UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU
DISCIPLINA DE ODONTOPEDIATRIA

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DOS CHÁS DE CAMOMILA, CIDREIRA E ERVA DOCE SOBRE A FERMENTAÇÃO E SÍNTESE DE POLISSACARÍDEOS DA PLACA DENTÁRIA HUMANA- ESTUDO "IN VITRO"

Alexandre Sabatini Cavazzola

Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo,
como parte dos requisitos para obtenção do título de
mestre em Odontologia, área de Odontopediatria.

(Edição Revisada)

BAURU
2003

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU
DISCIPLINA DE ODONTOPEDIATRIA

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DOS CHÁS DE CAMOMILA, CIDREIRA E ERVA DOCE SOBRE A FERMENTAÇÃO E SÍNTESE DE POLISSACARÍDEOS DA PLACA DENTÁRIA HUMANA- ESTUDO "IN VITRO"

Alexandre Sabatini Cavazzola

**Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo,
como parte dos requisitos para obtenção do título de
mestre em Odontologia, área de Odontopediatria.**

(Edição Revisada)

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo de Oliveira Lima

BAURU
2003

Cavazzola, Alexandre Sabatini

C314a

Avaliação dos efeitos dos chás de camomila, cidreira e erva doce sobre a fermentação e síntese de polissacarídeos da placa dentária humana – estudo *in vitro*/ Alexandre Sabatini Cavazzola – Bauru, 2003.

126p.: il.; 30 cm

Dissertação. (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Bauru. USP.

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo de Oliveira Lima

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura do autor:

Data:

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Bauru - USP, em reunião de 15 de outubro de 2002, como apresentado no Anexo 1.

Dados Curriculares

Alexandre Sabatini Cavazzola

FILIAÇÃO: Olacir Cavazzola
Lourdes Bernardete Sabatini Cavazzola

NATURALIDADE: Lages/SC

NASCIMENTO: 05 de maio de 1974

1995 – 1999: Graduação em Odontologia / Pontifícia Universidade Católica do Paraná

2000 – 2001: Especialização em Odontopediatria / Faculdade de Odontologia de Bauru/USP

2001 – 2003: Mestrado em Odontopediatria / Faculdade de Odontologia de Bauru/USP

2002: Professor Responsável pela disciplina de Odontopediatria da Universidade do Planalto Catarinense, UNIPLAC, SC

Associações: Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica - SBPqO
Associação Brasileira de Odontologia - ABO

Dedicatória

Aos meus pais, **Olacir e Bernardete**, por todo amor, apoio, compreensão, sacrifício e incentivo em mim dispensado durante toda minha vida,

“tudo o que sou é graças a que me ensinaram, amo vocês”.

À minha irmã, **Luciana**, por sempre confiar e incentivar-me em todas as horas.

À meu irmão **Fernando**, iniciante na nossa profissão, obrigado pelo apoio que me deste, orgulho-me de ser “seu mestre e grande incentivador”.

À **Claudia**, mais do que minha namorada e companheira, por junto comigo compartilhar objetivos, sonhos, angústias, tristezas e alegrias, tanto na vida pessoal como profissional, saiba que sem você tudo teria se tornado mais difícil, minha eterna gratidão.

a vocês, dedico este trabalho.

Agradecimentos

Agradeço a **Deus**, por proporcionar esta vida maravilhosa e intensa que possuo.

À **tia Odete**, que foi muito mais do que minha tia, sempre me aconselhando, incentivando e torcendo pelas minhas conquistas, saiba que lhe considero como uma segunda mãe.

Aos grandes amigos, **Glória, Heitor, Marcelo e Rogério**, colegas de curso, pela amizade que aqui se iniciou e com certeza levaremos por toda a nossa vida.

Ao **Prof. Alaor Jason Brenner Júnior**, grande incentivador pela minha escolha em Odontopediatria, agradeço a confiança e amizade por todos esses anos.

Ao meu orientador **Prof. Dr. José Eduardo de Oliveira Lima**, pela amizade, apoio e incentivo durante todo o curso e pela orientação dedicada, e principalmente, pelo que representa na minha formação profissional, científica e filosófica sobre a prevenção da cárie dentária.

À **Profª. Drª. Salete Moura Bonifácio da Silva**, pela maneira amiga, dedicação a Odontopediatria e pela colaboração muitas vezes dedicada à confecção deste trabalho.

Aos demais professores do Departamento de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Bauru/USP, **Prof. Dr. Aymar Pavarini, Prof. Dr. Bernardo Gonzalez Vono, Profª. Drª. Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado, Profª. Drª. Maria Francisca Thereza Borro Bijjela e Prof. Dr. Ruy César Camargo Abdo**, responsáveis pelo meu conhecimento na Odontopediatria.

À **Profª. Drª. Olinda Tarzia**, colaboradora deste trabalho, pela disponibilidade, compreensão, paciência e amizade com que sempre me acolheu, indispensável à concretização deste trabalho, o meu muito obrigado

Ao **Prof. Giovanni Mello**, coordenador do curso de Odontologia da Universidade do Planalto Catarinense/ UNIPLAC, na qual tenho me dedicado como docente, pela oportunidade de crescimento e também por algumas vezes me ausentar, tendo que me dedicar a confecção deste trabalho.

Às professoras de Odontopediatria da UNIPLAC, **Claudia e Kátia**, por compartilharem comigo o início da carreira docente.

Agradeço ainda:

À **cirurgiã dentista Patrícia**, profissional responsável pelo Consórcio Intermunicipal da Promoção Social, pela disponibilidade em nos aceitar nesta instituição, sem o qual seria impossível a realização deste trabalho.

Meus agradecimentos às **crianças e adolescentes** que foram voluntários desta pesquisa, pois sem vocês este trabalho não poderia ser realizado.

À Faculdade de Odontologia de Bauru/USP, por ter me recebido como mais um integrante da sua grande família, na pessoa da **Profª. Drª. Maria Fidela de Lima Navarro** e à Comissão de Pós-Graduação, representada pelo **Prof. Dr. José Carlos Pereira**.

Aos colegas de Mestrado: **Andréa, Daniela, Érika, Glória, Heitor, Liliane, Marcelo, Rogério, Sheila e Thaís**, pela amizade e companheirismo nestes anos.

Às funcionárias do Departamento de Odontopediatria da FOB/USP: **Claudia, Estela, Fátima, D. Lia, Lilian e D. Wilma**, pela atenção e amizade.

Ao Prof. José Roberto Pereira Lauris (FOB/USP) pela orientação e execução da análise estatística dos dados.

Aos **Profs. Drs. Mauro e Marília**, do Departamento de Bioquímica da FOB/USP, e funcionários **Ovídio e Thelma**, pela prontidão em todas as solicitações.

Aos funcionários da Biblioteca da FOB/USP, **Valéria, César, Rita e Vera** entre outros e aos funcionários do xerox que sempre estiverem prontos a colaborar na confecção deste trabalho.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para que este trabalho fosse concluído.

Sumário

LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii
RESUMO.....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	06
2.1- Placa dentária.....	07
2.2- Chás.....	31
3. PROPOSIÇÃO.....	50
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	52
4.1- Material.....	53
4.1.1- Materiais utilizados na coleta da placa dentária.....	53
4.1.2- Materiais utilizados para o tratamento da placa dentária.....	53
4.1.3- Reagentes utilizados para o tratamento da placa dentária....	54
4.1.4- Materiais utilizados para o estudo da fermentação da placa dentária	55
4.1.5- Reagentes utilizados para o estudo da fermentação da placa dentária.....	56
4.1.6- Materiais utilizados para o estudo da síntese de polissacarídeos extracelulares e dosagem de carboidratos totais.....	57
4.1.7- Reagentes utilizados para o estudo da síntese de polissacarídeos extracelulares e dosagem de carboidratos totais.....	58
4.1.8- Tipos de chás utilizados.....	59
4.2 – Métodos.....	59
4.2.1- Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.....	60
4.2.2- Seleção da amostra e coleta da placa dentária.....	60
4.2.3- Tratamento da placa dentária.....	62
4.2.4- Fermentação da placa.....	63
4.2.4.1- Tampão fosfato de sódio 0,01M pH 6,8.....	64
4.2.4.2- Glicose 2,5%.....	64
4.2.4.3- Suspensão da placa.....	64
4.2.4.4- Preparo dos chás utilizados.....	64
4.2.4.5 Hidróxido de sódio 0,05M.....	65
4.2.4.6- Vermelho de cresol.....	65
4.2.5- Esquema do experimento.....	65
4.2.6- Titulação dos ácidos de fermentação da placa dentária.....	68
4.2.7- Síntese de polissacarídeos extracelulares.....	69
4.2.7.1- Sacarose 1M.....	70
4.2.7.2- Chás utilizados.....	70
4.2.7.3- Hidróxido de potássio 1N (KOH).....	70
4.2.7.4- Fenol 5%.....	70

4.2.7.5- Ácido sulfúrico concentrado (H ₂ SO ₄).....	71
4.2.8- Esquema do experimento.....	71
4.2.9- Dosagem de carboidratos totais.....	73
4.2.10- Análise estatística.....	75
5. RESULTADOS.....	76
5.1- Fermentação da placa dentária <i>in vitro</i>	77
5.2- Síntese de polissacarídeos extracelulares (PE) pela placa dentária <i>in vitro</i>	85
6. DISCUSSÃO.....	90
7. CONCLUSÕES.....	99
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	101
ABSTRACT.....	111
ANEXOS.....	114

Lista de Figuras

- FIGURA 1-** Valores médios da fermentação do grupo controle (glicose 2,5%), dos diferentes tipos de chás (grupo teste_(A)), dos chás acrescido de glicose (grupo teste) e da somatória do grupo teste_(A) com o grupo controle (glicose 2,5%).....83
- FIGURA 2-** Comparação entre os diferentes tipos de chá para a síntese de polissacarídeos extracelulares.....87

Lista de Tabelas

TABELA 1- Resultados da fermentação do grupo controle (glicose) em $\mu\text{g/mL}$ de NaOH.....	78
TABELA 2- Resultados da fermentação do grupo teste (chá acrescido de glicose) em $\mu\text{g/mL}$ de NaOH.....	78
TABELA 3- Resultados da fermentação do grupo teste _(A) (chá) em $\mu\text{g/mL}$ de NaOH.....	79
TABELA 4- Resultados da fermentação do grupo teste _(A) (chá) somado à fermentação do grupo controle (glicose) em $\mu\text{g/mL}$ de NaOH.....	80
TABELA 5- Resultado da análise de variância a dois critérios, considerando-se o tipo de chá, a condição dos grupos (teste (chá acrescido de glicose); teste _(A) (chá) somado ao grupo controle(glicose)) e a interação entre os dois fatores anteriores.....	81
TABELA 6- Resultados do teste de Tukey-Kramer para comparações entre os tipos de chás e as condições do grupo teste (chá acrescido de glicose) e do grupo teste _(A) (chá) somado ao grupo controle (glicose).....	82

TABELA 7- Resultados da síntese de polissacarídeos extracelulares pela pela placa dentária <i>in vitro</i> em relação aos grupos testados (controle, Ccam, Ced e Ccid) em µg de glicose.....	86
TABELA 8 - Resultado da análise de variância a um critério (ANOVA) para comparação dos grupos testados (controle, Ccam, Ced e Ccid).....	88
TABELA 9 - Resultados do teste de Tukey-Kramer para comparações intergrupos (controle, Ccam, Ced e Ccid) das sínteses de PE.....	89

Lista de Siglas, Símbolos e Palavras de Língua Estrangeira

$\bar{X}$ = média

%= por cento

dp= desvio-padrão

g= gramas

In situ (latim)= em sítio, no local (no caso, cavidade bucal)

In vitro (latim)= em laboratório

In natura (latim)= natural, natureza

In vivo (latim)= no ser humano

pH= potencial hidrogeniônico

KOH= hidróxido de potássio

L= litro

M= molar, molaridade

mL= mililitros

PE= polissacarídeo extracelular

Ccam= chá de camomila

Ccid= chá de cidreira

Ced= chá de erva doce

mg= miligramas

ppm= parte por milhão

p= probabilidade

“pool”= mistura

PM= peso molecular

rpm= rotações por minuto

μL= microlitro

NaOH= hidróxido de sódio

H₂SO₄= ácido sulfúrico

N= normal, normalidade

nm= nanômetro

μg= micrograma

Resumo

Resumo

O objetivo deste trabalho foi analisar *in vitro* o efeito exercido pelos chás de camomila, erva doce e cidreira em relação ao metabolismo da placa dentária humana (fermentação e síntese de polissacarídeos extracelulares). Placa dentária foi coletada de crianças e adolescente, formando assim um "pool" de placa que foi tratado em laboratório e submetido a processos bioquímicos. Para a fermentação os grupos testados foram divididos em grupo endógeno, controle (glicose 2,5%), teste (chá acrescido de glicose), teste_(A) (chá); para a síntese de polissacarídeos extracelulares os grupos testados eram grupo controle (sacarose) e o grupo teste_(A) (chá). Aos resultados obtidos foi aplicado o teste de análise de variância (ANOVA) a um e dois critérios, com nível de significância de 5%, havendo significância o teste de Tukey-Kramer era empregado para comparação entre os diferentes tipos de substrato. Quanto à fermentação, o chá de camomila acrescido de glicose mostrou-se mais prejudicial que os outros chás testados, sendo a diferença entre eles estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Com relação à síntese de polissacarídeos extracelulares, esta foi maior para todos os chás testados quando comparados com o grupo controle (sacarose), sendo o chá de cidreira o único com significância estatística ($p = 0,009$). Conclui-se que "*in vitro*" nenhum dos chás utilizados inibiu a fermentação ou a síntese de polissacarídeos extracelulares da placa dentária humana.

1. Introdução

Introdução

Nos últimos anos, a placa dentária tem sido intensivamente pesquisada nos seus aspectos morfológicos, microbiológicos, imunológicos e bioquímicos, como reflexo de novos e importantes avanços no que diz respeito à sua atuação nas doenças bucais, sobretudo na cárie dentária.

O Council on Dental Therapeutics da American Dental Association (ADA)¹⁴ define a placa dentária como sendo uma entidade altamente variável, resultante da colonização e crescimento de microorganismos nas superfícies dentárias e de tecidos moles bucais e consistindo de um número de espécies microbianas e filtrados embebidos em uma matriz extracelular. De acordo com CARLSSON; EGELBERG (1965)¹⁰ é uma comunidade bacteriana formada pela interação entre os microorganismos e o seu meio ambiente e, junto a este meio, constitui uma unidade estrutural e funcional, um ecossistema microbiano.

Clinicamente, a placa dentária é vista como um acúmulo orgânico branco ou esbranquiçado de espessura variável, dependendo da sua localização, bem como da qualidade e da frequência de higiene bucal.

A placa dentária cariogênica, através de seu metabolismo, com ênfase para a produção de polissacarídeos extracelulares, polissacarídeos intracelulares e a formação de ácidos, pode ser considerada como o agente

básico para o desenvolvimento da cárie dentária⁴. Esses polissacarídeos são sintetizados a partir da sacarose da dieta mediante a ação enzimática da glicosiltransferase.

A microbiota da placa é extremamente complexa e variável, existindo em sua composição, microorganismos que possuem capacidade de colonizar a superfície dentária. Esses microorganismos devem apresentar potencial acidogênico (produzir ácidos a partir da fermentação) e acidúrico (viver bem em meio ácido) ser capazes de formar polissacarídeos extracelulares insolúveis a partir do substrato da dieta, bem como formar e utilizar polissacarídeos intracelulares².

O estudo de elementos que interferem tanto na capacidade de fermentação da placa como na síntese de polissacarídeos é de grande interesse devido à importância do pH ácido e da presença do mutano, essencial na formação estrutural da matriz da placa dentária e na etiologia da cárie dentária.

A placa dentária é metabolicamente ativa, produzindo vários produtos finais ácidos e básicos, e esses processos ocorrem mesmo na ausência de um fornecimento contínuo de substratos da dieta, possivelmente a partir de polissacarídeos endógenos. Um número crescente de pesquisas tem avaliado a cariogenicidade de alimentos e bebidas, freqüentemente através do estudo do pH da placa dentária exposta a diversos alimentos e bebidas. Todavia, KASHKET; YASKELL²⁵, em 1992, mostraram que a desmineralização do

esmalte não persiste necessariamente durante todo o período de pH baixo. É mais provável que a desmineralização fosse limitada por outros fatores, como a presença de altas concentrações de íons de cálcio e de fosfato na placa²⁵.

