gel DFL, Rio de Janeiro, Brasil).

4.6 PREPARO DOS DISPOSITIVOS PALATINOS

O arco superior de cada voluntário foi moldado com hidrocolóide irreversível tipo II (Jeltrate Dustless, Dentsply, Rio de Janeiro, Brasil) em moldeiras de inox e vazados em gesso tipo IV (Herostone, Vigodent, Rio de Janeiro, Brasil). A partir disso, foi confeccionado um dispositivo intrabucal palatino, em resina acrílica (Ortoclass Incolor, Clássico, São Paulo, Brasil), para cada voluntário, que foi polido e ajustado a boca para maior conforto. Neste dispositivo foram confeccionados, ao nível de 2^{os} pré-molares e 1^{os} molares, quatro nichos de 4mm x 4mm x 4 mm, sendo dois do lado direito e dois do lado esquerdo, para o armazenamento dos espécimes preparados. Os espécimes de esmalte foram fixados nos nichos da placa com cera pegajosa em bastões (Asfer, São Caetano do Sul, São Paulo, Brasil). Sobre os nichos foi fixada uma tela de nylon (Jon, São Paulo, Brasil) também com cera pegajosa, de forma que o bloco de esmalte ficasse a 1mm da tela, para haver o acúmulo de biofilme dental.

Figura 4.9 - Dispositivo palatino com blocos de esmalte fixados cobertos pela tela plástica

4.7 PROCEDIMENTOS INTRABUCAIS

O presente estudo compreendeu dois tempos experimentais: 07 (sete) e 14 (quatorze) dias.

Os oito voluntários que utilizaram os dispositivos palatinos com os quatro blocos de esmalte (dois do lado direito e dois do lado esquerdo) foram submetidos tanto ao tratamento controle, quanto aos tratamentos experimentais nos dois tempos experimentais.

Os tratamentos a que os blocos de esmalte foram submetidos compreenderam: solução de 20% de sacarose (controle) (Aires et al., 2006); sacarose 20% + óleo de tucumã e sacarose 20% + óleo da pupunha. As formulações foram manipuladas na Farmácia Escola da Universidade Federal do Pará e elaboradas no mesmo dia em que se iniciava cada tempo experimental, sendo trocada a cada 7 dias.

Entre um tratamento e outro ocorreu um intervalo de 13 dias (wash-out), para evitar possíveis efeitos residuais (Cury et al., 1997; Ccahuana-Vásquez et al., 2007). Dessa forma, os oito voluntários utilizaram o tratamento controle por 14 dias, passaram 13 dias sem utilizar o dispositivo palatino (wash-out). Ao final deste período, iniciaram o tratamento com o óleo de tucumã por 14 dias. Ao término deste tratamento, ocorreu mais um período de 13 dias para o wash-out, sem a utilização dos dispositivos palatinos, quando então, todos os voluntários passaram ao tratamento com óleo da pupunha por mais 14 dias. Durante cada tratamento, ao final de 7 dias, foram coletados o biofilme formado e os dois blocos de esmalte mais anteriores do dispositivo palatino. O biofilme coletado foi dispensado em microtubos estéreis (Standard 3810X, Eppendorf do Brasil Ltda., São Paulo, Brasil), enquanto que os espécimes foram colocados em mini recipientes plásticos individualizados (porta comprimidos). Os blocos posteriores, assim como a tela de proteção não foram mexidos, permanecendo lá por mais 7 dias, para completar o tempo experimental de 14 dias.

Ao final dos 14 dias de cada tratamento, coletou-se o biofilme formado e os blocos de esmalte mais posteriores do dispositivo. O dispositivo palatino foi então recolhido, e devidamente limpo, utilizando-se para isso, pastilhas efervescentes de Corega Tabs® (GlaxoSmithKlein, Rio de Janeiro, Brasil), obedecendo as instruções do fabricante. Antes de iniciar um novo tratamento, o dispositivo já limpo, foi preparado, com a fixação de novos blocos de esmalte.

Os voluntários utilizaram o dispositivo palatino durante o dia todo, incluindo a noite e só o removeram durante a alimentação ou para a ingestão de bebidas, exceto água (0,6 – 0,8 mgF/L). Ao removê-lo, o dispositivo era envolvido com gaze umedecida com água deionizada e depositado no estojo ortodôntico, devendo permanecer o menor tempo possível fora da boca.

As formulações foram aplicadas pelos voluntários nos blocos de esmalte fixados nos dispositivos palatinos, 8 vezes por dia (Paes Leme et al., 2004;

Ccahuana-Vásquez et al., 2007). Para isso, o voluntário retirava o dispositivo palatino, agitava vigorosamente o frasco com a solução/ suspensão, e aplicava 1 gota sobre cada espécime, deixando o dispositivo em repouso, fora da cavidade bucal, por 5 minutos, para que a formulação se difundisse no biofilme dental. Para aplicação da formulação com o óleo da pupunha, devido apresentar consistência cremosa, utilizou-se aplicadores descartáveis (Microbrush regular, Vigodent, Rio de Janeiro, Brasil) em que a formulação cobria a cabeça do aplicador e era depositada e pressionada levemente sobre a tela para haver sua penetração.

A primeira exposição às soluções ocorria às 8 horas da manhã e a última, às 22 horas, sendo 1 aplicação a cada 2 horas, totalizando 8 aplicações por dia (Paes Leme et al., 2004; Ccahuana-Vásquez et al., 2007).

Todos os voluntários receberam orientações por escrito (Apêndice C) e um kit contendo 01 escova dental (Curaprox 5460 Ultra Soft, Curaden Swiss do Brasil Import. e Export., São Caetano do Sul, São Paulo, Brasil), 01 tubo de gel dental sem flúor (Bambinos Condor, São Bento do Sul, Santa Catarina, Brasil), 01 rolo de fio dental (Hilo Ind. e Com Ltda., Aperibé, Rio de Janeiro, Brasil), 01 estojo de aparelho ortodôntico removível (Maquira, Maringá, Paraná, Brasil), compressas de gaze hidrófila (Cremer, Blumenau, Santa Catarina, Brasil), 01 frasco borrifador com água deionizada e 01 frasco com as formulações teste, de acordo com seu tratamento experimental. Todos os materiais foram repostos sempre que solicitados pelos voluntários.

Sete dias antes do início dos experimentos, e durante todo o período em que estiveram participando do estudo, os voluntários só utilizaram o gel dental sem flúor, doado pelos pesquisadores e não tiveram contato com qualquer solução antimicrobiana. A dieta alimentar dos voluntários foi mantida como habitual e sem restrições. A higiene bucal era realizada normalmente sem o dispositivo. Este era limpo com escova e gel dental sem flúor, sendo terminantemente proibida a escovação da área que continha os blocos de esmalte.

Figura 4.10 - Material entregue aos voluntários

4.8 ANÁLISE DO BIOFILME DENTAL

Após, aproximadamente, 10 horas da última exposição às soluções, o biofilme dental foi coletado de toda a superfície dos blocos de esmalte (Paes Leme et al., 2004; Aires et al., 2006; Ccahuana-Vásques et al., 2007) e depositado em microtubos estéreis (Standard 3810X, Eppendorf do Brasil Ltda., São Paulo, Brasil) previamente pesados em balança analítica (Marte Shimadzu AY220, São Paulo, Brasil). Parte do biofilme foi coletado com colher de dentina estéril, sendo destinado para a análise microbiológica e, outra parte, coletada com palitos de madeira descartáveis e estéreis, sendo este destinado para análise bioquímica. Independente do instrumento de coleta, esta aconteceu em movimento único vertical, linear de uma extremidade do bloco de esmalte a outra diametralmente oposta. A superfície do instrumento durante a coleta fez ângulo reto com a superfície do bloco de esmalte. Este procedimento visou uniformizar a coleta independente da quantidade de biofilme observado na superfície dos espécimes. A coleta aconteceu sempre no mesmo horário e em ambiente reservado somente para isso na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Pará. Previamente ao período de coleta, foi realizada análise de ambiente para determinar o nível de contaminação microbiológica da sala climatizada. Este controle de qualidade do ambiente permitia a limpeza e desinfecção prévia do local, de maneira apropriada e sem risco de contaminação secundária para as amostras de biofilme no momento da coleta.

4.8.1 Análise microbiológica

Após a coleta, os microtubos foram pesados para determinação da massa de biofilme coletada e, os microtubos destinados a análise microbiológica foram imediatamente transportados a Central de Análise Físico-Química e Microbiológica de Medicamentos do Centro Universitário do Estado do Pará (CESUPA) em recipiente térmico refrigerado, para ser processado.

A massa das amostras foi de aproximadamente 0,01mg. Em cada microtubo com amostra foi acrescentado 0,9mL de solução salina estéril a 0,9%, e realizada diluições seriadas de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} . Para homogeneização das diluições utilizou-se agitador de tubos (Vortex QL-901, Biomixer, São Paulo, Brasil) com 2800 rpm, durante 30 segundos.

Da última diluição, foi retirado com micropipeta (Digipet, Curitiba, Brasil) alíquota de 0,1mL e depositada em placas de petri, seguindo a técnica do *pour plate*, onde a inserção do ágar foi feita ainda líquido para que pudesse se homogeneizar ao inóculo de bactérias.

Os meios de cultura utilizados para semeadura foram (De Lorenzo, 2010): ágar Rogosa (Difco Laboratories, Inc. BD, USA) para *Lactobacillus casei* (Meio 1) e ágar Mitis Salivarius (Difco Laboratories, Inc. BD, USA) para Streptococcus totais (Meio 2). Ao Agar Mitis Salivarius (Difco Laboratories, Inc. BD, USA) foram acrescentados 15% de sacarose, sendo a mistura esterilizada em autoclave, a 121°C, durante 15 minutos e resfriada a 45°C. Em seguida, foi adicionado a essa mistura a 5µL de bacitracina (Sigma-Aldrich, Ribeirão Preto, São Paulo), acrescentada até a concentração final de 0,2 UI/mL (Meio 3). Esta substância foi previamente esterilizada por filtração em membranas de nitrocelulose (Milipore) com poros de 0,22µm de diâmetro. Este meio de cultura foi utilizado para semeadura de *Streptococcus mutans*. O meio de cultura ágar Rogosa foi preparado conforme instruções do fabricante, adicionando-se ácido acético glacial até ser atingido pH 5,4. A mistura foi esterilizada em autoclave, a 121°C, durante 15 minutos, e resfriada a 45°C.