Em 1980, VAN HOUTE⁵³, descreveu uma relação direta entre dieta e composição bacteriológica da placa: uma maior ingestão de carboidratos leva a um aumento da acidez e da síntese de polissacarídeos extracelulares, selecionando bactérias acidogênicas e acidúricas, que aumentam o potencial de queda de pH, favorecendo a desmineralização.

Na atualidade muitas mães utilizam alguns tipos de chás como complemento alimentar para seus bebês, até mesmo por recomendação de médicos pediatras¹¹. A utilização de chás na dieta infantil é uma prática bastante comum que se inicia no próprio serviço de saúde e continua no domicílio, ocorrendo principalmente nos países menos desenvolvidos, entre eles o Brasil^{7,57,58}.

Os chás são produtos constituídos de partes de vegetais inteiros, fragmentados ou moídos, obtidos por processos tecnológicos adequados a cada espécie, utilizados exclusivamente na preparação de bebidas alimentícias por infusão ou decocção em água potável, não podendo ter finalidades farmacoterapêuticas⁴⁰.

Normalmente são encontrados no comércio muitos tipos de chás dessecados e embalados em sacos pré-processados, para consumo individual

e imediato, que atraem o consumidor pela facilidade do uso, preço de aquisição e longo período de validade quando comparado ao produto “*in natura*”.

Muitas vezes as infusões de chás são utilizados como soluções alternativas para a hidratação oral em pediatria¹³, levando à necessidade do conhecimento de algumas de suas características, relacionadas a um possível potencial cariogênico. Assim, a avaliação do comportamento dessas substâncias na cavidade bucal, com relação à fermentação e síntese de polissacarídeos da placa dentária é válido, pois seus resultados poderão ser mais um parâmetro na adoção de posturas que visem manter a integridade e boa saúde bucal das crianças, evitando assim o estabelecimento da doença cárie, que nos bebês é conhecida como cárie precoce da infância⁵¹.

2. Revisão de Literatura

Revisão de Literatura

2.1 PLACA DENTÁRIA

O conhecimento dos mecanismos envolvidos na multifatoriedade da cárie dentária pode ajudar no estabelecimento de medidas preventivas eficazes. Sabe-se que a placa dentária é um material depositado sobre a superfície dos dentes e de grande importância na formação da cárie dentária, pois os microorganismos da placa, por sua atividade metabólica fazem com que o pH no local se torne bastante baixo.

O primeiro autor a medir a variação do pH da placa dentária após o consumo de sacarose foi STEPHAN⁴⁷, em 1940. Este autor montou um dispositivo que consistia de um medidor de pH num dente protético e deste experimento obteve uma curva, chamada de curva de Stephan, que representa a variação do pH da placa após a ingestão de carboidratos.

Os polímeros extracelulares de importância na adesão bacteriana podem ser fornecidos a partir de qualquer fonte de carbono fermentável, mas possuem significados especiais os polissacarídeos formados da sacarose na superfície externa da célula⁵⁰.

Algumas enzimas presentes na placa são de grande importância, pois estão envolvidas com a sua patogenicidade, como é o caso da glicosiltransferase, que é uma enzima produzida pelos microorganismos da

placa e lançadas na matriz, onde vão levar à formação de polissacarídeos extracelulares, os quais permitem a aderência das bactérias à superfície dentária, além de funcionarem como reserva energética para os microorganismos da placa. Esta enzima age sobre a sacarose, degradando-a e pode a partir daí polimerizar a glicose, formando os polímeros dextrano (degradável) e mutano (não degradável)⁹.

A acidez do ambiente do dente é influenciada não apenas pelo número e espécies de bactérias presentes, mas também pela capacidade tampão da saliva e do fluído da placa, pelo índice de fluxo e viscosidade da saliva, pelas características de difusão da placa, pela presença de fluoreto no esmalte e na placa, pelo tipo de dieta alimentar ingerida e pela frequência de ingestão de açúcar⁵⁰.

A relação entre cárie dentária e a produção de ácidos pelas bactérias a partir de diferentes carboidratos e suspensão de placa foi estudado por FROSTELL (1964)²². O autor demonstrou que há uma rápida produção de ácido a partir da glicose, sacarose, frutose e maltose, e também em menor escala a partir do amido e lactose. Com o objetivo de determinar quantitativamente a produção de ácidos em suspensões de placa, comparando com diferentes carboidratos, trabalhou com adultos que necessitavam de tratamento dentário, que suspenderam sua higienização por 2 dias, e, sem ingerir nada sólido ou líquido, realizaram um bochecho para remover resíduos alimentares e tiveram amostras de placa coletadas. As

amostras foram suspensas em solução de Renger ou água destilada e armazenados. Procedeu-se o tratamento com 3,0mL de tampão fosfato 5mM, 2,0mL de solução de carboidrato com concentração variada, e 1,0mL de suspensão de placa. Ao início do experimento o pH era de $6,9 \pm 0,2$, a produção de ácido foi acompanhada por aproximadamente 1 hora, e após foi titulada utilizando NaOH 0,01N. Com seus resultados o autor concluiu que os experimentos devem ser realizados em condições anaeróbias, uma vez que há esta condição na placa dentária. Deve ser conduzida em períodos curtos, pois a atividade da suspensão decresce gradativamente. A diluição da placa dentária diminui a sua atividade com o aumento desta diluição. Por fim, o pH deve ser mantido constante, diminuindo a atividade da placa com a diminuição do pH.

Avaliando o efeito dos níveis de sacarose da dieta e na composição microbiológica da placa dentária com 4 e 12 dias, STAAT et al.⁴⁶, em 1975 submeteram 8 voluntários a dois períodos sem higiene bucal, variando o consumo de sacarose na dieta: alta ou baixa quantidade. Os estreptococos foram identificados de acordo com a morfologia colonial e a capacidade de fermentar manitol e sorbitol entre *S. mutans*, *S. sanguis* e *S. salivarius*. A quantidade de placa formada não foi afetada pela quantidade de sacarose ingerida, mas a placa obtida após a dieta rica em sacarose continha, significativamente, mais microorganismos. A placa de 12 dias apresentou menor densidade bacteriana em relação à placa de 4 dias, em ambas as

dietas. Na placa de 4 dias, a porcentagem de *S. mutans*, em relação ao total de estreptococos, foi estatisticamente diferente nas duas dietas, com média de 2,1% e 0,7% nas dietas com alta e baixa quantidade de sacarose, respectivamente; com 12 dias, a porcentagem de *S. mutans* foi em média de 1,6% e 0,5% respectivamente, nas dietas com alta e baixa quantidade de sacarose, sem diferença estatística entre elas. Quando os *S. mutans* se apresentavam em níveis detectáveis na placa dentária, a porcentagem de *S. sanguis* era reduzida. Os lactobacilos tiveram um aumento significativo na placa de 4 dias no período de dieta rica em sacarose e a placa de 12 dias apresentou a mesma tendência. Os resultados sugerem que o efeito da sacarose da dieta na composição microbiológica ocorre em função da idade da placa, sendo que o aumento do número de microorganismos associados à cárie ocorre principalmente nos períodos iniciais de maturação. Além disso, a composição microbiológica da placa de 4 dias variou entre os voluntários, sendo que, aos 12 dias, as diferenças entre eles não foram tão evidentes.

Em 1981, ABELSON; MANDEL¹ realizaram um experimento para avaliar a queda do pH da placa dentária em indivíduos cárie ativos e livres de cárie, relacionando-a com a ação salivar. O pH da placa acumulada durante 3 dias foi medido *in vivo* após 5, 10, 20 e 45 minutos da aplicação de uma solução de sacarose a 10%. Este protocolo foi realizado 3 vezes, variando apenas o acesso à saliva: (a) placa dentária isolada do contato com a saliva; (b) placa dentária com acesso livre à saliva; (c) placa dentária com acesso

livre à saliva estimulada por uma goma de mascar contendo sacarose. A maior queda do pH ocorreu quando a placa dentária foi isolada do contato com a saliva e a menor durante a estimulação salivar, nos dois grupos. Não houve diferença na queda do pH entre os dois grupos quando não foi permitido o acesso da saliva à placa dentária, mas os indivíduos livres de cárie apresentaram menor queda do pH nos protocolos "b" e "c", evidenciando o papel da saliva na diferença entre os dois grupos.

ZERO; VAN HOUTE; RUSSO⁶², em 1986, avaliaram o papel do polissacarídeo intracelular de reserva produzido pelos microorganismos cariogênicos na desmineralização do esmalte *in situ*. Cepas *S. mutans* (Ingbritt-1600), *S. sanguis*, *S. mitis*, *S. salivarius* e *A. viscosus* foram cultivadas por 18 horas em caldos com duas concentrações diferentes de glicose: 0,25% e 2,2%. Massas bacterianas dessas culturas foram obtidas por centrifugação e colocadas sobre blocos de esmalte bovino, montados em um dispositivo intrabucal palatino utilizado por 3 voluntários. O dispositivo intrabucal foi utilizado por 45 minutos, sendo realizado um bochecho com solução de sacarose ou glicose a 10%, no primeiro minuto de uso. As placas de *S. mutans* que tinham sido cultivadas com glicose a 2,2% exibiram a maior desmineralização do esmalte e queda do pH, independentemente da realização do bochecho ou não. Isso comprova que a produção de ácidos pelas bactérias da placa, a partir de fontes endógenas de açúcar, pode ser importante na etiologia da cárie. O mesmo efeito foi observado com os *S.*

sanguis e *S. mitis*, mas em menor grau. Os *S. salivarius* não causaram desmineralização independente da concentração de glicose no caldo de cultivo ou da realização ou não do bochecho.

Continuando a pesquisa anterior, os autores avaliaram o papel da matriz extracelular na desmineralização do esmalte⁶³. *S. mutans*, cepa Ingbritt-1600, foram cultivados em um caldo contendo até 4% de sacarose, por 18 horas. A produção de ácidos das massas bacterianas, obtidas por centrifugação desses cultivos, foi avaliada *in vitro* e a desmineralização do esmalte foi determinado *in situ*. Placas artificiais também foram preparadas e testadas *in situ* e *in vitro*, a partir de cepas de *S. mitis*, *S. sanguis* e *S. salivarius*, cultivadas sem sacarose, com 2% de sacarose, ou misturadas com matriz extracelular produzida por *S. mutans*. Análise de DNA revelou que as placas obtidas de culturas de *S. mutans*, realizadas com 2% de sacarose, apresentavam uma densidade celular 20 vezes menor do que as amostras de culturas sem sacarose, indicando que a matriz extracelular compreendia aproximadamente 95% dessa placa. Além disso, no teste *in situ*, essa placa causou desmineralização marcante, sendo que a placa cultivada sem sacarose não causou desmineralização. Com o aumento da concentração de sacarose no meio de cultivo, houve diminuição na produção de ácidos *in vitro*, mas um aumento na proporção de matriz extracelular e na desmineralização do esmalte *in situ*. Ao contrário do encontrado no trabalho anterior, quando a placa cultivada com 2% de sacarose não foi exposta a

nenhum carboidrato, não houve queda do pH *in vitro*, nem desmineralização *in situ*. A explicação dada pelos autores para este achado foi que a quantidade de matriz extracelular, produzida a partir da sacarose, criou um espaço entre as células, que produziram ácidos a partir do açúcar intracelular em quantidade insuficiente à ocorrência de desmineralização, ou que a cepa utilizada não produz reserva intracelular a partir da sacarose. Os *S. sanguis* e *S. salivarius* produziram matriz extracelular, mas os *S. mitis* não. A presença de matriz extracelular produzida por eles ou obtida de *S. mutans*, também aumentou seu potencial de desmineralização, mas de maneira menos pronunciada. Os resultados do estudo mostraram que, apesar das placas dentárias obtidas de culturas de *S. mutans* suplementadas com sacarose apresentarem menor quantidade de células e menor capacidade de diminuir o pH *in vitro*, elas levam a uma maior desmineralização do esmalte *in situ*, devido provavelmente à presença de matriz extracelular, constituída em sua maior parte de glucanos. Estes atuariam como barreiras de difusão, limitando a saída dos ácidos e o acesso dos tampões salivares a camadas profundas da placa.

Em 1987, PINHEIRO et al.³⁸ com o objetivo de avaliarem a influência dos extratos de guaraná e de *Stevia rebaudiana* Bertoni (folhas), e do esteviosídeo, sobre a produção de ácidos de fermentação e sobre a síntese de polissacarídeos extracelulares insolúveis da placa dentária *in vitro*, realizaram um estudo com coleta de placa dentária de crianças. Antes da

coleta as crianças realizavam um bochecho com água destilada a fim de remover os restos de alimentos, em seguida as placas eram coletadas com curetas esterilizadas e armazenadas em vidros imersos em gelo picado até proceder aos testes em laboratório. O extrato de guaraná estimulou significativamente a fermentação *in vitro* da placa dentária e, não teve nenhuma ação inibitória sobre a síntese de polissacarídeos insolúveis. O extrato de *Stévia rebaudiana Bertoni* também estimulou a fermentação da placa, mas apresentou um grande efeito inibitório da síntese de polissacarídeos insolúveis. Embora o esteviosídeo tenha apresentado uma diminuição da fermentação da placa, esta não foi significativa, por outro lado, o esteviosídeo em baixa concentração inibiu significativamente a síntese de polissacarídeos insolúveis da placa dentária. Com isso os autores concluíram que muitos produtos naturais apresentam propriedades anticariogênicas e antiplaca que os indicam como auxiliares de medidas preventivas da cárie dentária.

No ano de 1989, VAN HOUTE; RUSSO; PROSTAK⁵⁴ avaliaram a diferença da queda do pH *in situ*, *in vitro* e a capacidade tampão de massas bacterianas formadas por *S. mutans* cepa Ingbritt-1600, cultivados na presença ou ausência de sacarose. A queda do pH *in situ* foi determinada durante 45 minutos, após bochecho com solução de glicose a 10%. Além disso, os autores mediram a porosidade dessas placas artificiais. A observação, no microscópio eletrônico de transmissão, mostrou que as

placas obtidas de *S. mutans*, cultivados em caldo com 2% de sacarose, apresentavam células espaçadas e alta quantidade de matriz extracelular, ao contrário das placas obtidas de células cultivadas sem adição de sacarose, nas quais a concentração celular e a sua proximidade foram muito maiores. Placas com maior conteúdo de matriz extracelular e menor quantidade de células levaram a um pH mínimo mais baixo e uma queda do pH mais prolongada no teste *in situ*, pelo metabolismo da glicose na solução de bochecho e não das fontes endógenas de carboidratos ou da matriz extracelular. Além disso, as placas dentárias obtidas de culturas sem adição de sacarose tiveram uma capacidade tampão maior do que aquelas cultivadas com 2% de sacarose, devido à maior densidade celular e à baixa capacidade tampão de matriz extracelular. A porosidade das placas contendo alta quantidade de matriz extracelular foi maior do que a das placas sem matriz extracelular. Os autores sugeriram que, nas placas com baixa quantidade de matriz extracelular, apenas as bactérias da periferia da placa metabolizam a glicose do bochecho; já na placa rica em matriz extracelular, a glicose é utilizada também pelas bactérias da camada mais interna, visto que o substrato penetra com maior facilidade e há menor quantidade de bactérias para metabolizá-lo.

TANZER⁴⁹ em 1989, escreveu sobre os mecanismos envolvidos na formação da placa dentária cariogênica, entre eles as características fenotípicas dos estreptococos mutans relacionados à sua virulência e a

relação entre microbiota, saliva, dieta e dente. A saliva tem um papel importante na des e remineralização dos dentes, limpeza de restos alimentares e bactérias e na diluição e neutralização dos produtos metabólicos da placa. Dentre os fatores que tornam os estreptococos mutans as bactérias mais cariogênicas estão: capacidade de sintetizar polissacarídeos a partir da sacarose; adesão à estrutura dentária, extremamente facilitada na presença de sacarose, devido à produção do polissacarídeo extracelular insolúvel; acidogenicidade a partir de uma variedade de açúcares simples; produção de ácido láctico; aciduricidade; transporte de sacarose e outros açúcares simples por processos energéticos; formação e degradação de polissacarídeos intracelulares de reserva; adsorção a dentes cobertos pela película adquirida e a outras bactérias. A maioria desses fatores de virulência fornecem aos estreptococos mutans uma vantagem ecológica nas superfícies dentárias e uma aparente vantagem competitiva sobre as outras bactérias que colonizam os dentes.

VAN HOUTE et al.⁵⁵ avaliaram em 1991 o potencial acidogênico e o número de estreptococos mutans na placa dentária de manchas brancas e superfícies hígidas de 12 indivíduos cárie ativos. Após 48 horas sem higiene, duas amostras de placa, uma de superfície hígida e outra de mancha branca, foram coletadas de superfícies vestibulares e linguais dos dentes. A queda do pH foi avaliada após acréscimo de 10µL de uma solução de glicose na suspensão de placa. Além disso, o número de bactérias totais, estreptococos

totais, estreptococos mutans e lactobacilos foi determinado. O pH inicial e final foi menor para as amostras de placa de manchas brancas e a queda do pH foi mais rápida. A porcentagem de estreptococos mutans em relação às bactérias totais também foi maior (2,9%), nas placas de mancha branca, do que nas placas de superfícies hígidas (0,3%). Todas as amostras de placa com mais de 1% de mutans exibiram uma alta capacidade de queda do pH; entretanto, 5 amostras com tempo de queda do pH abaixo de 4 minutos tiveram baixos níveis de mutans (menos de 0,01% ou 0,1%). As proporções de lactobacilos em ambas as placas foram menores que 0,01%. Os resultados indicam que a relação entre o potencial de queda do pH está normalmente associado aos níveis de estreptococos mutans, algumas amostras de placa com alta queda do pH apresentaram níveis baixos ou negligíveis de mutans e lactobacilos. Isto sugere o envolvimento de outros microorganismos acidogênicos, provavelmente entre o grupo dos estreptococos, devido ao seu alto número na placa e seu potencial cariogênico em roedores.

Em 1993, SANSONE et al.⁴¹ avaliaram a capacidade de acidogênese de estreptococos mutans e outros estreptococos obtidos da placa dentária de indivíduos cárie ativos e livres de cárie. Para isso dividiram os voluntários em 3 grupos, no qual o primeiro grupo era formado por indivíduos cárie ativos, onde a placa dentária foi coletada, após 48 horas de ausência de higiene bucal, de superfícies hígidas e com mancha branca. O grupo 2 era composto

de indivíduos livres de cárie e o grupo 3 por indivíduos com cárie de raiz. As amostras de placa dentária foram analisadas quanto à queda do pH e composição microbiológica, que incluiu a contagem do número de bactérias totais, lactobacilos, estreptococos totais e estreptococos mutans. Além disso, a acidogenicidade de colônias isoladas de estreptococos “não mutans” foi avaliada em um caldo contendo 1% de glicose, pela medição do pH do caldo após 3 dias. O pH inicial das amostras de placa de superfícies com mancha branca do grupo 1 foi ligeiramente menor do que o das superfícies hígidas do mesmo grupo, que foi menor que o pH inicial das amostras de placa do grupo 2. A queda do pH também foi mais rápida nas amostras de placa de mancha branca. A porcentagem de estreptococos mutans nas amostras do grupo 1 foi ligeiramente maior nas áreas de cárie ativa. O pH final dos caldos contendo as cepas de estreptococos “não mutans” obtidas do grupo 1 variou de abaixo de 4,2 a acima de 5,0, contra 3,95 a 4,10 das cepas de estreptococos mutans. Não houve diferença na capacidade de baixar o pH dos estreptococos “não mutans” entre as duas amostras de placa do grupo 1, mas as cepas com pH final no caldo menor que 4,2 ou 4,4 foram a maioria. Nos indivíduos livres de cárie houve predominância de cepas de estreptococos “não mutans” com pH final acima de 4,6. Os níveis de lactobacilos foram baixos em todos os grupos. Nas amostras de placa com menos de 0,5% de mutans a proporção dos estreptococos “não mutans” com pH final abaixo de 4,2 ou 4,4 foi muito maior. Segundo os autores,

entre os estreptococos “não mutans” estariam *S. sanguis*, *S. mitis* ou outros; nenhuma dessas espécies ou grupos tem correlação positiva com cárie, o que ajudou na concepção de que, dentre os estreptococos, apenas os mutans são considerados como fator etiológico importante. Os autores sugerem outras investigações sobre o papel dessas bactérias na etiologia da cárie, visto que o pH final é um indicador de acidogenicidade, mas a velocidade de produção de ácidos deve ser maior para os estreptococos mutans.

MARGOLIS et al.³⁰ em 1993, estudaram as diferenças entre a placa dentária de indivíduos livres de cárie e indivíduos cárie ativos, antes e após a realização de bochechos com soluções de diferentes concentrações de sacarose. Antes da coleta da placa, os voluntários eram orientados a suspender a higiene bucal por 48 horas. A composição bioquímica da placa nos dois grupos de indivíduos antes da exposição à sacarose era similar. Após o bochecho, o pH da placa caiu rapidamente, sendo bastante afetado pela concentração de sacarose e menor para indivíduos cárie ativos. A porcentagem de estreptococos do grupo mutans dos indivíduos livres de cárie variou de 0 a 2,5% do total de microorganismos cultiváveis, contra 0,1 a mais de 10% nos indivíduos cárie ativos. Antes da exposição à sacarose, a placa dos indivíduos livres de cárie era mais supersaturada com relação aos minerais do esmalte do que a dos indivíduos cárie ativos e o grau de saturação caiu menos para os primeiros, após o bochecho.

PINHEIRO et al.³⁹ em 1994, realizaram um trabalho com o objetivo de avaliar três gomas de mascar de diferentes formulações (sacarose, xilitol e manitol) com relação à sua influência sobre a fermentação salivar e sobre o metabolismo *in vitro* e *in situ* da placa dentária. Para o estudo da fermentação salivar 7 voluntários adultos participaram do experimento, no qual era oferecido, alternadamente, em dias sucessivos, um tablete de goma de mascar para mastigação, coletando-se os primeiros 7 mL de saliva. O pH era medido imediatamente e em seguida, as salivas eram levadas a estufa a 37°C durante 6 horas, sendo que em intervalos de 2 horas era realizado nova leitura de pH. Em relação à fermentação da placa dentária *in situ*, crianças de 8 a 10 anos participaram deste experimento. Os voluntários eram orientados a não realizarem higiene bucal durante três dias antes do experimento. A avaliação das amostras de pH era feita em um medidor de pH digital, equipado com microeletrodo. Após determinação da placa inicial, era oferecido à criança um tablete de goma para mastigá-la durante 2 minutos. Posteriormente procedia-se a coleta de placa e determinação do pH nos tempos de 5, 10, 20, 30 e 40 minutos. O estudo da fermentação e síntese de polissacarídeos extracelulares insolúveis pela placa dentária *in vitro* foi realizado com placas recém coletadas de escolares (7 a 12 anos). As placas eram então levadas ao laboratório, onde eram processadas com as gomas de mascar testadas. Os resultados obtidos demonstraram que a goma convencional (açúcar) é fermentada pela saliva e pela placa dentária de

forma semelhante à solução de sacarose. Ao contrário, tanto a goma de xilitol quanto a teste (manitol) não são fermentadas pela saliva e nem pela placa. As gomas convencionais promovem a formação de placa por estimularem a síntese de polissacarídeos extracelulares insolúveis. As gomas com xilitol e com manitol, além de não promoverem a formação de placa, estimulam a degradação de polissacarídeos já existentes na placa. Os autores concluíram que as gomas de xilitol e teste (manitol) por não serem fermentadas pela saliva e nem pela placa dentária, podem ser indicadas como coadjuvantes de medidas preventivas da cárie dentária.

No mesmo ano, VILLAVICENCIO et al.⁵⁹ avaliaram a influência do pré-tratamento com soluções de fluoreto estanoso e fluoreto de sódio sobre o metabolismo da placa dentária humana, quanto à fermentação e à síntese de polissacarídeos extracelulares insolúveis. Participaram do estudo crianças na faixa etária de 7 a 12 anos, dos quais foram coletadas as amostras de placa dentária, duas vezes por semana. As amostras de placa eram levadas ao laboratório e processadas com as substâncias testadas. Todas as substâncias testadas inibiram tanto a fermentação como a síntese de polissacarídeos extracelulares insolúveis, sendo que o fluoreto estanoso apresentou a maior porcentagem de inibição da fermentação e apresentou diferença estatisticamente significativa entre ele e os grupos de fluoreto de sódio (NaF I pH=3,4 e NaF II pH= 7,0). Os resultados de inibição mostram que a porcentagem mais alta de inibição da síntese de polissacarídeos

extracelulares insolúveis pela placa dentária (88,29%) foi também da solução de fluoreto estanoso e que as porcentagens das soluções de fluoreto de sódio foram (NaF I 45,23% e NaF II 15,66%). Com isso os autores concluíram que as soluções de fluoreto estanoso inibiram tanto a fermentação como a síntese de polissacarídeos extracelulares insolúveis de forma estatisticamente significativa, em relação ao controle e às soluções de NaF II (pH= 7,0) e NaF I (pH= 3,4) nessa ordem; e a solução de NaF I inibiu tanto a fermentação como a síntese de polissacarídeos extracelulares insolúveis, de forma estatisticamente significativa em relação ao controle e a solução NaF II e esta inibiu apenas a síntese, de forma estatisticamente significativa em relação ao grupo controle.

Ainda em 1994, MARSH³¹ fazendo uma revisão sobre a microbiologia da placa dentária, criticou a hipótese da placa específica. Esta propunha que apenas um número limitado de microorganismos presentes na placa dentária está envolvida no desenvolvimento da cárie, mas encontra problemas para explicar a ocorrência da doença quando da ausência desses microorganismos na placa, ou a sua presença em locais sem a evidência da doença. Da mesma maneira, a hipótese da placa não específica defende que uma mistura heterogênea de microorganismos presentes na placa poderia participar da cárie, mas não explica a evidência de especificidade demonstrada pelas doenças mediadas por placa. O autor propôs, então a hipótese da placa ecológica, determinando que fatores do ambiente bucal

levam a alteração na microbiota da placa, predispondo um certo local à cárie. Por exemplo, a queda do pH após o metabolismo do açúcar selecionaria os microorganismos mais acidúricos às custas dos mais sensíveis a um pH baixo, principalmente se a frequência de exposição ao açúcar for alta; da mesma maneira, a redução do fluxo salivar causaria uma transformação microbiológica da placa.

VAN HOUTE⁵⁶ em 1994 escreveu sobre o papel dos microorganismos na etiologia da cárie dentária, dizendo haver uma relação dinâmica entre o consumo de carboidratos, composição microbiológica da placa, perfil do pH e atividade de cárie. A cárie pode então ser considerada uma doença infecciosa bacteriana alterada por carboidratos, pois um aumento no número de estreptococos mutans e lactobacilos na placa, induzido pelo consumo de carboidratos, causam uma maior diminuição do pH da placa e aumento no seu potencial cariogênico. Também enfatiza o papel da saliva em regular a virulência desses microorganismos. Ainda relata que uma alta queda do pH pode ocorrer em placas dentárias com uma quantidade mínima de estreptococos mutans e lactobacilos. Os microorganismos envolvidos nessa queda de pH, chamados de “não mutans”, seriam as espécies *S. salivarius*, *S. mitis* e *S. sanguis*.

Estudo realizado por LINGSTRÖM et al.²⁷ em 1994, avaliando a desmineralização do esmalte e da dentina “*in situ*” e a alteração do pH da placa em relação ao consumo de alimentos à base de sacarose e de amido

puderam constatar que a queda no pH após um bochecho de 1 minuto com sacarose a 10% foi maior na placa formada sobre blocos de esmalte nos períodos de consumo de amido e sacarose.

SULLIVAN et al.⁴⁸, 1996, propuseram comparar a correlação entre lesões de cáries e número de estreptococos mutans e lactobacilos na placa dentária e na saliva estimulada, em adolescentes, e descobrir se a variação no índice de cárie poderia ser melhor explicado por uma amostra total de placa do que pela tradicional amostra de saliva, no material todo e em subgrupos com favorável e desfavorável higiene bucal. 60 adolescentes com idade entre 14-15 anos participaram do estudo, no qual a saliva foi obtida por 5 minutos após estimulação com um pedaço de parafina e a placa foi coletada de todas as superfícies dentárias, mas antes foi anotado o índice de placa de cada adolescente. O coeficiente de correlação entre o número de bactérias na saliva e na placa foi de 0,75 para os estreptococos mutans e 0,72 para os lactobacilos. Entretanto, o coeficiente de correlação entre o índice de superfícies cariadas e restauradas e a contagem de mutans e lactobacilos foi baixo, mesmo considerando apenas os indivíduos com higiene bucal desfavorável. Os autores concluíram que a contagem de estreptococos mutans e lactobacilos na placa ou saliva não ajudam a explicar a ocorrência de cárie de modo que possa ser utilizada como ferramenta preditiva.

CURY; REBELLO; DEL BEL CURY¹⁶, em 1997, estudaram *in situ* o grau de saturação da placa bacteriana com relação aos minerais do esmalte, de

acordo com a frequência diária de exposição à sacarose. Doze voluntários participaram do estudo utilizando dispositivos palatinos que continham blocos de esmalte humano. Estes blocos eram obtidos de terceiros molares impactados armazenados em solução de formol por até 1 mês. Os blocos de esmalte eram montados 1 milímetro abaixo do acrílico e cobertos por uma tela plástica para promover o acúmulo de placa. O estudo foi dividido em quatro fases de 28 dias, variando-se a frequência de exposição a uma solução de 20% de sacarose, pingando-se a solução por 0, 2, 4 ou 8 vezes ao dia. Os voluntários eram orientados a removerem o dispositivo intrabucal durante as refeições e utilizarem um dentífrico não fluoretado, porém bebiam água fluoretada. A placa foi coletada 12 horas após a última exposição a sacarose e era analisada quanto ao conteúdo de cálcio, fósforo, flúor e polissacarídeos solúveis e insolúveis. Os resultados mostraram que a placa formada na presença de sacarose apresentou concentrações significativamente menores de cálcio, fósforo e flúor. Não houve diferença na concentração de flúor na placa formada durante 4 ou 8 exposições à sacarose, nem entre a concentração de cálcio e fósforo na placa formada durante 2, 4 ou 8 exposições à sacarose. A concentração de polissacarídeos solúveis não foi diferente nas quatro fases, mas a concentração de polissacarídeos insolúveis foi significativamente maior com 8 exposições à sacarose.

BOWDEN⁶ em 1997 questionou se as composições bacterianas da placa e saliva poderiam diagnosticar a atividade de cárie dos indivíduos. Segundo ele, os testes microbiológicos mostram uma associação íntima entre os odontopatógenos e cárie em indivíduos com alta e baixa atividade da doença, mas não são tão efetivos na detecção de grupos com níveis intermediários de cárie ou em análises individuais. Pode ocorrer cárie na ausência de estreptococos mutans na placa ou, quando estes microorganismos estão presentes em níveis muito baixos, o que sugere que outros microorganismos possam estar envolvidos. Para o autor, os testes microbiológicos deveriam ser utilizados no monitoramento de cada paciente na determinação de alterações no ambiente bucal.

Ainda em 1997, FEJERSKOV²¹ contestou, de maneira interessante, os conceitos de cariologia que têm norteado as pesquisas científicas. Segundo o autor, os conceitos simples de etiologia e patogênese da cárie desenvolvidos no meio do século passado ainda predominam, sem se levar em conta o avanço do conhecimento científico durante as décadas subsequentes. Em relação aos microorganismos cariogênicos, os pesquisadores têm focalizado seus estudos nos estreptococos mutans, ignorando o fato de que várias pesquisas já demonstraram que o número desses microorganismos na placa bacteriana de lesões de cárie ativa varia de níveis não detectáveis até o máximo de 30% da microbiota total. Também se ignora o fato de que um declínio na ocorrência de cárie ocorreu há alguns anos, sem mudanças

aparentes nos níveis salivares de estreptococos mutans na população. Conforme o autor, a cárie não é um evento singular, mas uma sucessão de processos de des e remineralização resultantes do metabolismo bacteriano sobre a superfície do dente. Assim, a cárie é uma doença multifatorial, mas cuja única causa é a placa dentária. Para FEJERSKOV, os estreptococos mutans e os lactobacilos não devem ser considerados como causadores da cárie, mas como microorganismos indicadores, que refletem as condições acidúricas do ambiente.