Em seguida, aguardou-se o resfriamento do meio a temperatura ambiente para posterior incubação em estufas microbiológicas por 48 horas a 35°C, sendo as placas de petri dos meios 2 e 3 colocadas em Jarra de Gaspak (método da vela) (Tenuta et al., 2003), para fornecer as condições de microaerofilia necessária ao crescimento de *Streptococcus sp.* Após a incubação, foram contadas as unidades formadoras de colônia (UFC) com o auxílio de contador de colônias manual (Phoenix CP-602, Araraquara, São Paulo, Brasil) e os resultados expressos em UFC/mg de biofilme dental em solução.

Cada amostra foi semeada em triplicata e teve um controle negativo com o respectivo meio de cultura não semeado.

Figura 4.11 - Esquema ilustrativo do processamento das amostras para análise microbiológica por meio da técnica do *pour plate*

4.8.2 Análise bioquímica

Após a coleta, os microtubos destinados a análise bioquímica foram conduzidos em recipiente refrigerado ao Laboratório de Pesquisas em Estresse Oxidativo (LAPEO) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, para o processamento.

Os microtubos foram pesados em balança analítica (Marte Shimadzu AY220, São Paulo, Brasil) para a determinação da massa de biofilme coletada. Após isso, acrescentou-se aos microtubos aproximadamente 0,05g de solução tampão fosfato salino (PBS - phosphate buffered saline), pH 7,2, para diluição das amostras na ordem de 1:500.

Os microtubos foram levados ao Desruptor de Células Ultrasônico DES500 (Unique Group, Indaiatuba, São Paulo, Brasil), durante 1 minuto, adaptado a um dispositivo refrigerado para evitar evaporação da amostra. O disruptor gera energia

ultrasônica de alta intensidade causando o rompimento das células bacterianas e a homogeneização com a solução tampão.

Seguido a isso, os microtubos foram centrifugados em Microcentrífuga (Sigma 2K-15, Alemanha) com 3070 rpm, durante 7 minutos em temperatura ambiente.

4.8.2.1 Dosagem da capacidade antioxidante equivalente ao TROLOX

O potencial antioxidante foi determinado segundo a sua equivalência a um potente antioxidante conhecido, o trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametoxicromono-2-carboxílico; Aldrich Chemical, Co 23881-3), análogo sintético hidrossolúvel da vitamina E. Seguiu-se o método proposto por Miller et al. (1993), modificado por Re et al. (1999), em condições adaptadas de temperatura, proporções relativas dos reagentes e tempo de mensuração.

Trata-se de uma técnica colorimétrica baseada na reação entre o ABTS (2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-ácido-6-sulfônico-diamônio) com persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$), produzindo diretamente o radical cátion $ABTS^+$, cromóforo de coloração verde/azul, com absorvância máxima nos comprimentos de onda 645, 734 e 815 nm. A adição de antioxidantes a este radical cátion pré-formado o reduz novamente a ABTS, na extensão e escala de tempo dependente da capacidade antioxidante, concentração de antioxidantes e duração da reação. Isto pode ser mensurado por espectrofotometria pela observação da mudança na absorvância lida a 734nm durante um determinado intervalo de tempo.

Assim, para a análise das amostras, inicialmente foi preparado a solução de estoque de ABTS, 16 horas antes das dosagens, sendo armazenada em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após este período de espera, preparou-se então, a solução de trabalho de ABTS, diluindo 1mL da solução de estoque ABTS em 100mL de PBS.

As leituras de comprimento de onda foram realizadas em espectrofotômetro 800 xi duplo feixe (Femto Ind. e Com. de Instrumentos, São Paulo, Brasil), que foi calibrado usando 3000 μ L de solução de PBS dispensado em cubeta de quartzo Suprasil® 100QS (Hellma Analytics, Müllheim, Alemanha) para a leitura em 734nm. Em seguida utilizou-se 3000 μ L da solução de trabalho de ABTS para determinar a

absorbância desta solução, em 734nm. Este procedimento foi realizado antes da leitura das amostras de cada grupo experimental.

Para as leituras espectrofotométricas das amostras foi colocado na cubeta de quartzo Suprasil® 100QS (Hellma Analytics, Müllheim, Alemanha), com micropipeta automática (Digipet, Paraná, Brasil), 2970µL da solução de ABTS sendo realizada a leitura da absorbância a 734nm, o que corresponde ao tempo T0. Imediatamente após esta leitura, a cubeta foi retirada do espectrofotômetro para o acréscimo de 30µL da amostra, sendo homogeneizada manualmente por 20 segundos e recolocada no aparelho para as leituras subsequentes. No total, foram feitas 6 leituras, sendo a T0 a leitura inicial (sem amostra) e 5 leituras subsequentes com intervalos de 1 minuto entre elas.

Para o cálculo das dosagens de TEAC para cada amostra foram anotados os valores de T0 (leitura inicial) e T5 (leitura final). Assim, a extensão da descoloração como índice de inibição do radical cátion $ABTS^+$ foi determinada como a atividade antioxidante total da amostra, sendo então calculada a sua relação com a reatividade do Trolox (Aldrich Chemical Co 23,881-3), como padrão, sob as mesmas condições.

4.8.2.2 Dosagem de carboidratos totais

Para a dosagem de carboidratos totais utilizou-se o método proposto por Dubois et al. (1956) que baseia-se na reação dos carboidratos presentes na amostra com fenois e ácido sulfúrico (H_2SO_4) para produzir cromógeno com absorção em 490nm.

Inicialmente, procedeu-se o preparo do reagente fenol 5%, diluindo 5g de fenol cristal P.A. (Dinâmica Química Contemporânea Ltda., Diadema, São Paulo, Brasil) em 100mL de água destilada. O ácido sulfúrico (Dinâmica Química Contemporânea Ltda., Diadema, São Paulo, Brasil) foi utilizado na mesma concentração do fabricante (95%), não sendo necessária a diluição.

Para a elaboração da solução padrão 400mg de glicose, que foi o açúcar de referência utilizado, diluiu-se 20µL de solução de glicose 10mg/mL (Glicose PAP Liquiform, Labtest, Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil) em 80µL de água destilada.

Para o preparo das amostras para leitura, utilizaram-se tubos de ensaio, onde, com pipeta automática, foram dispensados 100µL da amostra, 100µL do fenol 5% e, por último, 500µL do ácido sulfúrico. Esta reação liberava calor e ficava em repouso por 10 minutos. Em seguida, os tubos de ensaio foram agitados manualmente e levados ao banho-maria por 10 minutos.

Juntamente com o preparo das amostras e da solução padrão, também foi preparado um tubo de ensaio com 100µL de fenol 5% e 500µL de H₂SO₄. O volume total desta solução foi dispensado em cubeta de quartzo Suprasil® 104QS (Hellma Analytics, Müllheim, Alemanha) e foi utilizado para calibrar o espectrofotômetro 800 xi duplo feixe (Femto Ind. e Com. de Instrumentos, São Paulo, Brasil) em 490nm de comprimento de onda. Este procedimento foi realizado antes da leitura das amostras de cada um dos grupos experimentais.

Para a leitura das amostras, dispensou-se todo o conteúdo do tubo de ensaio na cubeta de quartzo, sendo esta levada ao espectrofotômetro para leitura fotométrica.

Para cada grupo experimental avaliado foi realizada a leitura do açúcar de referência adotado como padrão.

4.9 AVALIAÇÃO DA MICRODUREZA SUPERFICIAL FINAL

Ao final de cada etapa experimental de cada tratamento, a microdureza superficial foi novamente medida. Foram realizadas três endentações paralelas, com distância de 50µm entre elas e 100µm das três medidas de microdureza inicial (*baseline*). A diferença da média das medidas das três endentações *baseline* e das três medidas após os tratamentos indicam a perda de microdureza de superfície (PDS), de acordo com a seguinte fórmula (Ccauhana-Vásques; Cury, 2010; Briguenti et al., 2012):

$$\%PDS = \frac{\text{microdureza inicial} - \text{microdureza final}}{\text{microdureza inicial}} \times 100$$

4.10 ANÁLISE DA PERDA DE CONTEÚDO MINERAL POR TOMOGRAFIA DE COERÊNCIA ÓPTICA (OCT)

Para avaliação dos blocos de esmalte através da técnica de OCT, as amostras foram umedecidas com água deionizada e secas com papel absorvente imediatamente antes do exame, sendo posicionadas em uma lâmina de vidro com cera utilidade, sob o led. Para esta análise foi utilizado um sistema de OCT que emprega uma fonte luminosa com comprimento central de onda de 930nm, com 2mW de potência (OCP930RS Thorlabs Inc., disponível no laboratório de Tomografia Óptica do Centro de Lasers e Aplicações – IPEN-CNEN/SP).

Figura 4.12 - A: Posicionamento da amostra sob o led do OCT; B: Obtenção da imagem

Foi realizada varredura em toda a extensão das amostras (3mm), sendo feitas 53 leituras por amostra, com intervalos de 2,35 μ s.

No processo de formação das imagens, cada sinal de OCT corresponde a uma varredura axial da amostra (denominada A-scan) e sua amplitude é proporcional à intensidade da luz retroespalhada em função da profundidade. A translação do feixe de luz em relação à amostra gera uma série destes sinais em função da posição transversal (B-scan) (Popescu et al., 2008). Dessa forma, um sinal de intensidade de luz retroespalhada é captado para cada posição axial e transversal associadas. Através da associação de imagens bidimensionais é possível obter a reconstrução da imagem em três dimensões (Colston et al., 1998).

Para análise das imagens foi utilizado o software “V10 desmineralização media fit stream auto”, desenvolvido pelo grupo do laboratório de OCT. Este programa permite selecionar uma região de interesse na amostra com o uso dos delimitadores (linhas branca e vermelha) na parte superior da tela, sendo que a

região selecionada aparece em destaque no canto inferior. Esta delimitação permitiu selecionar a área mais central da amostra, além de excluir possíveis bordos irregulares dos blocos de esmalte.

As linhas delimitadoras branca e vermelha na região inferior da tela permitem escolher a que profundidade da amostra será realizada a análise. Nas amostras do experimento foi utilizado profundidade de 20 a 120µm, pois as regiões mais superficiais do esmalte dental são onde ocorrem as maiores alterações de conteúdo mineral (De Cara, 2012).