Em 1998, SANTOS; SANTOS; TARZIA⁴² realizaram um estudo com a finalidade de verificar o efeito inibidor de soluções de NaF 0,05% em pH ácido, neutro e alcalino sobre o metabolismo da placa dentária em relação à fermentação e à produção de polissacarídeos extracelulares. Inicialmente a amostra consistia de 200 crianças de ambos os sexos com idade de 7 e 8 anos, das quais foram selecionados os indivíduos mais placogênicos, sendo então selecionadas 120 crianças. Estas crianças foram divididas em 6 grupos: FA – bochecho diário com solução de NaF 0,05% pH 3,0; grupo HA – bochecho diário com água pH 3,0; grupo FN – bochecho diário com solução de NaF 0,05% pH 7,0; grupo HN – bochecho diário com água pH 7,0; grupo FB – bochecho diário com solução de NaF 0,05% pH 9,0 e grupo HB – bochecho diário com água pH 9,0. Antes do início do bochecho, coletou-se a placa dentária de aproximadamente 50 crianças escolhidas ao acaso, que serviram como grupo controle. Durante 20 dias do período experimental

todas as crianças realizaram bochecho diário. A partir do 18º dia as crianças cessaram a higiene bucal, mas mantiveram a realização do bochecho até o 20º dia quando então foi realizada a coleta da placa dentária, para a realização dos estudos sobre a fermentação e síntese de polissacarídeos extracelulares. Os resultados mostraram que, para a redução de ambos, fermentação e síntese de polissacarídeos extracelulares, a solução de NaF ácida (pH 3,0) apresentou resultados muito superiores aos das soluções neutra (pH 7,0) e alcalina (pH 9,0). Segundo os autores, esses dados sugerem que, sempre que possível, o pH das soluções utilizadas para bochecho deveria ser ácido, para que fossem obtidos melhores resultados em relação à prevenção da cárie dentária, no que diz respeito à alteração do metabolismo dos microorganismos da placa dentária.

LUKE et al.²⁹ em 1999, examinaram a liberação pela saliva de carboidratos como glicose, frutose, maltose e sorbitol após um bochecho e a liberação de açúcares relevantes após ingerir comidas que continham carboidratos. Cinco voluntários adultos participaram do estudo, no qual bochechavam soluções a 10% de sacarose, glicose, frutose, maltose e sorbitol por 1 minuto e ingeriam 10g de alimentos que continham carboidratos (pão, barra de chocolate e banana). Antes da ingestão de cada alimento a ser testado eram coletadas amostras de saliva de cada indivíduo. Após o bochecho e a mastigação das substâncias testes, coletas de saliva eram realizadas por 1 minuto nos tempos 1, 3, 5, 8, 15, 30 e 60 minutos

para análise. Dos bochechos de açúcar estudado, a sacarose era removida da saliva mais rapidamente enquanto níveis apreciáveis de sorbitol permaneciam até após 1 hora. A liberação de carboidratos nos alimentos com exceção da glicose onde os resultados eram variáveis, em quase todos os casos, havia quantidade facilmente detectável de resíduos de sacarose, frutose e maltose em todos os 3 alimentos na boca até 60 minutos após a ingestão. Barra de chocolate e banana produziram níveis iniciais altos de glicose no qual eram primeiramente liberados rapidamente depois disso mais lentamente, já no pão os níveis eram baixos e a liberação ocorria vagarosamente.

Em 2000, CURY et al.¹⁷ estudaram se a alta cariogenicidade da sacarose é exclusivamente atribuída a matriz da placa dentária rica em polissacarídeos insolúveis e a correlação da concentração inorgânica de cálcio, fósforo e flúor nas placas dentárias formada na presença de sacarose ou de seus componentes monossacarídeos com sua cariogenicidade. Um estudo cruzado de 28 dias em 3 fases foi realizado, onde 12 voluntários adultos utilizaram dispositivos palatinos que continham blocos de esmalte humano. Estes blocos eram obtidos de terceiros molares impactados armazenados em solução de formaldeído a 2% por até 1 mês. As 3 fases eram: exposição à solução de sacarose a 20% 8 vezes ao dia, exposição a solução com 10% de glicose e 10% de frutose 8 vezes ao dia e grupo controle. Os voluntários realizavam escovação dentária com creme dental

sem flúor e bebiam água fluoretada 90,60mg/l (fluoretos). A concentração de cálcio, fósforo e flúor foram significativamente maior no grupo controle do que nos outros dois, mas os valores foram numericamente menores na placa dentária formada na presença de sacarose. A concentração de polissacarídeo insolúvel foi significativamente maior na placa formada na presença de sacarose. A análise protéica demonstrou composição diferente entre as 3 placas. Os resultados sugerem que a alta cariogenicidade da placa formada na presença de sacarose seja principalmente explicada pela alta concentração de polissacarídeos extracelulares insolúveis, mas a baixa concentração inorgânica e a composição protéica também podem influenciar o processo.

Procurando esclarecer o efeito da espessura da placa dentária na atividade de produção ácida, através da quantidade e prevalência de ácidos aniônicos da placa dentária de crianças, BORGSTRÖM et al.⁵ em 2000, realizaram o estudo com 25 crianças. Os testes eram realizados em 2 ocasiões onde a placa era coletada e pesada, sendo que, na primeira ocasião a placa coletada era chamada de placa sem tratamento. Na segunda ocasião, com intervalo de 3 semanas, antes da coleta as crianças bochechavam por 1 minuto solução de sacarose a 40% e, passados 5 minutos era realizada a coleta. Após a coleta das amostras em ambas ocasiões, os dentes receberam profilaxia profissional. Após a pesagem da placa a presença de ácidos aniônicos das amostras acidificadas eram analisadas usando o método

isotacoforético. Os resultados mostraram que no peso das amostras das placas sem tratamento e da placa exposta a sacarose não houve diferença estatisticamente significativa. Acetato, lactato e propionato estavam consistentemente presente nas amostras, embora, os ânions dominantes nas amostras de placas sem tratamento foram acetato e propionato, enquanto nas amostras expostas a sacarose os ânions mais presentes foram lactato e acetato. A quantidade de ácidos aniônicos produzidos diminui com o aumento do peso da placa, e esta correlação mostrou-se negativa. Os autores concluíram que deve existir uma relação inversa entre a atividade de produção de ácido medida com a quantidade de ácidos ânions por mg de peso úmido de placa, e o total de volume de placa sobre os dentes. As observações indicam que o metabolismo celular glicolítico dos microorganismos na placa fina é diferente do que na placa dentária espessa. A atividade de produção ácida por microorganismos nesses dois ecossistemas poderia refletir as diferentes condições ambientais na placa dentária fina e espessa, como por exemplo, em termos de fatores tais como nutrientes disponíveis, pH e efeito tampão da saliva.

2.2 CHÁS

ELVIN-LEWIS et al.²⁰ em 1980 investigaram o efeito anticariogênico “in vitro” de diversos chás comerciais. Tal efeito foi observado através de

experimentos que avaliaram a síntese de polissacarídeos intracelulares, o crescimento de microorganismos, a aderência de microorganismos ao tubo e a formação de glucanos na presença de infusos de chá a 1%. Todos os infusos exerceram efeito inibitório, porém o fenômeno mais pronunciado foi com o chá preto, onde observaram uma inibição de 50%. Os autores sugeriram que os taninos, em maior quantidade no chá preto, teriam influenciado na formação de glucanos, por sua ação na glicosiltransferase, afetando, desse modo, o crescimento de microorganismos e o armazenamento de polissacarídeos intracelulares.

CURY¹⁵ em 1981 pesquisou sobre a concentração de fluoreto solúvel nos chás comercializados no Brasil. Testando 12 marcas de chás, a extração de fluoretos foi feita com água destilada fervente, e sua análise através de potenciometria. Os resultados mostraram que a concentração de fluoreto nos chás mates variou de 2,6 a 3,1 ppm, nos chás pretos variou de 104 a 152 ppm. Com isso concluíram que a concentração de fluoreto nos chás é baixa, não tendo qualquer significado como fonte para prevenção de cárie e a concentração de fluoretos de chás pretos nacionais é semelhante a dos importados, podendo ter significado na prevenção da cárie dentária.

KASHKET et al.²⁴ em 1985, realizaram um estudo com o objetivo de avaliar o efeito dos extratos de alimentos na biossíntese dos polissacarídeos extracelulares. Utilizaram cepas de estreptococos mutans 6715 nos testes com extratos de chás, café instantâneo, cacau, alguns sucos de frutas e

alguns alimentos. Os sucos de frutas continham altas concentrações de açúcar, entretanto cacau, chá, café, banana, amendoim e queijo continham poucos carboidratos detectáveis. Cacau, chá e café não continham cálcio e, dentro deste grupo, somente o cacau continha quantidade moderada de fósforo. Os chás continham 3-4 µg/mL de fluoretos, mais que qualquer dos outros extratos. Os extratos e bebidas que continham baixa concentração de carboidratos inibiram os polissacarídeos extracelulares insolúveis de 15 a quase 100% (chás 94%). A formação de polissacarídeos extracelulares solúveis eram similares, mas o grau de inibição era menor do que aqueles obtidos para a síntese de polissacarídeos insolúveis. O extrato de cacau, chá e café foram tratados com gelatina para remover os taninos e a resultante do líquido sobrenadante era analisada pela atividade inibitória. Cerca de 50% do total de polifenóis foram removidos das bebidas com gelatina precipitável de tanino. As atividades inibitórias (inibição da glicosiltransferase) dos chás foram reduzidas a 43 e 51% para o tratamento. Os achados sugerem que pode ser importante considerar o potencial dos alimentos em afetar formação de polissacarídeos quando testada sua cariogenicidade.

Em 1986 LEE et al.²⁶ realizaram um estudo para avaliar o efeito do mate e do chá comparado ao do flúor na prevenção da cárie dentária em ratos. Utilizando 60 ratos alimentados com ração cariogênica, estes foram divididos em 5 grupos, no qual recebiam para beber os seguintes líquidos: grupo I água destilada; grupo II água destilada com 5 ppm de flúor; grupo

III infuso de erva mate; grupo IV infuso de chá preto e grupo V infuso de chá verde. A análise prévia da concentração de flúor e pH de cada infuso era realizada imediatamente após o preparo, e depois de armazenado por 48 e 72 horas. No esmalte os infusos não reduziram a incidência de cáries, já para dentina houve redução da incidência de cárie na ordem de 22,16% para o chá preto, 51,74% para o mate e 61,82% para o chá verde, sendo estas duas últimas estatisticamente significante, já o flúor induziu uma redução de cárie de 47,64% o que também foi estatisticamente significante. Com isso os autores concluíram que a evolução do processo carioso foi atenuada com o mate e os outros chás, independentemente o conteúdo de flúor em suas composições.

No ano de 1993 OOSHIMA et al.³⁵ fizeram um estudo com o objetivo de examinar o efeito inibitório do extrato de chá preto na indução da cárie dentária em ratos livres de patógenos específicos e infectados com estreptococos mutans. Os resultados mostraram que a administração do extrato de chá preto composto de polifenol isolado dentro da dieta e da água de beber diminui significativamente o desenvolvimento da cárie e o acúmulo de placa em ratos infectados pelos estreptococos mutans. Com isso os autores concluíram que o extrato de chá preto que contém polifenóis inibe a síntese de glucanos insolúveis pela glicosiltransferase, aderência celular sacarose dependente dos estreptococos mutans e, subseqüentemente cárie

dentária em ratos infectados com estreptococos mutans. O extrato de chá preto poderia ser vantajoso para o controle da cárie dentária em humanos.

OOSHIMA et al.³⁶ em 1994 examinaram o efeito do bochecho com extrato de chá preto na deposição da placa dentária em humanos. Voluntários humanos (35) com idade entre 18 e 29 anos de idade foram orientados a não realizarem higiene bucal e não tomarem café ou chá nos períodos de teste (4 dias). No primeiro dia era coletado 1,5mL de saliva não estimulada de cada voluntário e examinado o número total de estreptococos mutans por milímetro de saliva. O índice de placa era calculado pelo método de Quigley e Hein com a placa evidenciada, sendo a média de 1,97 por pessoa. Era realizado então uma profilaxia profissional pelo dentista com escovação, fio dental e raspagem. Após o dente limpo este era seco e era aplicado topicamente 100mg/mL de solução de extrato de chá preto em etanol a 40%. Durante o período (4 dias) os participantes bochechavam 0,5mg/mL de solução de extrato de chá preto em etanol a 0,2%. Cada bochecho consistia de 5 consecutivos bochechos de 10 segundos com 20mL da solução de extrato de chá preto, num volume total de 100mL de extrato de chá preto por bochecho. Este procedimento era realizado 9 vezes ao dia (antes e após as refeições, entre as refeições e antes de dormir). No último dia do experimento 1,5mL de saliva não estimulada era coletado e o índice de placa era realizado como descrito anteriormente. Após 1 semana de intervalo os testes foram repetidos, mas diferindo na aplicação tópica inicial

que era feita somente com solução de etanol a 40% sem extrato de chá preto e os bochechos eram realizados somente com solução de etanol a 0,2%. Os resultados mostraram que bochechos com 0,5mg/mL de extrato de chá preto em etanol a 0,2% reduziram significativamente a deposição da placa dentária quando comparado com bochechos de etanol a 0,2%. O índice de placa foi menor quando era bochechada solução de extrato de chá preto em etanol a 0,2% (2,42) comparado com solução de etanol a 0,2% puro (3,06) e não houve mudança significativa no número total de estreptococos mutans na saliva entre os grupos. Os autores concluíram que o extrato de chá preto inibiu significativamente a deposição de placa dentária nos voluntários, entretanto bochechos com extrato de chá preto não tiveram significativo efeito no número de estreptococos mutans na saliva não estimulada.

Já em 1995, ATTIN et al.³ realizaram um estudo com o objetivo de avaliar a influência de um chá disponível comercialmente, contendo baixo nível de fluoretos, na formação inicial da placa dentária humana. Para isso utilizaram 30 sujeitos com idade entre 18 e 22 anos que não apresentavam história médica relevante. Os voluntários bochechavam o respectivo preparo (20mL) 3 vezes por dia, cada preparo por 1 minuto. Imediatamente antes de cada período, os participantes eram submetidos ao procedimento de profilaxia profissional. Os preparos utilizados eram chá (Darjeeling), Meridol[®] contendo 250ppm de flúor (controle positivo) e água da torneira com menos

de 0,2 ppm de flúor (controle). O Meridol® possui propriedades antiplaca. Durante o período de teste, os participantes abstiveram-se dos meios de higiene bucal e, eram instruídos a evitar ingestão de fluoretos, consumo de chá, fumar, bem como usar goma de mascar. O presente estudo demonstrou que um baixo nível de fluoretos no chá Darjeeling bochechado 3 vezes ao dia não inibiu área da superfície da placa nos dentes utilizados. Tem se notado que a área da superfície da placa é somente um aspecto da deposição inicial da placa, então concluíram que o chá de Darjeeling, aplicado como um bochecho não mostrou a mínima redução na área da superfície da placa nos participantes deste estudo.

Ainda em 1995, YU; OHO; XU⁶¹ avaliaram os efeitos dos componentes do chá verde na resistência ácida do esmalte dentário humano em um experimento *in vitro*, além disso, um estudo focado na ação do tanino, o principal componente do chá verde, em combinação com fluoretos. Utilizaram blocos de esmalte preparados de molares permanentes de humanos recém extraídos, que não apresentavam cárie na superfície vestibular. Após análises do chá verde mostraram que ácido tânico, catequina, cafeína e tocoferol são os principais componentes do chá, estes eram usados no presente estudo com ou sem fluoretos. Os resultados mostraram que os componentes do chá verde, tanino, catequina, cafeína e tocoferol, demonstraram ser efetivos aumentando a resistência ácida e, seus efeitos aumentaram drasticamente quando eles eram usados em combinação

com fluoretos. Uma solução misturada de ácido tânico e fluoretos mostraram um efeito altamente inibitório (98%) na liberação de cálcio para uma solução ácida. O tanino em combinação com fluoretos mostrou inibição óbvia da formação de lesão de cárie artificial em esmalte em comparação com fluoretos. Os autores concluíram que estes resultados demonstraram que em comparação aos fluoretos, os componentes orgânicos contidos no chá também são efetivos na proteção de esmalte dentário de ataques ácidos, e sugerem que tanino/fluoreto pode ser um agente proveitoso para aplicação na Odontologia preventiva.

Já em 1996, GEBARA; ZARDETTO; MAYER²³ verificaram o efeito antimicrobiano de tinturas de alguns produtos naturais, entre elas a camomila, sobre *S. mutans* e *S. sobrinus* e determinaram o efeito de doses subinibitórias na aderência das bactérias à superfície do vidro. Os resultados mostraram que a tintura de camomila não exerceu atividade antimicrobiana sobre o *S. mutans* e *S. sobrinus*, por isso não deveria ser utilizada como controle desses microorganismos presentes na placa dentária.