Figura 4.13 - Interface do programa utilizado na análise das imagens de OCT. A: Seleção de área central da amostra (613 a 2090µm); B: Profundidade de análise (20 a 120µm)

O coeficiente de atenuação óptica de cada amostra foi obtido a partir da média aritmética dos valores do coeficiente de atenuação provenientes de cada uma das imagens analisadas.

Para avaliar se a área analisada tem relação com a perda mineral, foi analisado a área sob a curva de intensidade de sinal.

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O presente estudo apresenta como variáveis: microdureza superficial, avaliação quantitativa de microrganismos (*Streptococcus mutans*, *Streptococcus totais* e *Lactobacillus*), dosagem de TEAC, dosagem de carboidratos totais e avaliação de perda mineral pelo OCT.

Estas variáveis foram submetidas aos fatores de variação: óleos (tucumã e pupunha) e tempo experimental (7 e 14 dias).

Para realização das análises estatísticas, as amostras foram divididas em grupos, de acordo com o fator de variação e o tempo experimental (Figura 4.14):

Figura 4.14 - Organização dos grupos para as análises estatísticas

As análises envolveram a comparação de um mesmo grupo, em diferentes tempos experimentais (intragrupo), para determinar as diferenças entre períodos distintos de desafio cariogênico e a comparação entre os grupos experimentais, para verificar as diferenças entre os tratamentos.

Os dados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para avaliar a normalidade de distribuição.

Para as comparações intragrupo utilizou-se o teste t-Student para os grupos com distribuição normal e Mann-Whitney para os grupos assimétricos.

Nas comparações entre grupos foi utilizado a Análise de Variância (ANOVA) seguido de Tukey, para os grupos com distribuição normal, enquanto que, para os grupos que apresentaram distribuição assimétrica foi aplicado o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn.

Para os testes de correlação entre as variáveis, utilizou-se o Teste de Correlação de Spearman.

As análises foram realizadas com o software Biostat (versão 5.0) e o nível de significância adotado foi $\alpha=0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 MICRODUREZA SUPERFICIAL

Foram obtidas, decorrente das edentações realizadas em cada bloco de esmalte, as médias da microdureza Knoop (KHN) superficial inicial e final, e a perda de dureza superficial (PDS).

Tabela 5.1 - Comparação da Média e Desvio Padrão da microdureza Knoop (KHN) superficial inicial e final e perda de dureza superficial (PDS) em relação aos grupos

Grupos	Tempo (dias)	KHN inicial Média e DP	KHN final Média e DP	PDS Média e DP
GS	7	341,8 ± 21,5 ^(A)	289,2 ± 43,0 ^(B)	0,15 ± 0,12 ^(ab)
	14	347,4 ± 26,4 ^(A)	285,5 ± 45,3 ^(B)	0,18 ± 0,12 ^(a)
GT	7	348,5 ± 28,3 ^(A)	313,4 ± 29,3 ^(BC)	0,10 ± 0,10 ^(ab)
	14	335,8 ± 20,3 ^(AD)	314,6 ± 61,6 ^(BCD)	0,06 ± 0,18 ^(bc)
GP	7	337,7 ± 17,5 ^(AE)	333,1 ± 30,5 ^(CE)	0,01 ± 0,08 ^(c)
	14	327,9 ± 15,4 ^(A)	303,7 ± 34,2 ^(B)	0,07 ± 0,10 ^(bc)

*Letras diferentes indicam diferença estatística ($\alpha=0,05$). Letras maiúsculas relacionam-se a coluna e linha. Letras minúsculas relacionam-se apenas à coluna.

Foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA) um critério seguido do teste de Tukey, para a comparação entre os grupos e o teste t-Student para a análise intragrupos. Observa-se na tabela 5.1 que não houve diferença entre grupos com relação a KHN inicial, mostrando a padronização dos espécimes no *baseline*. Apenas os grupos GT-14dias e GP-7dias apresentaram média de KHN inicial semelhante a final.

Comparando intragrupo, os tempos experimentais, observou-se que apenas a KHN final mostrou diferença, com relação ao grupo GP 7 e 14dias ($p=0,01$).

Os grupos GT-14dias e GP-7dias apresentaram a menor perda de dureza de superfície, sendo que o GP-7dias diferiu estatisticamente dos grupos GS-7dias ($p=0,0006$) e 14dias ($p<0,0001$), enquanto o GT-14dias diferiu apenas do GS-14dias ($p=0,03$).

5.2 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

Para avaliação microbiológica obteve-se a média de unidades formadoras de colônias (UFC) de cada amostra, visto que as análises foram feitas em triplicata.

Como os grupos apresentaram distribuição assimétrica, os dados foram expressos em mediana e desvio interquartilico. Utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis para comparar os grupos, seguido do pós-teste de Dunn para detectar diferença entre eles.

Para a comparação intragrupo nos diferentes tempos experimentais, utilizou-se o teste de Mann-Whitney.

Tabela 5.2 - Mediana (Mi) e Desvio Interquartilico (Dj) de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) dos diferentes microorganismos pesquisados e do total de microorganismos, entre os grupos

Grupos	Tempo (dias)	Microorganismo (UFC/mg)							
		S. totais		S.mutans		L.casei		Total	
		Mi	Dj	Mi	Dj	Mi	Dj	Mi	Dj
GS	7	35,0 ^(ab)	216,8	196,5 ^(c)	198,0	0,0 ^(e)	57,5	69,0 ^(A)	227,2
	14	132,0 ^(a)	449,5	87,0 ^(cd)	589,5	28,0 ^(e)	273,8	54,0 ^(A)	445,8
GT	7	11,5 ^(ab)	32,8	40,0 ^(cd)	87,2	15,0 ^(e)	37,8	18,5 ^(A)	82,5
	14	7,0 ^(ab)	12,0	8,0 ^(d)	14,0	13,0 ^(e)	66,0	7,5 ^(B)	18,7
GP	7	7,0 ^(b)	6,5	12,0 ^(d)	12,2	19,0 ^(e)	466,7	10,0 ^(B)	16,2
	14	13,0 ^(ab)	288,5	14,5 ^(d)	9,5	372,5 ^(e)	1468,0	18,0 ^(A)	253,2
Valor de p									
(entre grupos)		0,02		0,005		0,21		0,03	

*Letras diferentes indicam diferença estatística ($\alpha=0,05$). Letras maiúsculas e minúsculas indicam diferença relacionada à coluna.

Observa-se na tabela 5.2 que os grupos GS-7 e 14dias foram os que apresentaram a maior mediana de unidades formadoras de colônia no total de microorganismos viáveis do estudo, sendo que o grupo GS-14dias apresentou o maior desvio interquartilico, entretanto esses grupos mostraram-se semelhantes. Contudo, os grupos GT-14dias e GP-7dias apresentaram as menores mediana, diferindo estatisticamente dos demais, com $p<0,05$.

O grupo GS-7 e 14dias foram os que apresentaram maiores valores de mediana de UFC de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus totais*, enquanto os

grupos GT-14dias e GP-7dias foram os que apresentaram as menores medianas para as mesmas espécies de bactérias.

Com relação às diferenças intragrupos, pode-se observar que os grupos GT-7 e 14dias e os grupos GP-7 e 14dias diferiram entre si, no total de microrganismos viáveis do estudo, mas não apresentaram diferença ao se analisar, isoladamente as espécies, entre os tempos experimentais.

No que se refere à *Streptococcus totais*, o grupo GS-14dias diferiu do grupo GP-7dias ($p=0,004$).

Com relação aos *S. mutans*, os grupos GT-14dias ($p=0,005$), GP-7dias ($p=0,005$) e GP-14dias ($p=0,005$) apresentaram-se semelhantes entre si e diferentes do grupo GS-7dias.

Lactobacillus casei comportaram-se de maneira semelhante em todos os grupos ($p=0,21$).

Utilizou-se o teste de Correlação de Spearman para relacionar a perda de dureza superficial e UFC de *Streptococcus mutans*, *Streptococcus totais* e *Lactobacillus casei*. De acordo com a tabela 5.3, pode-se inferir que *S. mutans* apresentaram correlação fraca com a perda de dureza superficial ($p=0,03$) e que *Streptococcus totais* ($p=0,19$) e *L. casei* ($p=0,91$) não apresentaram correlação.

Tabela 5.3 - Correlação entre a Perda de Dureza Superficial (PDS) e as Unidades Formadoras de Colônias de *Streptococcus mutans*, *Streptococcus totais* e *Lactobacillus casei*

Correlação	r_s^*	p
<i>S. mutans</i> x PDS	0,32	0,03
<i>S. totais</i> x PDS	0,19	0,19
<i>L. casei</i> x PDS	-0,01	0,91

*Coeficiente de Correlação de Spearman

5.3 ANÁLISE BIOQUÍMICA

A análise bioquímica compreendeu a dosagem da capacidade antioxidante total equivalente ao Trolox (TEAC) e a dosagem de carboidratos totais das amostras.

Como os dados de dosagem de TEAC e de carboidratos apresentaram distribuição assimétrica, foi obtida a média dos postos e aplicado o teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn para detectar diferenças estatísticas entre os grupos e tempos experimentais. Para detectar a diferença intragrupo foi utilizado o teste de Mann-Whitney.

Gráfico 5.1 - Mediana, Q1, Q3 e desvio interquartílico da dosagem de TEAC nos diferentes grupos e tempos experimentais (Letras diferentes indicam diferença estatística: $\alpha=0,05$)

O gráfico 5.1 mostra que não houve diferença intragrupo com relação aos tempos experimentais.

Os grupos controle (GS - 7 e 14dias) foram os que apresentaram maiores valores de capacidade antioxidante, sendo semelhantes ao grupo GT nos dois tempos experimentais, entretanto, o grupo GS-7dias apresentou o maior desvio interquartílico.

Os grupos GP-7 e 14dias foram os que apresentaram menor capacidade antioxidante, diferindo estatisticamente dos grupos controle ($p=0,006$ e $p=0,001$ respectivamente), mas mostrando-se semelhante ao grupo GT.

O gráfico 5.2 mostra a dosagem de carboidratos totais nos diferentes grupos e tempos experimentais. É possível observar, que não houve diferença intragrupo, com relação aos tempos experimentais.