CHAN; KOH¹², em 1996 realizaram um estudo com o objetivo de determinar se existia diferença significativa na concentração de fluoretos na infusão de chás cafeínados, descafeínados e chá de ervas disponíveis comercialmente. Para isso analisaram 44 tipos de diferentes marcas de chás, nas quais a leitura da concentração de flúor era feita através da metodologia do eletrodo de íon específico na presença de TISAB, essas leituras eram

realizadas nos tempos de 5, 15, 30, 60 e 120 minutos após o preparo dos chás. A média das concentrações de fluoretos nas infusões de chás após 5 minutos era de 1,50 ppm para os chás cafeínados de 3,19 para o chá descafeinado e de 0,05 ppm para os chás de ervas. A diferença do conteúdo de fluoretos nas infusões nos diferentes tipos de chás foi significativa em todos os tempos testados. Com isso os autores concluem que o uso de água mineral contendo altos níveis de fluoretos naturalmente durante o processo de descafeinação é a mais provável explicação para as altas concentrações de fluoretos encontrados para os chás descafeínados testados neste estudo.

No mesmo ano MEYEROWITZ; SYRRAKOU; RAUBERTAS³⁴ compararam o efeito do pH da placa *in vivo* da sucralose no chá gelado (puro ou incorporado com maltodextrina ou com maltodextrina/dextrose) com sacarose no chá gelado, usando a metodologia do toque de eletrodo. Para isso 14 voluntários, maiores de 18 anos participaram do experimento, sendo que a cada semana um tipo de bebida era testado. Os testes eram realizados sempre no mesmo dia da semana e sempre no mesmo horário. Os voluntários eram orientados a suspender a higiene bucal por 48 horas antes dos testes e não comiam, bebiam e fumavam por no mínimo 4 horas antes do início dos testes. A medida do pH da placa inicial era feita *in vivo* usando um eletrodo miniatura de pH, que era tocado nos sítios determinados para a leitura. Sempre antes e após cada leitura de pH os eletrodos eram calibrados para padronizá-los utilizando um pH tampão nos valores de 4,0 e 7,0. Após a

leitura inicial da placa dentária o voluntário bochechava 15mL da bebida teste por 1 minuto e a expelia. O pH da placa era novamente medido nos mesmos sítios aos 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos após o bochecho. Ao final de cada sessão de testes os voluntários realizavam uma escovação com dentifrício fluoretado. Os resultados das comparações entre os grupos testados mostraram que para a média do pH mínimo o grupo do chá não adoçado foi de 6,79 e para o chá com sucralose foi de 6,73 estes valores eram mais altos do que os valores de pH mínimo dos grupos de chás com sucralose/maltodextrina (pH= 6,20) e chá com sucralose/maltodextrina/dextrose (pH= 6,02), que por sua vez eram maiores do que o grupo de chá com sacarose (pH= 5,6). Todas estas diferenças eram significantes para $p \leq 0,01$. Os autores concluíram que a sucralose sozinha ou associada com maltodextrina ou com maltodextrina/dextrose é significativamente menos acidogênica do que sacarose quando usada como um adoçante em chás gelados.

Ainda em 1996, CÉSAR et al.¹¹ realizaram um estudo com o objetivo de conhecer a opinião dos médicos, residentes de uma cidade de porte médio no Sul do Brasil, quanto ao padrão de uso de chás, situação que recomendam e conhecimento quanto à sua relação com algumas doenças infecciosas para crianças menores de seis meses de idade. Para isso realizaram questionários com médicos do serviço público e privado de saúde da cidade de Pelotas/RS. Foram entrevistados 150 médicos dos quais 44%

recomendavam o uso de chás para crianças menores de seis meses. Os principais motivos para sua indicação foram para tratamento de cólicas intestinais (35%), suplementação à dieta (21%) e reidratação oral (18%). Ao serem questionados sobre o uso de chás e a ocorrência de algumas doenças ou problemas associados, observou-se que 84% estabeleceram relação com o desmame, 47% com desnutrição e somente 19% com diarreia. Com isso os autores concluem que estes resultados revelam que boa parte dos médicos entrevistados não vem manejando de forma adequada aspectos comuns relacionados à dieta infantil, o que é preocupante em virtude da sua repercussão negativa sobre a saúde dessas crianças.

DUGGAL et al.¹⁹ em 1996 analisaram *in vitro* a acidez intrínseca (pH) de seis tipos de bebidas infantis a base de ervas comumente utilizadas (grupos testes), solução de sacarose a 10% (controle positivo) e leite integral (controle negativo) e, também avaliaram *in vivo* seu potencial acidogênico medindo sua capacidade de baixar o pH da placa em humanos. Voluntários (10 no total) adultos com idade entre 16 e 35 anos, foram orientados a suspender a higiene bucal por 48 horas antes dos testes e não comer e beber por no mínimo 8 horas antes dos testes. Amostras de placa foram coletadas da superfície vestibular dos dentes posteriores para a leitura do pH, após esta coleta cada voluntário bochechava 15mL de uma das substâncias testadas por 1 minuto. Novamente era coletada a placa dentária de algumas áreas dos dentes a 5, 10, 15, 20 e 30 minutos após o bochecho

e o pH era medido em cada um dos intervalos de tempo. Os testes eram realizados em dias separados com uma semana de intervalo e sempre no mesmo dia e hora com cada tipo de substância. Os resultados mostraram *in vitro* que três das 6 bebidas testadas tinha um pH baixo no entanto a maioria tinha uma baixa acidez titulável. Todas as bebidas, exceto chá de ervas, bochechadas levaram a uma significativa queda no pH da placa perto do valor de pH crítico de 5,5. A maioria das bebidas eram também mais acidogênicas do que o leite e algumas agiam essencialmente similares a solução de sacarose a 10%. Os autores concluíram que a maioria das bebidas de ervas testadas, especialmente aquelas com adição de frutas, podem levar a uma significativa produção ácida na placa e por isso tem um potencial de causar desmineralização no esmalte.

Continuando em 1996, SHEIK; ERICKSON⁴³ pesquisaram as alterações de pH na placa após o consumo de 8 bebidas infantis, de dois fabricantes, contendo ferro, pouco ferro, soja ou proteínas hidrolizadas. A média de pH mínimo não diferiu dentro de cada composição de bebida entre os fabricantes, exceto para as bebidas com soja. Assim, as bebidas infantis são acidogênicas e podem ter um significativo papel no desenvolvimento de cárie precoce na infância.

ZANGH; KASHKET⁶⁴, em 1998 estudaram a inibição da amilase salivar pelos chás preto e verde e seus efeitos intrabuciais na hidrólise dos amidos. Para isso voluntários consumiam bolachas salgadas e subseqüentemente

bochechavam por 30 segundos os chás verde e preto. Após isso a bolacha retida na superfície dos dentes era coletada para análise. A maltose liberada foi reduzida em 70% após o bochecho com os chás. As observações suportam a hipótese de que o consumo de chá pode ser efetivo na redução do potencial cariogênico de comidas que contém amido e o chá pode reduzir a tendência destas comidas de servir como fonte de liberação lenta de carboidratos fermentáveis.

Em 1998, OOSHIMA et al.³⁷ pesquisaram a respeito do potencial cariostático dos polifenóis do chá preto administrado conforme alguns experimentos (chá na água de beber ou folhas do chá na dieta) da cárie dentária em ratos infectados com *S. sobrinus* 6715. Os resultados indicaram que atividade cariostática do chá preto foi efetiva mesmo após o estabelecimento do *S. sobrinus* na cavidade bucal e era mais efetivo na água de beber do que na dieta, além disso, o chá preto pode conter algumas substâncias anticárie que afetam a virulência do *S. sobrinus* diferente do que a glicosiltransferase.

Já em 1999, MATSUMOTO et al.³² examinaram *in vitro* o efeito inibitório do extrato de chá preto na propriedade de indução de cárie dos estreptococos mutans. Os resultados sugerem que polifenóis do chá preto podem inibir a aderência bacteriana na superfície dentária por reduzir a superfície das células hidrofóbicas dos estreptococos mutans, e o chá preto

pode inibir a indução da atividade de cárie dos estreptococos mutans reduzindo a taxa de produção de ácido.

Em 2001, TOUYZ; AMSEL⁵² avaliaram se o consumo de chá preto (*Camellia sinensis*) influenciava na cariogenicidade em ratos jovens. Para isso os autores dividiram os ratos em três grupos dos quais, além da dieta cariogênica, o primeiro grupo recebia água deionizada, destilada e livre de flúor (controle negativo), o segundo grupo recebia chá preto (preparado diariamente) e o terceiro grupo (controle positivo) recebia água fluoretada (25 ppm). As lesões cariosas eram manchadas com nitrato de prata e os dentes (primeiro e segundo molares) cortados mesiodistalmente para análise. Os resultados mostraram que ratos propensos a cárie que consumiam água sem flúor tinham significativamente mais lesões de cárie (6,75) do que os do grupo do chá preto (3,12) e os do grupo da água fluoretada (0,85). Com isso os autores concluíram que o consumo de chá preto por 2 semanas atenuou o desenvolvimento e progressão da cárie em ratos jovens propensos a cárie e outros achados sugerem que *Camellia sinensis* contém fatores cariostáticos que tem significantes efeitos preventivos na cariogenicidade.

SIMPSON; SHAW; SMITH⁴⁵ estudaram em 2001, a composição ácida do chá preto e avaliaram a influência de seu consumo no pH da superfície dentária em humanos, para estabelecer uma base de recomendação dietética para os pacientes. O pH da solução de chá e a composição de ânion

foram analisados para estabelecer informação no seu conteúdo ácido. Um grupo de 10 indivíduos saudáveis, idade 21-23 anos foram monitorados quanto ao pH da superfície dentária nos dentes anteriores e nos molares superiores após beberem chá, usando um microeletrodo-pH montado em uma tala de vinil. O pH da solução do chá era 4,9 e os maiores ânions detectados eram oxalato e citrato. O pH das superfícies dentárias monitoradas indicou que somente pequena diminuição no pH era detectada para ambos os sítios palatinos dos incisivos e molares após beber chá e a média mínima de pH alcançada era 5,45. A diminuição máxima no pH foi observada após 20-25 segundos e os níveis de pH restantes eram restaurados dentro de aproximadamente 2 minutos após beber o chá. Com isso os autores concluíram que o perfil do pH e o ânion do chá preto são indicativos de baixa composição ácida. A menor diminuição de pH observada na superfície dentária após beber o chá indicou que pode ser seguramente recomendado como um substituto para bebidas ácidas como parte de medidas preventivas para erosão dentária.

No mesmo ano, esses mesmos autores investigaram a retenção bucal de fluoretos após bochecho com chá preto e a associação da ingestão de fluoretos do chá com a superfície do esmalte dentário e sua película salivar adquirida usando proximidade *in vitro* e *in vivo*⁴⁴. A retenção bucal de fluoretos após os bochechos era avaliada *in vivo* de amostras expectoradas, com a metodologia do eletrodo de íon específico na presença de TISAB. A

interação de fluoretos com as superfícies dentárias e película adquirida era examinada *in situ* com blocos de esmalte montados em dispositivo removível. Já modelos *in vitro* foram usados para examinar fluoretos ligados a partículas de esmalte. Os resultados mostraram que 34% de fluoreto era retido na cavidade bucal após bochecho com chá, a diferença da retenção na superfície dentária na presença e ausência de película adquirida não foi estatisticamente significativa em sítios dos incisivos e molares. Os fluoretos do chá preto mostraram-se fortemente ligados a partículas de esmalte, na qual eram somente parcialmente dissociadas por soluções de resistências iônicas maiores do que aquelas da saliva. Com isso os autores concluíram que neste estudo o chá preto na dieta pode fornecer um efetivo veículo para distribuição de fluoretos para cavidade bucal onde pode interagir com os tecidos bucais e suas superfícies de revestimento.

Ainda em 2001, BRUNTON; HUSSAIN⁸ realizaram uma pesquisa com intuito de determinar se o chá preto convencional e um chá de ervas eram capazes de desgastar (erosão) o esmalte dentário e, além disso, investigar se o tipo de chá de ervas testado desgastava (erosão) tecido duro em maior ou menor extensão do que o chá preto convencional. Para isso os autores estabeleceram 3 grupos sendo que o grupo A seria o grupo do chá preto convencional, o grupo B o do chá de ervas e o grupo C o grupo da água usado como controle. Fizeram parte das amostras 32 dentes extraídos por razões ortodônticas, livres de defeitos ou áreas hipoplásicas. Os dentes

foram seccionados produzindo 64 espécimes dos quais 63 foram padronizados e distribuídos nos três grupos; cada grupo contendo 21 partes seccionadas. As 21 partes foram expostas dentro de cada grupo, sendo que as amostras eram incubadas por 14 dias a 37°C. As soluções eram reabastecidas a cada 48 horas e após 7 dias de exposição, todas as amostras de dentes seccionados eram limpos com uma escova de dentes macia usando pasta de dente não abrasiva, para remover alguns debris na superfície. Os traçados seqüenciais no perfilômetro dos espécimes eram feitas e o grau de perda de esmalte calculado como a área de disparidade entre os traçados antes e após a exposição. Os resultados mostraram que o chá preto convencional e o chá de ervas resultaram em danos a superfície dentária. Os danos na superfície dentária, resultante do chá de ervas (média 0,05mm², dp 0,02), foi significativamente maior (P = 0,00) do que aqueles resultantes da exposição ao chá preto convencional (média 0,01mm², dp 0,00) e água (média 0,00mm², dp 0,00). Os autores concluíram que o chá de ervas e o chá preto convencional dos tipos testados resultaram em erosão do esmalte dentário. O efeito erosivo do chá de ervas era 5 vezes mais severo do que o chá preto convencional e ainda o efeito acumulativo do consumo regular do chá de ervas é provavelmente, então, de significado clínico.

Continuando em 2001, WU⁶⁰ relatou que o chá preto e seus componentes beneficiam a saúde bucal por interferirem nas bactérias que causam cárie dentária e doença periodontal. Por isso apresentou um trabalho

no Encontro da Sociedade Americana de Microbiologia Geral, mostrando que componentes do chá preto foram capazes de matar ou suprimir o crescimento e produção de ácidos por bactérias que causam cárie na placa dentária. O chá preto também produziu efeito na enzima bacteriana glicosiltransferase, a qual é responsável por converter açúcar em material que a placa usa para se aderir aos dentes, com isso, certas bactéria da placa, sob exposição do chá preto, perdem sua habilidade de formar grumos agregados com outras bactérias na placa, assim reduzindo a massa total de placa dentária.

LÍRIO et al.²⁸ em 2001, avaliaram a qualidade higiênica de chás comercializados no município de São Paulo, através da pesquisa de sujidades e a comparação dos resultados conforme seu enquadramento nos parâmetros legais do Ministério da Saúde. 67 amostras de sacos pré-processados envolvendo 7 marcas de quatro tipos diferentes, sendo 19 erva cidreira, 16 hortelã, 18 erva doce e 14 camomila. Das 67 amostras analisadas 44,8% apresentaram resultados em desacordo com os parâmetros legais. A presença de sujidades em número maior que o limite tolerado na legislação pode refletir condições higiênicas insatisfatórias nas etapas da produção do chá. Trabalhos avaliando maior número de amostras por marca poderão demonstrar se cuidados diferenciados diminuiram a presença de matérias estranhas neste tipo de produto.

Em 2002, MEDEIROS; SANTIAGO; SOUZA³³ realizaram um estudo analisando o conteúdo de fluoreto em diversas bebidas, entre elas alguns chás. Os chás que não eram prontos foram preparados utilizando um saquinho para 130 mL de água deionizada. A água previamente fervida era colocada em um recipiente de louça no qual foi adicionado o chá e mantido em infusão por 30 minutos. Dentre os chás testados uma marca de chá preto apresentou teor de flúor de 0,04 ppm, os demais tipos de chás (chá de maçã, pêssego e chá mate) apresentaram uma quantidade menor e de certa forma variável entre 0,02 e 0,2 ppm. Com isso os autores concluíram que todos os chás testados apresentaram um baixo teor de fluoretos e não podem ser consideradas fontes potenciais de fluoretos, e também, não se constituem fatores de risco para o desenvolvimento de fluorose.