Gráfico 5.2 - Mediana, Q1, Q3 e desvio interquartilico da dosagem de carboidratos totais nos diferentes grupos e tempos experimentais (Letras diferentes indicam diferença estatística: $\alpha=0,05$)

Os grupos GS-7 e 14dias e os grupo GT-7 e 14dias apresentaram as maiores dosagem de carboidratos totais, enquanto o grupo GP apresentou as menores dosagens.

O grupo GP-7dias apresentou diferença estatística significativa quando comparado aos grupos: GS-7dias ($p=0,0279$), GS-14dias ($p=0,004$) e GT-14dias ($p=0,001$).

Relacionando as variáveis TEAC e dosagem de carboidratos observa-se uma correlação positiva e moderada, sendo essas variáveis diretamente proporcionais (Tabela 5.4).

Os *Streptococcus mutans* e *Streptococcus totais* também demonstraram correlação positiva e moderada ao TEAC, mas não apresentaram correlação com a dosagem de carboidratos (Tabela 5.4).

A perda de dureza superficial mostrou correlação positiva moderada ao TEAC e correlação positiva fraca aos carboidratos (Tabela 5.4).

Tabela 5.4 - Correlação entre TEAC, Carboidratos, PDS e Unidades Formadoras de Colônias de *Streptococcus totais* e *Streptococcus mutans*

Correlação	r_s^*	p
TEAC x Carboidratos	0,6	<0,0001
TEAC x <i>S. totais</i>	0,5	0,0007
TEAC x <i>S. mutans</i>	0,6	0,0002
TEAC x PDS	0,5	0,0013
Carboidratos x PDS	0,3	0,03
Carboidratos x <i>S. totais</i>	0,2	0,22
Carboidratos x <i>S. mutans</i>	0,1	0,27

*Coeficiente de Correlação de Spearman

5.4 ANÁLISE DE PERDA MINERAL PELO OCT

A análise de perda mineral nos grupos foi determinada por dois parâmetros: o coeficiente de atenuação óptica das amostras e a média dos grupos e, pela área sob a curva de intensidade do sinal de OCT.

Para análise do coeficiente de atenuação óptica, devido os dados apresentarem distribuição assimétrica, foi obtida a média dos postos e aplicado o teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn para detectar diferenças estatísticas entre os grupos e tempos experimentais. Para detectar a diferença intragrupo foi utilizado o teste de Mann-Whitney.

O gráfico 5.3 mostra que o grupo GP-7dias apresenta o menor coeficiente de atenuação óptica, apresentando diferença estatística com os grupos GS-14dias ($p=0,003$) e GP-14dias ($p=0,001$).

Na análise intragrupo, apenas o grupo GP diferiu estatisticamente entre os tempos experimentais (7 e 14 dias) ($p=0,001$).

Gráfico 5.3 - Média do coeficiente de atenuação óptica nos grupos estudados (Letras diferentes indicam diferença estatística: $\alpha=0,05$)

Gráfico 5.4 - Distribuição dos valores do coeficiente de atenuação óptica entre as amostras

No gráfico 5.4 é possível observar a variação do coeficiente de atenuação óptica nas amostras e entre os grupos. O grupo GP-7dias apresentou-se de forma mais homogênea, com poucas variações entre os coeficientes de atenuação entre as amostras. É possível observar também que este grupo, apresenta amostras com

os menores coeficientes de atenuação óptica do estudo. Em contrapartida, os grupos controle (GS-7 e 14dias) e o grupo GP-14dias apresentam amostras com os maiores coeficientes de atenuação óptica quando comparado aos demais grupos.

Gráfico 5.5 - Área sob a curva para a profundidade de 20 a 120µm, obtido a partir do gráfico de intensidade de sinal de OCT por profundidade, nos grupos estudados. (Letras diferentes indicam diferença estatística: $\alpha=0,05$)

O grupo GP-14dias apresentou intensa refletividade de superfície, interferindo na resolução do sistema de OCT para análise da região subsuperficial, representada pelo alto valor de área detectado.

Foi utilizado o teste t-Student para detectar as diferenças existentes intragrupo em diferentes tempos experimentais. Foi verificado que os grupos GS e GP apresentaram aumento da área, de acordo com o aumento do tempo experimental, havendo diferença significativa apenas entre GP-7 e 14dias ($p=0,0001$).

A Análise de Variância um critério, seguida do teste de Tukey, foi utilizada para detectar as diferenças existentes entre os grupos. Pode-se observar, analisando o gráfico 5.5, que o grupo GT-14dias apresentou diferença significativa do grupo GS-14dias ($p=0,01$) e GP-14dias ($p<0,0001$). O grupo GP-7dias foi o que apresentou a menor área sob a curva, diferindo estatisticamente dos grupos controle GS-7dias ($p=0,006$) e GS-14dias ($p=0,0008$), GT-7dias ($p=0,02$) e GP-14dias ($p<0,0001$).

6 DISCUSSÃO

A cárie dental é a doença infecciosa da cavidade bucal mais comum no mundo. Seu desenvolvimento é influenciado pelo biofilme microbiano, que por meio de suas interações entre bactérias e componentes da dieta, é capaz de interferir de diversas formas, nessa patogenia (Gazzanni et al., 2012).

A procura por novas estratégias de controle do biofilme tem sido constante, e, os produtos naturais passaram a ser empregados com frequência em pesquisas na área odontológica, devido a sua biocompatibilidade, baixa toxicidade e risco reduzido de resistência bacteriana, constituindo fonte promissora para o desenvolvimento de novas tecnologias e produtos. No entanto, Jeon et al. (2011) mencionam que ainda é um desafio o estudo dos produtos naturais, devido a complexidade para isolar os seus compostos ativos.

Alguns estudos utilizando produtos naturais comprovaram o potencial de interferência de diferentes vegetais na virulência e sobrevivência das espécies cariogênicas, principalmente dos *Streptococcus mutans* e na formação do biofilme (Albuquerque et al., 2010; Tomczyk et al., 2010; Jesus et al., 2010; Pandit et al., 2013). As partes dos vegetais principalmente usadas são as folhas, flores e cascas para a produção de extratos, que segundo Gazzanni et al. (2012), permite um fácil contato do agente ativo com as bactérias, devido este agente estar em solução. Entretanto, estes estudos são normalmente *in vitro* ou *in vivo* com animais, o que dificulta a transposição de resultados para humanos, sobretudo em virtude das peculiaridades do ambiente bucal.

A presente pesquisa avaliou o comportamento de dois óleos oriundos dos frutos de palmeiras da Região Amazônica como prováveis fontes protetoras à formação do biofilme dental. É a primeira vez que esses óleos tem suas propriedades testadas na Odontologia. A maioria dos estudos conduzidos com os frutos do tucumã (*Astrocaryum vulgare*) e da pupunha (*Bactries gasipae*) dizem respeito a sua composição química (Ferreira et al., 2008; Rodrigues AMC. et al., 2010; Santos et al., 2013), determinação do valor nutricional (Oliveira; Marinho, 2010) ou à produção de biodiesel (Barbosa et al., 2009).

Contrariando o que normalmente é visto na literatura com produtos naturais, este estudo utilizou-se de óleos vegetais extraídos dos frutos, e testou seu potencial protetor à carie, na forma bruta e em um estudo *in situ*.

Ainda são restritos os estudos que avaliam o potencial anticariogênico de óleos comestíveis *in situ* (Hanning et al., 2012; Hanning et al., 2013). O emprego dos óleos do tucumã e da pupunha deve-se especialmente, a possibilidade de testar o efeito de frutos com alto conteúdo lipídico, muito consumidos pela população amazônica, que pudessem quando ingeridos, exercer algum efeito anticariogênico. Segundo Kensche et al. (2013), as propriedades hidrofóbicas de muitos óleos comestíveis tem fundamental importância na dinâmica de formação do biofilme, devido seu alto conteúdo lipídico.

Neste aspecto, o estudo *in situ* forneceu o melhor modelo para o experimento, por permitir a exploração de resultados laboratoriais em uma situação que simula o que ocorre no processo de cárie natural, favorecendo o controle às variáveis e fornecendo informações clínicas relevantes (Zero, 1995).

Melhorança-Filho e Pereira (2012) relatam que a ação dos óleos naturais pode decorrer da ação de diversos componentes, por isso, Jeon et al. (2011) destacam a importância de se conhecer a composição química destes produtos, bem como o macroambiente local, clima, localização geográfica e variação sazonal, pois esses fatores influenciam significativamente o conteúdo dos compostos bioativos presentes nos produtos naturais. Ressaltam ainda que, muitos estudos com produtos naturais na odontologia são incompletos por não fornecerem o perfil de caracterização química ou o suposto componente ativo do produto que se está testando.

Os óleos de tucumã e pupunha utilizados neste estudo foram adequadamente caracterizados, por meio de análises físico-químicas, composição de ácidos graxos e carotenos totais (Apêndices A e B). Assim, obteve-se que os ácidos graxos insaturados são predominantes em ambos os óleos, sendo o ácido oleico, o principal, concordando com os estudos de Yuyama et al. (2003), Ferreira et al. (2008), Rodrigues AMC et al. (2010) e Santos et al. (2013). A determinação de carotenóides totais mostrou que o óleo de tucumã apresenta conteúdo superior ao óleo da pupunha, porém dentro dos padrões encontrados nos estudos de Jatunov et al. (2010) e Bony et al. (2012).

A análise microbiológica mostrou que os óleos estudados comportaram-se de forma diferente quanto ao tempo experimental, pois o óleo de tucumã se mostrou efetivo na redução de microrganismos no tempo experimental de 14 dias, enquanto o óleo da pupunha, somente no tempo de 7 dias (Tabela 5.2). O GT-14dias apresentou redução na quantidade de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) de todas as espécies estudadas, o que pode ser explicado pela rica composição de ácido oleico presente neste óleo. Isso faz com que ele seja facilmente incorporado aos lipídios das membranas celulares bacterianas, interferindo na integridade da membrana celular, tornando-a mais permeável, afetando a capacidade da bactéria tolerar ácidos e inibindo a atividade da glicosiltransferase (Osawa et al., 2001; Duarte et al., 2006b; Gazzanni et al., 2012).

O grupo GP-7dias revelou poucas UFC de bactérias iniciadoras do processo cariogênico, entretanto, muitas UFC de *Lactobacillus casei*, que são colonizadores secundários. Este resultado sugere que os ácidos graxos presentes no óleo da pupunha podem ter sido incorporados à película de forma mais efetiva que no grupo GT-7dias, aumentando sua hidrofobicidade e dificultando a adesão dos microrganismos colonizadores iniciais (*Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mutans*). Entretanto, com o passar do tempo, essas moléculas de ácidos graxos podem se descolar da película, permitindo a adesão de mais bactérias (Reich et al., 2013), o que é visto no GP-14dias. Isso pode ter acontecido em decorrência das características organolépticas do óleo da pupunha, que por ter consistência cremosa, permaneceu mais tempo em contato com a superfície do esmalte, facilitando a incorporação dessas moléculas à película, pois de acordo com Hara e Zero (2010), Ferrazzano et al. (2011a), o desenvolvimento do biofilme está relacionado à quantidade de partículas do alimento que é retida ou fica disponível no meio. Por outro lado, a consistência do óleo da pupunha pode ter servido como substrato estimulador do crescimento (Hanning et al., 2013) com o passar do tempo, principalmente para *L. casei*.

Os grupos que mostraram menor quantidade total de UFC (Tabela 5.2) foram também os que apresentaram menor perda de dureza superficial (PDS) (Tabela 5.1), mostrando que os óleos interferiram na agregação de microrganismos e, conseqüentemente, na produção da matriz do biofilme, com menor produção de polissacarídeos extracelulares e ácidos, exercendo efeito protetor à superfície do esmalte. Estes resultados são confirmados pela correlação positiva entre a PDS e S.

mutans (Tabela 5.3), evidenciando que são esses os principais microorganismos relacionados ao processo carioso (Ccahuana-Vásques; Cury, 2010). Briguenti et al. (2012) também observaram, ao utilizar um extrato natural (*Psidium cattleianum*) *in situ*, que houve redução de microorganismos e do percentual de variação da dureza de superfície.

A análise bioquímica levou em consideração a medida da capacidade antioxidante, para verificar o comportamento das bactérias do biofilme, frente à produção de radicais livres, decorrentes do próprio metabolismo bacteriano. Apesar dessa medida ser comum em alimentos ou em fluidos biológicos, como sangue, plasma, saliva, lágrima e urina (Fraga et al., 2013), não foi encontrado na literatura, nenhuma referência desta avaliação no biofilme dental. O método da capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC) utilizado neste estudo, forneceu informações sobre o estado geral de antioxidantes dentro da amostra biológica de biofilme, determinando sua capacidade em atenuar o dano potencial produzido pelos radicais livres. Seu amplo uso atualmente, se deve principalmente a sua simplicidade operacional e baixo custo (Sharma; Singh, 2013).

É possível observar no gráfico 5.1 que os grupos GS-7 e 14dias foram os que apresentaram maior capacidade antioxidante. Entretanto, o grupo GS-7dias mostrou alta dosagem de carboidratos totais detectáveis, semelhante ao grupo GS-14dias (Gráfico 5.2). Esse resultado se deve ao próprio comportamento da molécula de carboidratos, que apresenta alto potencial redutor devido a presença de grupos cetônicos ou aldeídicos livres, capazes de reduzir os agentes oxidantes. Ao ser metabolizado pelas bactérias, liberam oxigênio e água, que prontamente serão reutilizados pelas bactérias na forma de energia, fazendo com que os microorganismos retomem seu metabolismo normal (Silveira et al., 2008). Na avaliação do método TEAC desses grupos controle, as espécies reativas de oxigênio produzidas da redução dos grupos cetônicos e aldeídicos das moléculas de carboidratos, reagiram com os radicais ABTS+, provocando redução da absorbância e mostrando altos valores antioxidantes. Isso é confirmado pela correlação positiva moderada revelada entre TEAC e carboidratos (Tabela 5.4). Vale ressaltar que, a alta dosagem de TEAC e carboidratos detectada no GS-7dias em comparação com o GS-14dias, pode ter sido influenciada pelos altos fatores de diluição das amostras daquele grupo, em virtude da pequena quantidade de massa de algumas amostras em comparação com os demais grupos.

Os grupos GT e GP nos dois tempos experimentais (Gráfico 5.2) apresentaram baixas dosagens de TEAC, o que provavelmente está relacionado ao alto teor lipídico dos óleos, que atuaram como propagadores de oxidação, favorecendo a reação com os radicais livres e impedindo a detecção desses radicais pelo método. Niki (2010), menciona que os lipídios são alvos vulneráveis dos radicais livres. No entanto, é possível observar que os grupos GT apresentaram potencial antioxidante semelhante aos grupos GS, o que pode ter sido mediado pelo teor de carotenóides (Halliwell, 2009) das amostras do GT, que estão presentes em maior quantidade do que em GP (Apêndice A).

Analizando os valores de mediana e desvio interquartílico de UFC (Tabela 5.2) e os valores de dosagem de TEAC (Gráfico 5.1) e carboidratos (Gráfico 5.2), sugere-se que o ambiente redox esteja influenciando as reações, pois como visto na tabela 5.4, existe correlação positiva e moderada entre as variáveis TEAC, carboidratos, *S. mutans*, *S. totais* e PDS.

O grupo GS-7dias apresentou menores quantidades de UFC quando comparado ao GS-14dias. Entretanto foram os grupos que mostraram melhor desempenho nas dosagens de TEAC. Isso significa que os radicais livres produzidos não foram danosos ao metabolismo das bactérias, permitindo o crescimento e multiplicação de células bacterianas e à produção de ácidos orgânicos capaz de causar a desmineralização do esmalte.

Os grupos GT mostraram comportamento inverso. Há maior número de UFC no GT-7dias em relação ao GT-14dias. Esse achado se deve a maior concentração de radicais livres nos grupos tratados com o óleo de tucumã, produzidos não só pela metabolização de carboidratos, mas sobretudo, devido a presença de um substrato oxidável, representado pelos ácidos graxos insaturados do óleo. Com o meio supersaturado de radicais livres, estes passam a oxidar as moléculas lipídicas da membrana celular bacteriana (peroxidação lipídica), causando a lise e morte das bactérias no grupo GT-14dias. Os ácidos graxos ao serem oxidados liberam radicais do tipo peróxido de hidrogênio, altamente reativo às moléculas lipídicas das membranas celulares. Reduzindo a quantidade de bactérias, observa-se também neste grupo, que há menor PDS quando comparada ao GT-7dias. Kessler et al. (2003) observaram que culturas de *Bacillus cereus* (causador de intoxicação alimentar) tratadas com o extrato de tucumã mostraram altos níveis de radicais livres

quando comparados ao grupo controle, admitindo a presença de fatores pró-oxidantes no extrato.

Os grupos GP mostram as menores dosagens de carboidratos e TEAC. No grupo GP-7dias, a consistência cremosa do óleo permitiu que as moléculas lipídicas se aderissem à película, dificultando a colonização microbiana. Assim, houve pouca metabolização de carboidratos, detectada pela baixa dosagem de carboidratos e pouca produção de radicais livres, revelado também, pela baixa dosagem de TEAC. Além disso, houve pequena PDS neste grupo. Entretanto, com passar dos dias, as moléculas lipídicas se desprendem da película e as bactérias então, podem colonizar a superfície dental, fazendo com que haja crescimento e multiplicação celular. No entanto, apesar do aumento estatisticamente significativo de UFC no GP-14dias, os níveis de dosagem de carboidratos são semelhantes neste grupo. Neste caso, pode-se sugerir que, apesar de haver carboidratos nas amostras do GP, estes não foram reduzidos e por isso, não detectados, visto que o método utilizado para essa dosagem baseou-se na detecção por meio das propriedades redutoras de carboidratos, proposto por Dubois et al. (1956).

O estudo de Jobim et al. (2013), que observaram que o potencial antimicrobiano do extrato de tucumã diante à três bactérias, envolve o desequilíbrio redox corroboram com os resultados encontrados na presente pesquisa.

A avaliação da perda mineral subsuperficial nos blocos de esmalte foi realizada por meio do coeficiente de atenuação óptica na profundidade de 20 à 120 μm , pois estudo realizado por De Cara (2012) mostrou que esta é a profundidade mais adequada para determinação de processos de perda mineral, por considerar regiões mais superficiais do esmalte dental, onde ocorrem as maiores alterações de conteúdo mineral.

O gráfico 5.3 revela que os coeficientes de atenuação foram maiores e estaticamente semelhantes no tempo experimental de 14 dias nos grupos GS e GP, e que não houve alteração entre os tempos de 7 e 14 dias no grupo GT. O menor coeficiente detectado foi no grupo GP-7dias. Pode-se inferir que os óleos avaliados exerceram algum efeito protetor à desmineralização nos grupos GT-14dias e GP-7dias, seja como barreira à penetração de ácidos (Arnaud et al., 2010) ou por atuarem nos microorganismos ou película, por meio de mecanismos já explicitados anteriormente. O processo de desmineralização permitiu o aumento do espalhamento de luz por criar espaços vazios na estrutura do esmalte dental,

gerando maior coeficiente de atenuação óptica. A superfície do esmalte é geralmente uma área com menos susceptibilidade de dissolução, entretanto, a área subsuperficial, tem menor conteúdo mineral e constituição prismática, o que facilita o processo de perda mineral (Mandurah et al., 2013). Esses resultados concordam com os achados de De Cara (2012), e contrariam os de Popescu et al. (2008), que observaram menor coeficiente de atenuação óptica para dentes cariados em comparação com amostras de esmalte hígido.

Ao analisar a área sob a curva do sinal da Tomografia de Coerência Óptica (OCT), pode-se notar que o grupo GP-14dias apresentou grande área indicativa de desmineralização (Gráfico 5.5). Entretanto, estes resultados foram prejudicados pela intensa refletividade de superfície observada neste grupo, possivelmente resultante da penetração das partículas do óleo nos poros do esmalte desmineralizado, interferindo na penetração do sinal do OCT. No estudo qualitativo de Arnaud et al. (2010) foi observado que as imagens de OCT dos espécimes tratados com a quitosana apresentaram intenso brilho. A utilização da técnica de OCT sensível à polarização seria uma opção para controlar a reflexão da superfície do esmalte e reduzir sua influência sobre as regiões subjacentes (Jones; Fried, 2006; Jones et al., 2006). Os grupos GT-14dias e GP-7dias apresentaram a menor área sob a curva do sinal de OCT, sendo estes achados, indicativos de menor perda mineral.