3. Proposição

Proposição

É objetivo deste trabalho avaliar *in vitro* o efeito exercido pelos chás de camomila, erva doce e cidreira em relação ao metabolismo da placa dentária humana quanto à:

- fermentação, e
- síntese de polissacarídeos extracelulares.

4. Material e Métodos

Material e Métodos

4.1 MATERIAL

Os materiais usados nos diferentes procedimentos realizados nesta pesquisa estão discriminados abaixo:

4.1.1 Materiais utilizados na coleta da placa dentária

- ❖ Cureta de dentina número 14 e 18 (Duflex – S. S. White, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro);
- ❖ Espátula de madeira (Indústria e Comércio de palitos Estilo LTDA., Campinas, São Paulo);
- ❖ Gaze (Cremer S. A., Blumenau, Santa Catarina);
- ❖ Frasco plástico com tampa (Injeplast, São Paulo, São Paulo);
- ❖ Caixa térmica (Isopor, São Bernardo do Campo, São Paulo);
- ❖ Luvas descartáveis (Embramac, Campinas, São Paulo).

4.1.2 Materiais utilizados para o tratamento da placa dentária

- ❖ Becker (Vidrolabor – Thermex, Brasil);
- ❖ Bastão de vidro (Precicolor HBG, Alemanha);
- ❖ Balão volumétrico (Pyrex, Estados Unidos);

- ❖ Pipeta (Precicolor HBG, Alemanha);
- ❖ Agitador e Barra magnética (Nova Técnica, Piracicaba, São Paulo);
- ❖ pHmetro (Micronal – B371, São Paulo, São Paulo);
- ❖ Tubos para centrífuga (Du Pont Company, Wilmington/ Estados Unidos);
- ❖ Centrífuga (Jovan S. A. – centrifuge A 14, St. Herbain/França);
- ❖ Balança de equilíbrio (Record, Campinas, São Paulo);
- ❖ Balança de precisão (A & D Company Limited GR – 202, Japão);
- ❖ Câmara fria (Refriclínica, Bauru, São Paulo);
- ❖ Freezer (Refriclínica, Bauru, São Paulo);
- ❖ Papel Absorvente (Softy's, Melhoramentos Papéis LTDA., Caieiras, São Paulo);
- ❖ Caixa térmica (Isopor, São Bernardo do Campo, São Paulo).

4.1.3 Reagentes utilizados para o tratamento da placa dentária

- ❖ Fosfato de Sódio (monobásico) (E. Merck S. A. lote 1063466001, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro);

- ❖ Fosfato de Sódio (bibásico) (E. Merck S. A. lote 503005, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro);
- ❖ Água deionizada (Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Odontologia de Bauru, Bauru, São Paulo);

4.1.4 Materiais utilizados para o estudo da fermentação da placa dentária

- ❖ Becker (Vidrolabor – Thermex, Brasil);
- ❖ Bastão de vidro (Precicolor HBG, Alemanha);
- ❖ Balão volumétrico (Pyrex, Estados Unidos);
- ❖ Pipeta (Precicolor HBG, Alemanha);
- ❖ Potter Elvehjem (Marconi, Piracicaba, São Paulo);
- ❖ Erlemeyer (Pyrex, Estados Unidos);
- ❖ Etiquetas (Pimaco Autoadesivos LTDA., Rio de Janeiro, Rio de Janeiro);
- ❖ Estufa (Fanen – Orion, São Paulo, São Paulo);
- ❖ Agitador e Barra magnética (Nova Técnica, Piracicaba, São Paulo);
- ❖ Bureta (Pyrex, Estados Unidos);
- ❖ Suporte para bureta (Fischer – Castaloy, Estados Unidos);
- ❖ Micropipeta automática (Gilson, França);

- ❖ Balança de precisão (A & D Company Limited GR – 202, Japão);
- ❖ Câmara fria (Refriclinica, Bauru, São Paulo);
- ❖ Freezer (Refriclinica, Bauru, São Paulo);
- ❖ Papel Absorvente (Softy's, Melhoramentos Papéis LTDA., Caieiras, São Paulo);
- ❖ Caixa térmica (Isopor, São Bernardo do Campo, São Paulo).

4.1.5 Reagentes utilizados para o estudo da fermentação da placa dentária

- ❖ Fosfato de Sódio (monobásico) (E. Merck S. A. lote 1063466001, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro);
- ❖ Fosfato de Sódio (bibásico) (E. Merck S. A. lote 503005, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro);
- ❖ Água deionizada (Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Odontologia de Bauru, Bauru, São Paulo);
- ❖ Glicose anidra (E. Merck S. A., lote 1665937, Darmstadt, Alemanha);
- ❖ Hidróxido de sódio (E. Merck S. A., lote 298498839, Darmstadt, Alemanha);
- ❖ Vermelho de cresol (Riedel, lote 32653, Alemanha);

- ❖ Álcool etílico (Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Odontologia de Bauru, Bauru, São Paulo).

4.1.6 Materiais utilizados para o estudo da síntese de polissacarídeos extracelulares e dosagem de carboidratos totais

- ❖ Becker (Vidrolabor – Thermex, Brasil);
- ❖ Bastão de vidro (Precicolor HBG, Alemanha);
- ❖ Balão volumétrico (Pyrex, Estados Unidos);
- ❖ Pipeta (Precicolor HBG, Alemanha);
- ❖ Potter Elvejhen (Marconi, Piracicaba, São Paulo);
- ❖ Tubos ependorff 1,5 mL (Master diagnóstica, São Paulo, São Paulo);
- ❖ Suporte de tubos ependorff (Móveis Cristofolli, Lages, Santa Catarina);
- ❖ Tubos de ensaio 25mL (Pyrex, Estados Unidos);
- ❖ Etiquetas (Pimaco Autoadesivos LTDA., Rio de Janeiro, Rio de Janeiro);
- ❖ pHmetro (Micronal – B371, São Paulo, São Paulo);
- ❖ Estufa (Fanen – Orion, São Paulo, São Paulo);
- ❖ Agitador e Barra magnética (Nova Técnica, Piracicaba, São Paulo);

- ❖ Centrífuga (Jovan S. A. – centrifuge A 14, St. Herbain/França);
- ❖ Balança de precisão (A & D Company Limited GR – 202, Japão);
- ❖ Espectrofotômetro (Pharmacia Biotech – Ultrospec 2000, Cambridge, Inglaterra);
- ❖ Câmara fria (Refriclínica, Bauru, São Paulo);
- ❖ Freezer (Refriclínica, Bauru, São Paulo);
- ❖ Luvas descartáveis (Embramac, Campinas, São Paulo);
- ❖ Caixa térmica (Isopor, São Bernardo do Campo, São Paulo).

4.1.7 Reagentes utilizados para o estudo da síntese de polissacarídeos extracelulares e dosagem de carboidratos totais

- ❖ Fosfato de Sódio (monobásico) (E. Merck S. A. lote 1063466001, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro);
- ❖ Fosfato de Sódio (bibásico) (E. Merck S. A. lote 503005, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro);
- ❖ Água deionizada (Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Odontologia de Bauru, Bauru, São Paulo);
- ❖ Glicose anidra (E. Merck S. A., lote 1665937, Darmstadt, Alemanha);

- ❖ Sacarose (Sigmer, lote 9040679, St. Louis, Estados Unidos);
- ❖ Hidróxido de Potássio (Montfdison – Farmacêutica, lote 7080069, São Paulo, São Paulo);
- ❖ Fenol (E. Merck S. A., lote 3687560, Darmstadt, Alemanha);
- ❖ Ácido sulfúrico (E. Merck S. A., lote 70122309, Darmstadt, Alemanha).

4.1.8 Tipos de chás utilizados

Nesta pesquisa foram utilizados chás da linha Dr. Oetker[®], da empresa Oetker Produtos Alimentícios LTDA. (Quadro 1).

Chá	Validade	Lote	Origem
Camomila	21/12/2003	L180 T03	São Paulo/SP
Erva doce	19/12/2003	L178 T03	São Paulo/SP
Cidreira	12/09/2003	L080 T02	São Paulo/SP

4.2 MÉTODOS

Todos os procedimentos realizados nesta pesquisa estão descritos nos itens abaixo, seguindo sua ordem de execução.

4.2.1 Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

O projeto de pesquisa intitulado "Avaliação do efeito dos chás de camomila, cidreira e erva doce sobre a fermentação e síntese de polissacarídeos da placa dentária – estudo *in vitro*", foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, da Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo em 15 de outubro de 2002 (Anexo1).

4.2.2 Seleção da amostra e coleta da placa dentária

O presente estudo foi realizado em 2 etapas: primeiro foi realizada a coleta da placa dentária, em 50 crianças e adolescentes entre 10 e 15 anos, com idade média de 13,1 anos, do sexo masculino, procedentes da instituição denominada Consórcio Intermunicipal da Promoção Social (CIPS), situada na cidade de Bauru/SP. A segunda etapa foi realizada no laboratório de Bioquímica da Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo onde a placa foi processada.

Os procedimentos clínicos iniciais, só foram realizados após os pais e/ou responsáveis pelas crianças serem esclarecidos sobre o objetivo da pesquisa, através de uma carta de informação ao paciente, explicada detalhadamente pelo pesquisador (Anexo 2) e após obtenção do consentimento livre e esclarecido assinado pelo responsável (Anexo 3).

Os participantes foram orientados a suspender a higienização bucal por 24 horas, e não ingerir bebidas ou alimentos por pelo menos 30 minutos antes da coleta da placa dentária, a qual foi realizada sempre no mesmo dia da semana, pela manhã. Previamente à coleta era realizado um bochecho com água destilada afim de remover os resíduos grosseiros da alimentação.

A coleta da placa dentária foi realizada pelo próprio pesquisador no consultório odontológico da própria instituição (CIPS), com curetas de dentina números 14 e 18, previamente esterilizadas, removendo a placa dentária supragengival de todas as superfícies dentárias. Após a coleta, cada criança realizava uma escovação supervisionada seguindo o protocolo de atenção odontológica normalmente oferecido pela instituição e, ao final da pesquisa os participantes receberam uma aplicação tópica de flúor gel e palestras sobre higienização bucal.

A placa dentária coletada foi armazenada em tubos plásticos esterilizados, que depois de serem fechados eram imersos em gelo picado dentro de uma caixa térmica durante o tempo de transporte para o laboratório de Bioquímica da Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo sendo então armazenados em freezer a -20°C .

Concluída a primeira parte, o total de placa dentária coletada resultou em um “pool” de placa que foi tratado em laboratório com os diferentes substratos – chá de camomila (Ccam), chá de erva doce (Ced) e chá de cidreira (Ccid).

4.2.3 Tratamento da placa dentária

Para a realização do tratamento do "pool" de placa dentária, foi necessário o preparo de reagentes como o tampão fosfato de sódio 0,01 M pH 6,8. Esse reagente foi obtido a partir de fosfato de sódio monobásico (PM 137,99) e de fosfato de sódio bibásico (PM 141,96).

Para preparar o fosfato de sódio monobásico 0,2 M, esse era pesado em balança de precisão e diluído em água deionizada com auxílio de uma pisseta, um Becker, bastão de vidro e um balão volumétrico. Depois de feita a diluição o reagente foi rotulado e armazenado em vidro âmbar sob refrigeração. Já para o preparo do fosfato de sódio bibásico 0,2 M foram utilizados os mesmos utensílios e métodos.

Depois do preparo dos reagentes iniciais, foi preparado o tampão fosfato de sódio 0,2 M pH 6,8. Em um agitador magnético em baixa velocidade foi montado um Becker com uma barra magnética e o eletrodo do pHmetro foi calibrado para pH 7,0. Foram misturados o fosfato monobásico com o fosfato bibásico, até atingir o pH 6,8. Esse reagente foi então rotulado e armazenado em vidro âmbar servindo de substrato para posterior preparo do tampão fosfato de sódio 0,01 M pH 6,8 durante o experimento. A escolha por esta formulação para estocagem deve-se ao fato de que na concentração de 0,2 M o reagente é mais estável do que a 0,01 M e não sofre alterações quando armazenado.

Durante o experimento era realizada a diluição (proporção de 1:20) do tampão fosfato de sódio 0,2 M para 0,01 M pH 6,8, para isso utilizou-se balão volumétrico de 200mL, inseria-se 10mL de fosfato de sódio 0,2 M e completava-se o volume com água deionizada.

Então o “pool” de placa dentária coletada foi descongelado a temperatura ambiente e, com um bastão de vidro foi retirado do tubo plástico onde estava armazenado e colocado em um Becker adicionando a ele o tampão fosfato de sódio a 0,01 M pH 6,8.

A suspensão de placa em tampão fosfato de sódio a 0,01 M pH 6,8 foi colocada em tubos de centrífuga que foram montados em um suporte onde, com auxílio de uma balança de equilíbrio, eram igualados e colocados na centrífuga, aos pares, para não acarretar problemas no momento da centrifugação.

A placa dentária em suspensão foi centrifugada a 3000 rpm durante 10 minutos, após isto o sobrenadante foi desprezado e os tubos então colocados de cabeça para baixo em papel absorvente para secagem, e posteriormente esses foram novamente congelados à -20°C .

4.2.4 Fermentação da placa

Para o estudo da fermentação foi necessário o preparo de alguns reagentes, que serão especificados a seguir:

4.2.4.1 Tampão fosfato de sódio 0,01 M pH 6,8

Para o preparo deste reagente foi diluído (proporção 1:20) o fosfato de sódio 0,2 M pH 6,8, que foi previamente armazenado, para isso foi utilizado balão volumétrico de 200mL no qual era inserido 10mL de fosfato de sódio 0,2 M pH 6,8 sendo então completado com água deionizada.

4.2.4.2 Glicose 2,5%

Para o preparo de 20mL de glicose a 2,5%, que equivale a 2,5g de glicose em 100mL de água destilada, foi pesado 0,5mg de glicose anidra, diluída em água deionizada em um Becker de vidro com auxílio de um bastão de vidro, balão volumétrico e uma pisseta.

4.2.4.3 Suspensão da placa

A concentração da suspensão de placa utilizada foi de 1%, o que equivale a 10mg/mL. A placa era descongelada a temperatura ambiente e a seguir pesada e diluída na proporção de 10mg de placa úmida para 1mL de tampão fosfato de sódio 0,01 M pH 6,8. Essa suspensão era então homogeneizada por 1 minuto em homogeneizador do tipo Potter Elvehjem.

4.2.4.4 Preparo dos chás utilizados

Para esta pesquisa foram utilizados três tipos de chás (chá de camomila, chá de erva doce e chá de cidreira) industrializados e da marca Dr. Oetker[®]. Sua preparação dava-se da seguinte maneira: em um Becker de

vidro era adicionado 200mL de água deionizada fervida, na qual os tipos de chás utilizados foram preparados. Esta medida é a que o fabricante recomenda quando se utiliza um saquinho de chá para infusão e, o tempo recomendado é de 3 minutos de infusão, até que o chá adquira cor e sabor. Após o preparo do chá, o mesmo era resfriado naturalmente até temperatura ambiente e então estava pronto para ser utilizado na pesquisa.

4.2.4.5 Hidróxido de Sódio 0,05 M

Para o preparo do hidróxido de sódio 0,05 M foi utilizado o próprio reagente que era pesado e então diluído em água deionizada, com auxílio de um Becker, um bastão de vidro, balão volumétrico e uma pisseta de água deionizada.

4.2.4.6 Vermelho de cresol

Utilizando um Becker, bastão de vidro e balão volumétrico o vermelho de cresol a 0,1% foi preparado, pesando-se 10mg do reagente e diluindo-o em 10mL de álcool etílico.