Os resultados deste estudo sugerem a eficácia dos óleos comestíveis do tucumã e pupunha como estratégias alternativas para o controle de microorganismos do biofilme e redução da perda mineral do esmalte. Entretanto, são necessários estudos futuros para determinar o menor tempo de ação destes óleos, assim como, para estabelecer, em nível celular, as diferentes ações dos ácidos graxos nas células bacterianas. Os altos índices de cárie e perda dental da atualidade impõem a necessidade urgente de novas estratégias e métodos mais acessíveis a toda a população.

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados, pode-se concluir que:

- ✓ Os óleos estudados reduziram a agregação bacteriana no biofilme dental.
- ✓ O óleo do tucumã exerceu efeito tardio na agregação bacteriana, enquanto o óleo da pupunha apresentou efeito mais imediato, devido ter atuado na película.
- ✓ Os óleos do tucumã e da pupunha não apresentaram efeito antioxidante, entretanto possivelmente mediaram reações oxidativas, interferindo no desequilíbrio redox do biofilme dental.
- ✓ Os óleos do tucumã e da pupunha reduziram a perda mineral superficial e subsuperficial do esmalte dental.
- ✓ O óleo da pupunha por ter apresentado ação nos processos iniciais de formação do biofilme pode ser considerado mais efetivo na prevenção à cárie dental.

REFERÊNCIAS¹

Aguiar AAA, Saliba NA. Toothbrushing with vegetable oil: a clinical and laboratorial analysis. *Braz Oral Res.* 2004; 18(2):168-73.

Aimutis WR. Bioactive properties of milk proteins with particular focus on anticariogenesis. *J Nutr.* 2004;134:989S–95S.

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; 40:28-32.

Albuquerque ACL, Pereira MSV, Pereira JV, Pereira LF, Silva DF, Macedo-Costa MR et al. Efeito antiaderente do extrato da *Matriarcaria recutita* Linn. sobre microorganismos do biofilme dental. *Rev Odontol Unesp.* 2010; 39(1): 21-5.

Almeida VG, Trein MP, Oppermann RV, Rösing CK. Formação in situ de biofilme sobre esmalte e cimento de ionômero de vidro em diferentes tensões de oxigênio. *Rev Odonto Ciênc.* 2008; 23(1): 48-52.

Araújo ME, Machado NT, França LF, Meireles MAA. Supercritical extraction of pupunha (*Guilielma speciosa*) oil in a fixed bed using carbon dioxide. *Braz J Chemic Engineer.* 2000; 17(3): 297-306.

Arnaud TMS, Barros-Neto B, Diniz FB. Chitosan effect on dental enamel de-mineralization: an in vitro evaluation. *J Dent.* 2010; 38: 848-52.

Arthur RA, Tabchoury CPM, Mattos-Graner RO, Del Bel Cury AA, Paes Leme AF, Vale GC, et al. Genotypic diversity of *S. mutans* in dental biofilm formed in situ under sugar stress exposure. *Braz Dent J.* 2007; 18(3): 185-91.

Arthur RA, Waeiss RA, Hara AT, Lippert F, Eckert GJ, Zero DT. A defined-multispecies microbial model for studying enamel caries development. *Caries Res.* 2013; 47: 318-24.

Asokan S, Rathinasamy TK, Inbamani N, Menon T, Kumar SS, Emmadi P, et al. Mechanism of oil-pulling therapy – in vitro study. *Indian J Dent Res.* 2011; 22: 34–7.

---

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

Azevedo CS, Trung LCE, Simionato MRL, Freitas AZ, Matos AB. Evaluation of caries-affected dentin with optical coherence tomography. *Braz Oral Res.* 2011; 25(5): 407-13.

Barbosa BS, Koolen HHF, Barreto AC, Silva JD, Figliuolo R, Nunomura SM. Aproveitamento do óleo das amêndoas de tucumã do Amazonas na produção de biodiesel. *Acta Amaz.* 2009; 39(2): 371-6.

Barreiros ALBS, David JM, David JP. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quim Nova.* 2006; 29(1): 113-23.

Bianchi MLP, Antunes LMG. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Rev Nutr.* 1999; 12(2): 123-30.

Bony E, Boudard F, Brat P, Dussossoy E, Portet K, Poucheret P, et al. Awara (*Astrocaryum vulgare* M.) pulp oil: chemical characterization and anti-inflammatory properties in a mice model of endotoxic shock and a rat model of pulmonary inflammation. *Fitoterapia.* 2012; 83: 33-43.

Borges MF, Castilho ARF, Pereira CV. Influência da sacarose, lactose e glicose + frutose no potencial cariogênico de *S. mutans*: estudo *in situ* e *in vitro*. *Rev Odonto Ciênc.* 2008; 23(4): 360-4.

Bowen WH. Food components and caries. *Adv Dent Res.* 1994; 8: 215-20.

Brasil. Ministério da Saúde. Resultados Principais da Pesquisa Nacional de Saúde Bucal - SB Brasil 2010. Brasília; 2011. 92p.

Braz AKS, Kyotoku BBC, Braz R, Gomes ASL. Evaluation of crack propagation in dental composites by optical coherence tomography. *Dent Mater.* 2009; 25:74-9.

Brighenti FL, Gaetti-Jardim-Júnior E, Danelon M, Evangelista GV, Delbem ACB. Effect of *Psidium cattleianum* leaf extract on enamel demineralization and dental biofilm composition *in situ*. *Archs Oral Biol.* 2012; 57: 1034-40.

Burne RA, Ahn SJ, Wen ZT, Zeng L, Lemos JA, Abranches J et al. Opportunities for disrupting cariogenic biofilms. *Adv Dent Res.* 2009 Aug; 21: 17-20.

Castelo-Branco VN, Torres AG. Capacidade antioxidante total de óleos vegetais comestíveis: determinantes químicos e sua relação com a qualidade dos óleos. *Rev Nutr.* 2011; 24(1): 173-87.

Ccahuana-Vásquez RA, Cury JA. *S. mutans* biofilm model to evaluate antimicrobial substances and enamel desmineralization. *Braz Oral Res.* 2010; 24(2): 135-41.

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

Choo-Smith L, Dong CCS, Cleghorn B, Hewko M. Shedding new light on early caries detection. *J Can Dent Assoc.* 2008; 74(10): 913-8.

Clement CR, Lleras PE, Van Leeuwen J. O potencial das palmeiras tropicais no Brasil: acertos e fracassos das últimas décadas. *Rev Bras Agrociênc.* 2005; 9(1-2): 67-71.

Colston BW, Everett MJ, Da Silva IB, Otis II Stroeve P, Nathel, H. Imaging of hard- and soft-tissue structure in the oral cavity by optical coherence tomography. *Appl. Opt.* 1998; 37(16): 3582-5.

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

Cury JA, Rebello 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; 34:491-7.

Daglia M, Tarsi R, Papetti A, Grisoli P, Dacarro C, Pruzzo C, Gazzani G. Antiadhesive effect of green and roasted coffee on *Streptococcus mutans* adhesive properties on saliva-coated hydroxyapatite beads. *J Agric Food Chem* 2002; 50:1225-9.

De Cara ACB. Avaliação do processo de desenvolvimento de desmineralização em esmalte dental humano utilizando a técnica de Tomografia por Coerência Óptica [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares; 2012.

De Lorenzo JL. Microbiologia, Ecologia e Imunologia aplicadas à clínica odontológica. São Paulo: Atheneu Editora; 2010. 640p.

De Lorgeril M, Salen P. The Mediterranean-style diet for the prevention of cardiovascular diseases. *Public Health Nutr.* 2006; 9:118-23.

Do T, Devine D, Marsh PD. Oral biofilms: molecular analysis, challenges, and future prospects in dental diagnostics. *Clin Cosmet Investig Dent.* 2013; 5: 11-9.

Donassollo TA, Romano AR, Demarco FF, Della-Bona A. Avaliação da microdureza superficial do esmalte e da dentina de dentes bovinos e humanos (permanentes e decíduos). *Rev Odonto Ciênc.* 2007; 22(58): 311-6.

Duarte S, Gregoire S, Singh AP, Vorsa N, Schaich K, Bowen WH, Koo H. Inhibitory effects of cranberry polyphenols on formation and acidogenicity of *Streptococcus mutans* biofilms. *FEMS Microbiol Lett.* 2006a; 257: 50-6.

Duarte S, Rosalen PL, Hayacibara MF, Cury JA, Bowen WH, Marquis RE, Rehder VL, Sartoratto A, Ikegaki M, Koo H. The influence of a novel propolis on mutans streptococci biofilms and caries development in rats. *Arch Oral Biol.* 2006b; 51:15-22.

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.

Ferrazzano GF, Amato I, Ingenito A, Zarrelli A, Pinto G, Pollio A. Plant Polyphenols and their anti-cariogenic properties: a review. *Molecules.* 2011a; 16: 1486-507.

Ferrazzano GF, Cantile T, Quarto M, Ingenito A. Protective effect of yogurt extract on dental enamel demineralization *in vitro*. *Aust Dent J.* 2008; 53(4): 314-9.

Ferrazzano GF, Roberto L, Amato I, Cantile T, Sangianantoni G, Ingenito A. Antimicrobial properties of green tea extract against cariogenic microflora: an in vivo study. *J Med Food.* 2011b; 14(9): 907-11.

Ferreira ES, Lucien VG, Amaral AS, Silveira CS. Caracterização físico-química do fruto e do óleo extraído de tucumã. *Alim Nutr.* 2008; 19(4): 427-33.

Filogônio CFB, Soares RV, Horta MCR, Penido CVSR, Cruz RA. Effect of vegetable oil (Brazil nut oil) and mineral oil (liquid petrolatum) on dental biofilm control. *Braz Oral Res.* 2011 Nov-Dez; 25(6): 556-61.

Fraga CG, Oteiza PI, Galleano M. *In vitro* measurements and interpretation of total antioxidant capacity. *Biochim Biophys Acta.* 2013. No prelo.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.06.030>

Freitas AZ, Amaral MM, Raele MP. Optical Coherence Tomography: Development and Applications In: Duarte FJ. *Laser Pulse Phenomena and Applications.* Rijeka: InTech; 2010. p. 409-32.

Freitas AZ, Zezel DM, Mayer MPA, Ribeiro AC, Gomes ASL, Vieira-Júnior ND. Determination of dental decay rates with optical coherence tomography. *Laser Phys.* 2009; 6(12): 896-900.

Freitas AZ, Zezell DM, Vieira-Júnior ND. Imaging carious human dental tissue with optical coherence tomography. *J App Phys.* 2006; 99: 024906.

Fried D, Featherstone JD, Darling CL, Jones RS, Ngaotheppitak P, Buhler CM. Early caries imaging and monitoring with near-infrared light. *Dent Clin North Am.* 2005;49(4):771–93.

Garcia-Godoy F, Hicks MJ. Maintaning the integrity of the enamel surface. *JADA* 2008; 139(Suppl 2):25S-34S.

Gazzani G, Daglia M, Papetti A. Food components with anticaries activity. *Curr Opin Biotechnol.* 2012; 23: 153-9.

Gibbons RJ, Etherden I. Comparative hydrophobicities of oral bacteria and their adherence to salivary pellicles. *Infect Immun.* 1983; 41:1190-6.

Green RM, Hartles RL. The effects of groundnut oil and vitamins on dental caries in the albino rat. *Arch Oral Biol.* 1966; 11: 913-9.

Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol.* 2004; 142: 231-55.

Halliwell B. Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? *Arch Bioch Biophy*. 2008; 476: 107–12

Halliwell B. Free radicals and antioxidants: A personal view. *Nutr Rev*. 1994; 52: 253-65.

Halliwell B. The wanderings of a free radical. *Free Radic Biol Med*. 2009; 46: 531-42.

Hammond EG, Pan WP, Mora-Urpi J. Composição de ácidos graxos e estrutura dos glicerídeos dos óleos do mesocarpo e da amêndoa de pupunha. *Rev Biol Tropical*. 1982; 30(1): 91-3.

Hanning C, Kirsch J, Al-Ahmad A, Kensche A, Hanning M, Kümmerer K. Do edible oils reduce bacterial colonization of enamel in situ? *Clin Oral Invest* 2013; 17: 649-58.

Hanning C, Wagenschwanz C, Pötschke S, Kümmerer K, Kenshe A, Hanning-Hoth W, et al. Effect of safflower oil on the protective properties of the in situ formed salivary pellicle. *Caries Res*. 2012; 46: 496-506.

Hara AT, Zero DT. The caries environment: saliva, pellicle, diet, and hard tissue ultrastructure. *Dent Clin North Am*. 2010; 54: 455-67.

Hayes ML, Berkowitz BK. The reduction of fissure caries in Wistar rats by a soluble salt of nonanoic acid. *Arch Oral Biol*. 1979; 24: 663-6.

Hayes ML. The effects of fatty acids and their monoesters on metabolic activity of dental plaque. *J Dent Res*. 1984; 63(1): 2-5.

Hojo K, Nagaoka S, Ohshima T, Maeda N. Bacterial Interactions in Dental Biofilm Development. *J Dent Res*. 2009; 88(11): 982-90.

Jatunov S, Quesada S, Diaz C, Murillo E. Carotenoid composition and antioxidant activity of the raw and boiled fruit mesocarp of six varieties of *Bactries gasipae*. *Arch Latinoamer Nutr*. 2010; 60(1): 99-104.

Jeon JG, Rosalen PL, Falsetta ML, Koo H. Natural products in caries research: current (limited) knowledge, challenges and future perspective. *Caries Res.* 2011; 45: 243-63.

Jesus RPFS, Macedo-Costa MR, Bastos IV, Couto GBL, Pereira MSV, Souza IA. Ação antibacteriana e antiaderente de *pithecellobium cochliocarpum (gomez) macbr* sobre microorganismos orais. *Odontol Clin Cient.* 2010; 9(4): 331-5.

Jobim ML, Santos RCV, Alves CPS, Oliveira RM, Mostardeiro CP, Sargrillo MR, et al. Antimicrobial activity of Amazon *Astrocaryum anucleatum* extracts and its association to oxidative metabolism. *Microbiol Res.* 2013. No prelo.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2013.06.006>.

Jones RS, Darling CL, Featherstone JDB, Fried D. Imaging artificial caries on the occlusal surfaces with polarization-sensitive optical coherence tomography. *Caries Res.* 2006; 40(2): 81-9.

Jones RS, Fried D. Remineralization of enamel caries can decrease optical reflectivity. *J Dent Res.* 2006; 85(9): 804-8.

Karlsson L. Caries detection methods based on changes in optical properties between healthy and carious tissue. *Int J Dent.* 2010; 9p. doi: 10.1155/2010/270729.

Kensche A, Reich M, Kümmerer K, Hanning M, Hanning C. Lipids in preventive dentistry. *Clin Oral Invest.* 2013; 17: 669-85.

Kessler M, Ubeaud G, Jung L. Anti- and pro-oxidant activity of rutin and quercetin derivatives. *J Pharm Pharmacol.* 2003; 55(1):131–42.

Leites ACBR, Pinto MB, Sousa ER. Aspectos microbiológicos da cárie dental. *Salusvita.* 2006; 25(2): 135-48.

Levine RS. Milk, flavoured milk products and caries. *Br Dent J.* 2001;191(1): 20.

Lima JEO. Cárie dentária: um novo conceito. *R Dental Press Ortod Ortop Facial.* 2007; 12(6): 119-30.

Lingström P, Zaura E, Hassan H, Buijs MJ, Hedlin P, Pratten J et al. The anticaries effects of a food extracts (Shiitake) in a short-term clinical study. *J Biomed Biotechnol.* 2012; 10p. doi: 10.1155/2012/217164.

Maia AMA, Fonsêca DDD, Kyotoku BBC, Gomes ASL. Characterization of enamel in primary teeth by optical coherence tomography for assessment of dental caries. *Int J Paediatr Dent.* 2010; 20(2): 158-64.

Maltz M, Jardim JJ, Alves LS. Health promotion and dental caries. *Braz Oral Res.* 2010; 24 (Spec Iss1): 18-25.

Mandurah MM, Sadr A, Shimada Y, Kitasako Y, Nakashima S, Bakhsh TA, et al. Monitoring remineralization of enamel subsurface lesions by optical coherence tomography. *J Biomed Opt.* 2013 Apr; 18(4): 046006.

Marsh PD. Are dental disease examples of ecological catastrophes? *Microbiology.* 2003; 149(2): 279-94.

Marsh, PD. Dental plaque is a biofilm and a microbial community-implications for a health and disease. *BMC Oral Health.* 2006; 6(suppl 1):S14

Melhorança-Filho AL, Pereira MRR. Atividade antimicrobiana de óleos extraídos de açaí e de pupunha sobre o desenvolvimento de *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. *Biosci J.* 2012 Jul-Aug; 28(4): 598-603.

Melo LS, Araujo RE, Freitas AZ, Zezell DM, Vieira ND, Girkin J et al. Evaluations of enamel restoration interface by optical coherence tomography. *J. Biomed Opt.* 2005; 10: 064027-1/5.

Meredith N, Sherriff M, Setchell DJ, Swanson SAV. Measurement of the microhardness and young's modulus of human enamel and dentine using an indentation technique. *Arch Oral Biol.* 1996; 41(6): 539-45.

Miller N, Rice-Evans C, Davies M, Gopinathan V, Milner A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci.* 1993; 84: 407-12.

Moi GP, Tenuta LMT, Cury JA. Anticaries potential of a fluoride mouthrinse evaluated in vitro by validated protocols. *Braz Dent J.* 2008; 19(2): 91-6.

Moura TR, Carneiro VA, Napimoga MH, Teixeira EH, Pinto VPT, Marinho ES et al. Inibição da adesão bacteriana à película adquirida do esmalte através da lectina de sementes de *Canavalia brasiliensis* [resumo senior 2681]. 57ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência; jul 2005; Fortaleza, BR. Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência; 2005.

Niki E. Assessment of antioxidant capacity *in vitro* and *in vivo*. Free Radic Biol Med. 2010; 49: 503–15

Oliveira AMMM, Marinho HA. Desenvolvimento de panetone à base de farinha de pupunha (*Bactris gasipae Kunth.*). Alim Nutr. 2010; 21(4): 595-605.

Osawa K, Miyazaki K, Shimura S, Okuda J, Matsumoto M, Ooshima T. Identification of cariostatic substances in the cacao bean husk: their anti-glucosyltransferase and antibacterial activities. J Dent Res. 2001; 80(11): 2000-4.

Otis LL, Colston BW, Everett MJ, Nathel H. Dental optical coherence tomography: a comparison of two *in vitro* systems. Dentomaxillofac Radiol. 2000; 29(2): 85-9.

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.

Palti DG, Andrade MA, Silva SMB, Abdo RCC, Lima JEO. Evaluation of superficial microhardness in dental enamel with different eruptive ages. Braz Oral Res. 2008; 22(4): 311-5.

Pandit S, Chang KW, Jeon JG. Effects of *Withania somnifera* on the growth and virulence properties of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* at sub-MIC levels. Anaerobe. 2013; 19: 1-8.

Pandit S, Kim JE, Jung KH, Chang KW, Jeon JG. Effect of sodium fluoride on the virulence factors and composition of *Streptococcus mutans* biofilms. Arch Oral Biol. 2011; 56(7): 643-9.

Pastore-Júnior F, Araújo VF, Fernandes EC, Petry AC, Echeverria RM, Leite FHF. Plantas da Amazônia para produção cosmética: uma abordagem química – 60 espécies do extrativismo florestal não-madereiro da Amazônia. Brasília: Universidade de Brasília; 2005. 244p.

Popescu DP, Sowa MG, Hewko MD, Choo-Smith L. Assessment of early demineralization in teeth using the signal attenuation in optical coherence tomography images. *J Biomed Opt.* 2008 Sep-Oct; 13(5): 054053.

Queiroz CS, Hara AT, Paes Leme AF, Cury. pH-cycling models to evaluate the effect of low fluoride dentifrice on enamel de- and remineralization. *Braz Dent J.* 2008; 19(1): 21-7.

Quivey-Jr RG, Faustoferri R, Monahan K, Marquis R. Shifts in membrane fatty acid profiles associated with acid adaptation of *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiol Lett.* 2000;189:89-92.

Ramstorp M, Carlsson P, Brathall D, Matthiasson B. Isolation and Partial Characterization of a Substance from Carrots. *Daucus carota*, with ability to agglutinate cells of *Streptococcus mutans*. *Caries Res.* 1982; 16(423): 4–7.