4.2.5 Esquema do experimento

Para o estudo da fermentação foi montada uma seqüência de frascos de erlemeyer de 50mL etiquetados para cada tipo de grupo testado, sendo eles endógeno, controle (glicose), teste (chá acrescido de glicose) e teste_(A) (chá), todos realizados em quintuplicata, como explicados a seguir:

ENDÓGENO (E)

CONTROLE (Glicose/Gc)

TESTE (chá + glicose)

TESTE_a (chá)

E_{a-e} = **Grupo endógeno**

- 1,0 mL de tampão fosfato 0,01M pH 6,8
- 2,5 mL de água deionizada

- 0,5 mL de glicose 2,5%
- 1,0 mL de suspensão de placa

G_{Ca-e} = **Grupo controle (glicose)**

- 1,0 mL de tampão fosfato 0,01M pH 6,8
- 2,5 mL de água deionizada
- 0,5 mL de glicose 2,5%
- 1,0 mL de suspensão de placa

$T_1 - T_5$ = **Grupo Teste (chá acrescido de glicose)**

- 1,0 mL de tampão fosfato 0,01M pH 6,8
- 2,5 mL de chá
- 0,5 mL de glicose 2,5%
- 1,0 mL de suspensão de placa

$T_{1a} - T_{5a}$ = **Grupo Teste_(A) (chá)**

- 1,0 mL de tampão fosfato 0,01M pH 6,8
- 3,0 mL de chá
- 1,0 mL de suspensão de placa

Para o esquema de trabalho foi estabelecida a seguinte ordem de procedimentos:

1º - Pipetar 1,0 mL de Tampão Fosfato de Sódio 0,01 M pH 6,8 em todos os frascos;

2º - Pipetar 2,5 mL de água deionizada nos frascos dos grupos endógeno (E_{a-e}) e grupo controle (G_{a-e})

3º - Pipetar 0,5 mL de glicose 2,5% nos frascos dos grupos endógeno (E_{a-e}), controle (G_{a-e}) e teste ($T_1 - T_5$);

4º - Pipetar 2,5 mL de chá somente nos frascos do grupo teste ($T_1 - T_5$);

5º - Pipetar 3,0 mL de chá somente nos frascos do grupo teste_(A) ($T_{1a} - T_{5a}$);

6º - Pipetar 1,0 mL de suspensão de placa 1% em todos os frascos menos no grupo endógeno, com intervalo de 02 minutos entre cada frasco.

Os frascos do grupo endógeno foram preparados separadamente pois os mesmos eram titulados imediatamente após a adição da suspensão da placa dentária. Os demais frascos (grupo controle e grupo testes) eram encubados em estufa a 37°C por 120 minutos, e somente após esta incubação passavam pelo processo de titulação.

4.2.6 Titulação dos ácidos de fermentação da placa dentária

Os materiais utilizados para a realização da titulação foram um suporte de bureta, uma bureta, agitador automático e uma barra magnética.

Antes de se fazer a titulação, todos os grupos sem exceção recebiam o indicador vermelho de cresol 0,1%, pipetando-se 10µL do reagente, com uma micropipeta automática e, agitando bem para misturar com o tratado.

O grupo endógeno sofreu a titulação imediatamente após o seu preparo e os demais grupos somente foram titulados após o período de 120 minutos de incubação (37°C) seguindo sempre a mesma ordem de preparo e com o mesmo intervalo de tempo (2 minutos). O hidróxido de sódio 0,05 M era então gotejado no interior dos frascos, enquanto a barra magnética agitava a mistura, até se obter o ponto de viragem do indicador. Neste momento registrava-se o volume de hidróxido de sódio 0,05 M gasto, e a bureta era novamente completada para a realização de nova titulação.

A neutralização dos ácidos formados pela fermentação da placa dentária foi realizada através da adição do hidróxido de sódio 0,05 M. O cálculo para a dosagem dos ácidos de fermentação foi feito subtraindo-se os valores médios obtidos da titulação dos grupos endógenos, dos valores médios obtidos dos grupos testes estudados.

4.2.7 Síntese de polissacarídeos extracelulares

Para a realização do estudo da síntese de polissacarídeos extracelulares (PE), todos os procedimentos realizados estão discriminados nos itens abaixo, contudo a coleta, o tratamento e o preparo da suspensão

da placa dentária são os mesmos já descritos para a fermentação (itens 4.2.2; 4.2.3 e 4.2.4.3).

4.2.7.1 Sacarose 1 M

Para o preparo de 50mL de sacarose 1 M (PM 342,3), a mesma foi pesada e diluída com água deionizada em um Becker de vidro com auxílio de bastão de vidro, balão volumétrico e uma pisseta.

4.2.7.2 Chás utilizados

O preparo dos chás utilizados (chá de camomila, chá de erva doce e chá de cidreira) já foi descrito anteriormente (item 4.2.4.4).

4.2.7.3 Hidróxido de potássio 1 N (KOH)

Para o preparo de 200mL de KOH 1 N (PM 56,1) foi pesado o reagente e diluído em 100mL de água deionizada com auxílio de balão volumétrico, bastão de vidro e uma pisseta.

4.2.7.4 Fenol 5%

O preparo de fenol 5% foi realizado pesando 12,5mg do reagente e diluído em 10mL de água deionizada, com auxílio de um Becker de vidro, bastão de vidro, balão volumétrico e uma pisseta. O preparo deste reagente foi cercado de cuidados especiais, pois o mesmo apresenta características carcinogênicas.

4.2.7.5 Ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4)

Este reagente foi utilizado na forma apresentada pelo fabricante (E. Merck S. A.). Em virtude de sua natureza corrosiva, quando da manipulação do reagente foi necessária a utilização de luvas de procedimentos.

4.2.8 Esquema do experimento

Para o estudo da síntese de polissacarídeos extracelulares, foram utilizados frascos de ependorff de 1,5mL, em suporte próprio, etiquetado para cada tipo de substância testada (Ccam, Ced e Ccid), todos realizados em quintuplicata como explicados a seguir:

Controle

- 0,2 mL de água deionizada;
- 0,1 mL de tampão fosfato 0,5 M pH 6,5;
- 0,2 mL de sacarose 1 M;
- 0,5 mL de suspensão de placa.

Amostra 1-5

- 0,2 mL de chá (camomila, erva doce e cidreira);
- 0,1 mL de tampão fosfato 0,5 M pH 6,5;
- 0,2 mL de sacarose 1 M;
- 0,5 mL de suspensão de placa.

Para o esquema de trabalho a seguinte ordem de procedimentos foi obedecida:

1º - Pipetar 0,2 mL de água deionizada para o frasco controle e 0,2 mL de chá para os frascos amostra 1-5;

2º - Pipetar 0,1mL de Tampão Fosfato de Sódio 0,5 M pH 6,5 em todos os frascos;

3º - Pipetar 0,2 mL de Sacarose 1 M em todos os frascos;

4º - Pipetar 0,5 mL de suspensão de placa em todos os frascos.

Depois de colocados todos os reagentes nos frascos, estes foram agitados, para melhor homogeneização do sistema, e levados para incubação em estufa a 37°C por 18 horas.

Após este período, foram retirados da estufa e centrifugados a 10.000 rpm por 12 minutos. Os sobrenadantes foram desprezados e o precipitado foi suspenso em 1mL de água deionizada e novamente centrifugado. Os sobrenadantes então eram desprezados e as paredes dos tubos enxutas com lenços absorventes, tomando-se o cuidado de não tocar o precipitado.

Ao novo precipitado foi adicionado 0,5mL de KOH 1N, em cada tubo, e os mesmos foram colocados em agitador para que não houvesse resíduo algum em suspensão. Dessas amostras eram retirados alíquotas de 0,1mL para dosagem de carboidratos totais.

4.2.9 Dosagem de carboidratos totais

Com o conteúdo dos frascos obtidos após a síntese de polissacarídeos extracelulares, a dosagem de carboidratos totais foi realizada pelo método de DUBOIS et al. (1956) ¹⁸.

Previamente ao estudo da dosagem de carboidratos totais foi necessária a utilização de uma Curva Padrão de Glicose, de maneira a ser obtido um fator que foi multiplicado pela leitura da dosagem obtida, corrigindo dessa maneira eventuais distorções nesta leitura. Esta curva padrão foi estabelecida com um intervalo variando entre 10µg e 40µg para a

glicose 0,01% e realizada a leitura através de espectrofotômetro regulado para 490nm.

Para a dosagem foi montado, em tubos de ensaio, o seguinte sistema:

Assim, foram pipetados na sequência:

- 0,1 mL de água deionizada para o tubo branco;
- 0,1 mL de controle para os tubos controles (a-e);
- 0,1 mL das amostras 1-5 para os tubos 1a-5a;
- 0,4 mL de água deionizada em todos os tubos;
- 0,5 mL de Fenol 5% em todos os tubos,
- 3,0 mL de H_2SO_4 concentrado em todos os tubos.

Após a colocação do ácido sulfúrico, os tubos se aquecem tendo a necessidade de aguardar 30 minutos para que retornem à temperatura ambiente e assim realizar a leitura dos polissacarídeos hidrolisados em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 490nm.

O cálculo para a concentração de carboidratos totais foi realizado utilizando-se o fator resultante ($F = 105,52$) do valor médio das leituras da Curva Padrão de Glicose expressos em μg de glicose.

4.2.10 Análise Estatística

Os resultados obtidos foram tabulados e submetidos ao teste de Análise de Variância (ANOVA) a dois critérios para a **fermentação** e a um critério para a **síntese de polissacarídeos extracelulares**. Havendo significância, foi empregado o teste de Tukey-Kramer com nível de significância de 5% para comparação entre os diferentes tipos de substratos.

5. Resultados

Resultados

5.1 Fermentação da placa dentária *in vitro*

Os resultados obtidos após o teste de fermentação, foram corrigidos por um fator, conforme os cálculos descritos a seguir:

$$\text{NaOH} - \text{PM} = 40$$

$$\text{NaOH } 1 \text{ M} \quad \text{—} \quad 40 \text{ g/L}$$

$$\text{NaOH } 0,05 \text{ M} \quad \text{—} \quad X$$

$$X = 40 \times 0,05 / 1 = 2 \text{ g/L}$$

$$2 \text{ g/L} = 2000 \text{ mg/L}$$

ou

$$\mathbf{2 \text{ mg/mL}}$$

Para facilitar os cálculos, os resultados foram transformados de mg para μg de NaOH.

Os resultados da fermentação da placa dentária de todos os grupos, endógeno; controle (glicose); teste (chá acrescido de glicose) e teste_(A) (chá), estão expressos nos Anexos 4, 5, 6 e 7.

Na tabela 1 está expresso o valor da média e desvio-padrão para a fermentação do grupo controle (glicose a 2,5%) após descontado o valor do endógeno.

TABELA 1 – Resultados da fermentação do grupo controle (glicose) em $\mu\text{g/mL}$ de NaOH

Controle	$\bar{X} = 1240,00$	dp = $\pm 141,421$
----------	---------------------	--------------------

A tabela 2 mostra os valores das médias e seus respectivos desvios-padrão para a fermentação dos tipos de chás testados acrescido de glicose (grupo teste) em $\mu\text{g/mL}$ de NaOH. Nela se observa, que a maior fermentação ocorreu para o chá de camomila, seguido pelo chá de cidreira e pelo chá de erva doce.

TABELA 2 – Resultados da fermentação do grupo teste (chá acrescido de glicose) em $\mu\text{g/mL}$ de NaOH

Chá	$\bar{X}$	dp
Camomila	3280,00	$\pm 167,332$
Erva doce	2320,00	$\pm 228,035$
Cidreira	2680,00	$\pm 328,633$

Na tabela 3 encontram-se os resultados dos valores das médias e desvios-padrão dos grupos dos chás (teste_(A)) para a fermentação expresso em $\mu\text{g/mL}$ de NaOH. Neste a fermentação foi maior para o chá de cidreira.

TABELA 3 – Resultados da fermentação do grupo teste_(A) (chá) em $\mu\text{g/mL}$ de NaOH

Chá	$\bar{X}$	dp
Camomila	1160,00	$\pm 268,328$
Erva doce	800,00	$\pm 219,089$
Cidreira	1400,00	$\pm 260,768$

Considerando que os valores da fermentação da placa dentária *in vitro* pelo grupo controle (glicose) e grupo teste_(A) (chá), se somados daria possivelmente o valor máximo da fermentação esperado neste trabalho. Assim sendo a tabela 4 nos mostra os valores médios e desvios-padrão quando da soma desses grupos em $\mu\text{g/mL}$ de NaOH.

TABELA 4 – Resultados da fermentação do grupo teste_(A) (chá) somado à fermentação do grupo controle (glicose) em $\mu\text{g/mL}$ de NaOH

Chá	$\bar{X}$	dp
Camomila	2400,00	$\pm 268,328$
Erva doce	2040,00	$\pm 219,089$
Cidreira	2640,00	$\pm 260,768$

A partir daí foi aplicado o teste de análise de variância a 2 critérios para verificar se havia ou não diferença estatisticamente significativa quando comparados os tipos de chá (Ccam, Ced e Ccid) e as condições apresentadas: Grupo teste (chá acrescido de glicose) e grupo teste_(A) (chá) somado ao grupo controle (glicose).

A tabela 5 mostra que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos testados ($p=0,00001$), as condições apresentadas ($p=0,0002$) e suas interações ($p=0,003$).

TABELA 5 – Resultado da análise de variância a dois critérios, considerando-se o tipo de chá, a condição dos grupos (teste (chá acrescido de glicose); teste_(A) (chá) somado ao controle (glicose)) e a interação entre os dois fatores anteriores.

Efeito	GL efeito	QM efeito	GL erro	QM erro	F	p
Tipo de chá	2	1164000	24	62666,67	18,57447	0,00001*
Condição	1	1200000	24	62666,67	19,14894	0,00020*
Interação	2	468000	24	62666,67	7,46809	0,00300*

* diferença estatisticamente significativa – ($p < 0,05$)

Quando comparadas às fermentações dos grupos testes (chá acrescido de glicose) entre si, os resultados mostraram existir diferença estatisticamente significativa entre o chá de camomila com os chás de erva doce ($p=0,0001$) e cidreira ($p=0,0103$). Já na comparação do chá de cidreira com o de erva doce estes não apresentaram diferença estatisticamente significativa. Com isso os resultados mostraram que o chá de camomila acrescido de glicose fermentou mais do que o chá de cidreira, que por sua vez fermentou mais do que o chá de erva doce (Figura 1) e (Tabela 6).

Na comparação dos grupos teste (chá acrescido de glicose) com o grupo teste_(A) (chá) somado ao grupo controle (glicose), pode se observar que houve diferença estatisticamente significativa apenas para o chá de

camomila. Os chás de erva doce e de cidreira não mostraram diferença estatisticamente significativa nestas condições (Tabela 6).

TABELA 6 – Resultados do Teste de Tukey-Kramer para comparações entre os tipos de chás e as condições do grupo teste (chá acrescido de glicose) e do grupo teste_(A) (chá) somado ao grupo controle (glicose).

Comparação	p
Camomila (A) x Camomila (B)	0,0002*
Camomila (B) x Erva doce (B)	0,0001*
Camomila (B) x Cidreira (B)	0,0103*
Erva doce (B) x Erva doce (A)	0,5032
Erva doce (B) x Cidreira (B)	0,2431
Cidreira (B) x Cidreira (A)	0,9998

* diferença estatisticamente significativa – ($p < 0,05$)

A – fermentação do grupo teste_(A) (chá) somado a fermentação do grupo controle (glicose)

B – fermentação do grupo teste (chá acrescido de glicose).

FIGURA 1- Valores médios da fermentação do grupo controle (glicose 2,5%), dos diferentes tipos de chás (grupo teste_(A)), dos chás acrescido de glicose (grupo teste) e da somatória do grupo teste_(A) com o grupo controle (glicose 2,5%).

Para se obter a estimulação ou inibição da fermentação em porcentagem, esse valor foi calculado seguindo o raciocínio abaixo:

A = valor da fermentação do grupo teste_(A) (chá)

B = valor da fermentação do grupo controle (glicose)

C = valor da fermentação do grupo teste (chá acrescido de glicose)

$$A + B = 100\%$$

$$C = X$$

$$X = C \times 100 / A + B$$

X = valor da fermentação do grupo teste (chá acrescido de glicose) em porcentagem.

Após a obtenção da porcentagem do valor da fermentação do grupo teste (chá acrescido de glicose), foi subtraído de 100% para evidenciar se houve estímulo ou inibição da fermentação.

Neste trabalho todos os tipos de chás (Ccam, Ced e Ccid) do grupo teste (chá acrescido de glicose) estimularam mais a fermentação do que as do grupo teste_(A) (chá) somado a do grupo controle (glicose) (Figura 1), sendo que o chá de camomila fermentou 36% a mais e foi estatisticamente significativa. Porém apesar de fermentarem a mais, o chá de erva doce 13%

e o chá de cidreira 1,5%, estes não foram estatisticamente significante (Tabela 6).

5.2 Síntese de polissacarídeos extracelulares (PE) pela placa dentária *in vitro*

Os resultados da síntese de polissacarídeos extracelulares da placa dentária de todos os grupos testados (controle, Ccam, Ced e Ccid) estão expressos nos Anexos 8, 9, 10 e 11.