Re R, Pellegrini R, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med.* 1999; 26: 1231-7.

Reich M, Hanning C, Al-Ahmad A, Bolek R, Kümmerer K. A comprehensive method for determination of fatty acids in the initial oral biofilm (pellicle). *J Lip Res.* 2012; 53: 2226-30.

Reich M, Kümmerer K, Al-Ahmad A, Hanning C. Fatty acid profile of the initial oral biofilm (pellicle): an *in situ* study. *Lipids.* 2013. 9p. doi: 10.1007/s11745-013-3822-2.

Rodrigues AMC, Darnet S, Silva LHM. Fatty acid profiles and tocopherol contents of buriti (*Mauritia flexuosa*), Patawa (*Oenocarpus bataua*), Tucumã (*Astrocaryum vulgare*), Mari (*Poraqueiba paraensis*) and Inaja (*Maximiliana maripa*) fruits. *J Braz Chem Soc.* 2010; 21(10): 2000-4.

Rodrigues RA, Rebellato C, Bastos RA, Santos DFS, Duarte Filho ESD. Análise da microdureza Knoop de quatro tipos de resina composta através do microdurômetro HVS-1000. *Odontol Clin Cientif.* 2010; 9(1): 55-8.

Rolim TL, Wanderley FTS, Cunha EVL, Tavares JF, Oliveira AMF, Assis TS. Constituintes químicos e atividade antioxidante de *Byrsonima gardneriana* (*Malpighiaceae*). *Quim Nova.* 2013; 36(4): 524-7.

Santos MFG, Marmesat S, Brito ES, Alves RE, Dobarganes MC. Major components in oils obtained from Amazonian palm fruits. *Grasas y Aceites*. 2013 Abr-Jun; 64(3): 328-34.

Scardina GA, Messina P. Good oral health and diet. *J Biomed Biotechnol*. 2012; 8p. doi: 10.1155/2012/720692.

Schilling KM, Bowen WH. Glucans synthesized *in situ* in experimental salivary pellicle function as specific binding sites for *Streptococcus mutans*. *Infect Immun*. 1992; 60(1): 284-95.

Shanley P, Medina G. Frutíferas e plantas úteis na vida amazônica. Belém: CIFOR Imazon; 2005. 300p.

Sharma P, Singh RP. Evaluation of antioxidant activity in foods with special reference to TEAC method. *Am J Food Tech*. 2013; 8(2): 83-101.

Shetty V, Hegde AM, Nandan S, Shetty S. Caries protective agents in human milk and bovine milk: an in vitro study. *J Clin Pediatr Dent*. 2011; 35(4): 389-92.

Silva TCL, Almeida CCBR, Veras-Filho J, Peixoto-Sobrinho TJS, Amorim ELC, Costa EP et al. Atividades antioxidante e antimicrobiana de *Ziziphus joazeiro mart.* (*Rhamnaceae*): avaliação comparativa entre cascas e folhas. *Rev Ciênc Farm Básica Apl*. 2011; 32(2):193-9.

Silveira LR, Hirabara SM, Lambertucci RH, Leandro CV, Fiamoncini J, Pinheiro CHJ et al. Regulação metabólica e produção de espécies reativas de oxigênio durante a contração muscular: efeito do glicogênio na manutenção do estado redox intracelular. *Rev Bras Med Esporte* 2008 Jan-Feb; 14(1): 57-63

Souza SL, Moreira APB, Pinheiro-Sant'ana HM, Alencar ER. Conteúdo de carotenos e provitamina A em frutas comercializadas em Viçosa, Estado de Minas Gerais. *Acta Sci Agron*. 2004; 6(4): 453-459.

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.

Tomczyk M, Pleszczynska M, Wiater A. Variation in total polyphenolics contents of aerial parts of *Potentilla Species* and their anticariogenic activity. *Molecules*. 2010; 15: 4639-51.

Wang Y, Lee SM, Dykes GA. Potential mechanisms for the effects of tea extracts on the attachment, biofilm formation and cell size of *Streptococcus mutans*. *Biofouling*. 2013; 29 (3): 307-18.

White DJ, Featherstone JDB. A longitudinal microhardness analysis of fluoride dentifrice effects on lesion progression in vitro. *Caries Res*. 1987; 21: 502-12.

White DJ. Effects on subsurface lesion: F uptake, distribution, surface, hardening and remineralization. *Caries Res*. 1987; 21: 126-40.

Wolff MS, Larson C. The cariogenic dental biofilm: good, bad or just something to control? *Braz Oral Res*. 2009; 23 (Spec Iss 1): 31-8.

Wootton-Beard PC, Ryan L. Improving public health?: The role of antioxidant-rich fruit and vegetable beverages. *Food Res Int*. 2011; 44: 3135–48

Yuyama LKO, Aguiar JPL, Yuyama K, Clement CR, Macedo SHM, Fávaro DIT et al. Chemical composition of the fruit mesocarp of three peach palm (*Bactris gasipae*) populations grown in Central Amazonia, Brazil. *Int J Food Sci Nutr*. 2003; 54: 49-56.

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

Zero DT. Sugar – The Arch Criminal? *Caries Res*. 2004; 38: 277-85.

Zijnga V, Van Leeuwen MBM, Degener JE, Abbas F, Thurnheer, Gmür R et al. Oral Biofilm Architecture on Natural Teeth. *Plos ONE*. 2010; 5(2): e9321.

APÊNDICE A - Resultados das análises físico-químicas realizadas na matéria-prima e óleos utilizados neste estudo

Análise	Composição	
	<i>Astrocaryum vulgare</i> (Tucumã)	<i>Bactries gasipae</i> (Pupunha)
Teor de umidade	55,11 ± 1,18%	53,18 ± 0,67%
Teor de lipídios	14,05 ± 0,95%	15,6 ± 0,11%
Índice de saponificação	194,8 ± 0,80 mgKOH/g	200,84 ± 0,39 mgKOH/g
Análise de cinzas	2,63 ± 0,14%	1,61 ± 0,11%
Teor de carotenos totais*	685,59 µg/g	17,54 µg/g

* Teor de carotenos totais determinado por espectrofotometria.

APÊNDICE B - Composição de ácidos graxos (método de cromatografia gasosa) nos óleos utilizados no estudo

Ácidos graxos*	Composição (%)**	
	<i>Astrocaryum vulgare</i> (Tucumã)	<i>Bactris gasipae</i> (Pupunha)
Ácido oléico	53,55	47,22
Ácido palmítico	25,96	38,18
Ácido palmitoléico	0,13	6,24
Ácido linoléico	1,31	4,42
Ácido linolênico	3,68	1,41
Ácido esteárico	2,89	1,55
Outros	0,16	0,14

* Determinação da composição de ácidos graxos realizada em duplicata no cromatógrafo gasoso Varian CP-3800 (Agilent Thecnologies, Santa Clara, Califórnia).

** Porcentagem relativa ao total de lipídios da amostra.

APÊNDICE C - Orientações dadas aos voluntários da pesquisa

ORIENTAÇÕES AOS VOLUNTÁRIOS

1. O dispositivo palatino que você está recebendo é para ser utilizado durante o dia todo, incluindo a noite. Você só poderá removê-lo da boca, durante a alimentação e quando você for ingerir qualquer líquido que não seja água.
2. Quando você retirar o dispositivo da boca, você deverá colocá-lo dentro do estojo plástico que você está recebendo, e ENVOLVÊ-LO com a gaze umedecida em água mineral.
3. Procure deixar o dispositivo o menor tempo possível fora da boca (no máximo 1 hora).
4. Durante todo o período experimental, você poderá fazer a higiene bucal normalmente, SEM O DISPOSITIVO e APENAS com a escova e o creme dental fornecido a você, que é SEM FLÚOR.
5. O dispositivo poderá ser higienizado, mas somente as áreas que **NÃO APRESENTAM** os blocos de esmalte. Para isso também utilize o creme dental **SEM FLÚOR**.
6. **NÃO** utilize antissépticos bucais ou qualquer agente tópico na cavidade bucal durante a fase experimental.
7. Para gotejar a solução teste, você deverá remover o dispositivo da boca, colocar no estojo porta-aparelho e pingar, **APENAS 01 GOTA** em cada bloco de esmalte. Para isso, **NÃO** precisa tocar com a ponta do conta-gotas no dispositivo, para que a solução não contamine. Após isso, você deve aguardar 05 minutos para voltar com o dispositivo para boca.
8. Você deve fazer o gotejamento da solução, 08 vezes por dia, ou seja, de 02 em 02 horas. Assim, a primeira aplicação da solução deverá ser às 8h da manhã e a última às 22h. Caso você atrase a primeira aplicação, todas as demais aplicações da solução naquele dia deverão ser atrasadas.
9. **NUNCA** esqueça de trazer sempre com você o estojo porta-aparelho, gaze e a solução teste.
10. Ao final do tempo experimental, venha à clínica da FO-UFGA, sempre a partir das 10 horas da manhã.
11. Sob a tela plástica do dispositivo, acumulará biofilme dental. Não tente removê-lo.
12. Quando o creme dental sem flúor e gaze estiver terminando, entre em contato com a Profª Danielle Emmi, para que estes itens possam ser repostos.

ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

Carta Provisória: 066/11 CEP-ICS/UFPA

Belém, 09 de maio de 2011.

A: Prof^a. Mst. Danielle Tupinamba Emmi

Senhora Pesquisadora,

Temos a satisfação de informar que seu projeto de pesquisa **"INFLUÊNCIA DOS ÓLEOS DA PUPUNHA (BACTRIS GASIPAE) E DO TUCUMÃ (ASTROCARYUM VULGARE) NA COMPOSIÇÃO DO BIOFILME DENTAL E TEMPO DE FORMAÇÃO DA CÁRIE EM ESMALTE: UM ESTUDO IN SITU"** CAAE 0043.0.073.000-11 e parecer nº049/11 CEP-ICS/UFPA, foi apreciado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humano CEP-ICS/UFPA, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará na reunião do dia 04 de maio de 2011.

Assim, Vossa Senhoria tem o compromisso de entregar a este CEP, no dia 27 de setembro de 2013, um relatório indicando qualquer alteração que possa ocorrer após a aprovação do protocolo.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Wallace Raimundo Araujo dos Santos.
Coordenador do CEP-ICS/UFPA