Na tabela 7 estão expressos os resultados dos valores das médias e desvios-padrão da síntese de polissacarídeos extracelulares, pela placa dentária *in vitro* em relação a todos os grupos testados (controle, Ccam, Ced e Ccid). Esses dados são apresentados como µg de glicose oriunda de polissacarídeos totais hidrolisados. Nesta observa-se que o chá de cidreira foi o responsável pela maior síntese de polissacarídeos extracelulares, seguido do chá de erva doce e chá de camomila.

TABELA 7 – Resultados da síntese de polissacarídeos extracelulares pela placa dentária *in vitro* em relação aos grupos testados (controle, Ccam, Ced e Ccid) em µg de glicose.

Grupos	$\bar{X}$	dp
Camomila	36,114	±3,889
Erva doce	37,368	±5,438
Cidreira	40,336	±3,447
Controle	30,238	±4,164

Com relação aos grupos de chás (Ccam, Ced e Ccid), os resultados obtidos da síntese de PE no final da incubação são todos maiores do que o grupo controle (figura 2).

FIGURA 2 – Comparação entre os diferentes tipos de chás para a síntese de polissacarídeos extracelulares.

Após a obtenção dos resultados foi aplicado o teste de análise de variância a um critério (ANOVA), o qual verificou uma diferença estatisticamente significativa ($p=0,013$), para a comparação entre os grupos testados (controle, Ccam, Ced e Ccid) (Tabela 8).

TABELA 8 – Resultado da análise de variância a um critério (ANOVA) para comparação dos grupos testados (controle, Ccam, Ced e Ccid)

Efeito	GL efeito	QM efeito	GL erro	QM erro	F	p
Tipo de chá	3	89,80862	16	18,48456	4,858575	0,013*

* diferença estatisticamente significativa – ($p < 0,05$)

Na comparação dos resultados da síntese de PE entre os grupos, o único resultado estatisticamente significativo ($p=0,009282$) foi entre o grupo controle e o de chá de cidreira (Tabela 9).

TABELA 9 – Resultados do teste de Tukey-Kramer para comparações intergrupos (controle, Ccam, Ced e Ccid) das sínteses de PE.

Comparação	P
Controle x Camomila	0,176641
Controle x Erva doce	0,078538
Controle x Cidreira	0,009282*
Camomila x Erva doce	0,966484
Camomila x Cidreira	0,431508
Erva doce x Cidreira	0,699619

* diferença estatisticamente significativa – ($p < 0,05$)

6. Discussão

Discussão

Vários fatores que interferem no metabolismo da placa dentária podem ser avaliados para ajudar a determinar seu potencial cariogênico, dentre eles destaca-se a fermentação e sua capacidade de sintetizar polissacarídeos extracelulares.

A relevância de verificar a quantidade de fermentação da placa está no fato de que quanto maior a fermentação da placa pelos microorganismos expostos a determinado substrato, maior será a produção ácida, menor o pH da placa e conseqüentemente maior o poder de desmineralizar a superfície de esmalte no qual a placa está aderida.

A influência da dieta e, particularmente, a dos carboidratos na formação e no metabolismo da placa dentária é um fato unanimemente aceito, sendo a sacarose o principal substrato associado a esses eventos do metabolismo (fermentação e síntese)^{39, 53}.

MARSH³¹; VAN HOUTE ⁵³ relataram que a exposição contínua à sacarose causa freqüentes quedas do pH, que selecionam microorganismos acidogênicos e acidúricos, tornando a placa dentária cada vez mais acidogênica.

É evidente que estreptococos, principalmente os do grupo mutans, estão associados ao desenvolvimento da doença cárie e, que se a

cariogenicidade está relatada para a capacidade destes microorganismos converterem a sacarose em polissacarídeos extracelulares^{24, 56}.

Com relação à composição bioquímica da placa, VAN HOUTE; RUSSO, PROSTAK⁵⁴ demonstraram que massas celulares de *S. mutans* cultivadas na presença de sacarose produzem uma grande quantidade de polissacarídeo extracelular, responsável por aumentar o potencial cariogênico da placa. CURY; REBELLO; DEL BEL CURY¹⁶ e CURY et al.¹⁷, além da quantidade de polissacarídeo extracelular, relacionaram também a menor concentração de cálcio, fósforo e flúor com o maior potencial cariogênico das placas formadas com alta frequência de exposição à sacarose. Além disso, CURY et al.¹⁷ comprovaram a maior cariogenicidade da sacarose em relação à glicose + frutose.

Em Odontopediatria, o estudo de determinados alimentos principalmente aqueles fornecidos às crianças de pouca idade, como chás, sucos, frutas e leites, tem despertado grande interesse. Tais alimentos constituem-se nos primeiros a serem oferecidos aos bebês, fase em que nem sempre a higiene bucal é realizada, sendo portanto necessário, conhecer o potencial cariogênico dos mesmos.

A utilização de chás para crianças de pouca idade é uma prática comum pela população, pois acreditam que utilizando produtos naturais, não estarão ocasionando mal alguns. A pediatria médica indica algumas vezes os chás para as crianças¹¹, mas muitas vezes de maneira errônea, pois quando

indagados sobre os principais motivos porque indicam os chás, quase 20% responderam que era para hidratação oral. Contudo COLLARES; SOUZA¹³ analisaram a composição e a concentração eletrolítica de alguns chás e relataram que os mesmos são contra-indicados quando da fase aguda da diarreia infantil. Portanto, se não bem indicados em vez de beneficiar a criança, neste momento a utilização dos chás é maléfica.

Através do estudo da fermentação e síntese de polissacarídeos extracelulares, realizado neste trabalho, avaliou-se o comportamento dos chás de camomila, erva doce e cidreira sobre um "pool" de pela placa dentária humana, visando um esclarecimento sobre o potencial cariogênico dos mesmos.

As escolhas por estes chás (Ccam, Ced e Ccid) neste trabalho devem-se ao fato de que são rotineiramente ofertados às crianças brasileiras, o que também dificultou a comparação com outros estudos realizados, pois na literatura consultada os chás mais utilizados normalmente são o chá preto e verde.

A metodologia utilizada neste trabalho foi baseada em estudos semelhantes, onde a fermentação e a síntese de polissacarídeos extracelulares foram testadas com outras substâncias^{38, 39, 59}. Em razão da sensibilidade da técnica nesta metodologia, é que realizou-se os testes em quintuplicata e trabalhou-se somente com a média final de cada teste.

Neste estudo todos os chás testados (Ccam, Ced e Ccid) quando acrescidos de glicose (grupo teste) apresentaram valores de fermentação maiores que o valor resultante da soma entre o que foi obtido pelo grupo teste_(A) (chás) somado à fermentação do grupo controle (glicose) (figura 1); valor que seria considerado a máxima fermentação esperada. Os chás acrescidos de glicose aumentaram o metabolismo dos microorganismos presentes no “pool” de placa, favorecendo a fermentação, o que sugeriu um potencial cariogênico dos mesmos. No entanto, quando se analisa somente os chás acrescidos de glicose (tabela 2), o chá de camomila fermentou mais do que o de erva doce e o de cidreira. Na comparação feita entre os três chás do grupo teste (chá acrescido de glicose) com o grupo teste_(A) (chás) somado à fermentação do grupo controle (glicose), verificou-se que apesar de todos estimularem a fermentação apenas o chá de camomila (36%) mostrou significância (tabela 6).

A fermentação resultante no grupo teste_(A) (chás) (tabela 3) revela o estímulo ao metabolismo da placa produzido pelos três chás. Esses resultados encontrados podem sugerir que por serem produtos industrializados e não *in natura*, esses chás devem conter em sua formulação agentes conservantes os quais podem favorecer a fermentação. No entanto conforme informação do fabricante do produto, os chás não apresentam carboidratos em sua composição. Ainda assim, uma outra hipótese é que realmente esses chás apresentem em sua composição elementos que

favoreçam a fermentação, sendo então necessário novos estudos analisando a composição desses produtos industrializados e até mesmo comparar com os chás na sua forma *in natura*. Porém a fermentação da placa foi real neste trabalho com a utilização dos chás de camomila, erva doce e cidreira, os quais são poucos relatados na literatura. Apenas o trabalho de GEBARA; ZARDETTO; MAYER²³ cita a camomila, sendo testada e não mostrando efeito antimicrobiano sobre *S. mutans* e *S. sobrinus*, desaconselhando seu uso no controle desses microorganismos na placa dentária.

Estudos realizados com outros tipos de chás (verde e preto), neste trabalho não testado por não serem costumeiramente utilizados por criança de menor idade, mostram a capacidade destes de reduzir a deposição de placa dentária^{32, 60} e uma pequena liberação de carboidratos fermentáveis⁶⁴. Como a fermentação depende da quantidade de placa, é evidente que restringindo a formação de placa, conseqüentemente estará então diminuindo a sua capacidade fermentativa. Pôde-se verificar então que os chás preto e verde foram menos prejudiciais, e os chás testados neste trabalho (Ccam, Ced e Ccid) mostraram ser mais danosos, pois nenhum deles inibiu a fermentação ou seja teriam a capacidade de estimular o metabolismo de microorganismos acidogênicos. Deve ser considerado contudo, que as metodologias realizadas nestes estudos foram diferentes assim como os produtos utilizados. Isto evidencia a necessidade de novas pesquisas realizando a mesma metodologia comparando estes chás. Outra

hipótese sugerida pode ser que em função da alta concentração de fluoretos presentes no chá preto¹⁵, esse flúor pode ser o fator de inibição da fermentação da placa dentária.

Nos dias atuais, uma alteração da dieta com vista ao controle do metabolismo bacteriano pode ser feita, restringindo-se o consumo de açúcar (sacarose) ou substituindo-os por outros açúcares não fermentáveis. Através dos resultados obtidos percebe-se que a indicação desses chás para bebês, mesmo sem açúcar, requer atenção especial para o controle da placa, pois todos estimularam o metabolismo bacteriano, através da fermentação aumentada. Essa situação torna-se mais crítica, quando eles são acrescidos de sacarose. Esse quadro suscita a necessidade de uma pesquisa mais completa sobre eles, tanto em relação a sua composição com produtos que podem influenciar na fermentação, como com outros fatores (saliva, capacidade tampão, fluoreto, componentes inorgânicos) relacionados ao possível estabelecimento da doença cárie.

Em relação ao estudo da síntese de polissacarídeos extracelulares pelos microorganismos da placa dentária, eles vão fornecer dados quanto ao potencial dessa placa em agregar mais microorganismos através de sua capacidade de aderência. Os polissacarídeos extracelulares também são importantes como fonte de energia. As moléculas que os compõem podem ser deslocadas e utilizadas como nutrientes para o metabolismo bacteriano.

Atualmente existe um grande interesse em descobrir algum tipo de substrato, que quando utilizado, diminua a deposição da placa dentária, e conseqüentemente a ação do metabolismo desta placa. KASHKET et al.²⁴ afirmam que é importante considerar o potencial dos alimentos em afetar a formação de polissacarídeos quando é analisada sua capacidade cariogênica.

Os chás testados neste estudo, em relação à síntese de polissacarídeos extracelulares mostraram que todos os chás testados (Ccam, Ced e Ccid) mostraram um resultado obtido acima do valor obtido pelo controle (tabela 7), mostrando que pode existir algo que faça com que estes substratos favoreçam o processo de síntese.

Apesar de todos os chás testados sintetizarem polissacarídeos extracelulares, apenas o chá de cidreira mostrou um valor significativo ($p=0,009282$) em relação ao controle (tabela 9). Sabendo que os polissacarídeos são responsáveis pelos fenômenos de aderência e colonização de bactérias, o chá de cidreira é o que apresentou os piores resultados, sugerindo então um potencial de maior cariogenicidade da placa exposta à esse chá.

A literatura consultada não relata nada sobre a síntese de polissacarídeos com os três chás estudados. Porém quando analisados trabalhos com chá preto, este se mostra inibidor da síntese e conseqüentemente do poder de aderência da placa dentária^{17,24, 32, 35, 36, 60}.

Neste trabalho nenhum chá testado (Ccam, Ced e Ccid) inibiu a síntese de polissacarídeo extracelular (figura 2), porém mais estudos são necessários e a utilização do chá na sua forma "in natura" pode dar uma real idéia do comportamento destes chás, pois os testados neste trabalho eram industrializados e não se pode afirmar se em sua composição existiria algo que contribuísse para estes resultados encontrados.

Em razão de não se ter encontrado na literatura pesquisada nenhum trabalho semelhante a este, a discussão dos resultados encontrados ficou limitada a interferências baseadas em alguns poucos dados citados.

Com este trabalho, deu-se ênfase a apenas dois fatores, fermentação e síntese de polissacarídeos extracelulares a partir da placa dentária, relacionada com o potencial cariogênico dos substratos testados. Antes de se fazer afirmações sobre os resultados com os chás testados, estudos são necessários para definir alguns aspectos que podem ter influenciado nos resultados, pois por ser um produto industrializado no mínimo uma análise dos componentes constituintes destes chás se torna necessária. Mas na verdade a presença de placa dentária deve ser considerada pelo odontopediatra, antes mesmo de se saber se o produto tem ou não potencial cariogênico. A preocupação maior do profissional deve ser concentrada no controle mecânico da placa dentária, pois sem ela, não existe a possibilidade da instalação da doença cárie.

7. Conclusões

Conclusões

Com base nos resultados obtidos e considerando-se o delineamento experimental utilizado, pode-se atestar e concluir que:

- Todos os chás testados, chá de camomila, chá de erva doce e chá de cidreira foram capazes de estimular a fermentação da placa mesmo sem a presença de glicose;
- Na comparação da fermentação obtida entre os três chás e entre as duas condições estudadas: chá acrescido de glicose e chá sozinho somado ao efeito da glicose (controle), obteve-se diferença estatisticamente significativa somente para a primeira condição e para o chá de camomila, portanto, conclui-se que nenhum dos chás testados inibiu a fermentação da placa, porém os chás de camomila e o de cidreira apresentaram maior potencial cariogênico nas diferentes condições estudadas;
- A síntese de polissacarídeos extracelulares foi maior para todos os chás (Ccam, Ced e Ccid) quando comparada à do grupo controle, mas somente o resultado do chá de cidreira mostrou ser estatisticamente significativo, portanto, nenhum dos chás testados inibiu a síntese de polissacarídeos extracelulares, tendo um potencial cariogênico semelhante, sob este aspecto.

Referências Bibliográficas

*Referências Bibliográficas**

1. ABELSON, D. C.; MANDEL, I. D. The effect of saliva on plaque pH *in vivo*.
J. dent. Res., v.60, n.9, p.1634-8, Sept. 1981.
2. ABREU, C. S. B. **Avaliação, "in vitro", do efeito inibidor do ácido tanico, do diacetato de clorexidina, da iodocetamida, do metabissulfito de sódio e do sulfato de protamina sobre o metabolismo da placa dentária humana (fermentação e síntese de polissacarídeos extracelulares insolúveis)**. Bauru, 1985. 95p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.
3. ATTIN, T. et al. Plaque surface area after rinsing with a low-level fluoride-containing Darjeeling tea. **Eur. J. Oral. Sci.**, v.103, n.6, p.416-8, Dec. 1995.
4. BARROS, E. R. C. Metabolismo da placa cariogênica. **Rev. Fac. Odont. Porto Alegre**, v.30/31, p.16-22, 1990.
5. BORGSTRÖM, M. K. et al. Dental plaque mass and production activity of the microbiota on teeth. **Eur. J. Oral Sci.**, v.108, p. 412-7, 2000.
6. BOWDEN, G. H. Does assessment of microbial composition of plaque/saliva allow for diagnosis of disease activity of individuals?
Community Dent. oral Epidem., v.25, n.1, p.76-81, Feb. 1997.

* Normas recomendadas para uso no âmbito da Universidade de São Paulo, com base no documento "Referências Bibliográficas: exemplos", emanado do Conselho Supervisor do Sistema Integrado de Bibliotecas da USP, em reunião de 20 de setembro de 1990.

7. BROWN, K. H. et al. Infant feeding practices and their relationship with diarrheal and other diseases in Huascar (Lima), Peru. **Pediatrics**, v.83, p.31-40, 1989.
8. BRUNTON, P. A.; HUSSAIN, A. The erosive effect of herbal tea on dental enamel. **J. Dent.**, v.29, n.8, p.517-20, Nov. 2001.
9. BUZALAF, M. A. R. **Bioquímica da placa bacteriana**: manual didático. Bauru, 1998. 45p.
10. CARLSSON, J.; EGELBERG, J. Effect of diet plaque formation in man. **Odont. Revy**, v.16, p.112-25, 1965.
11. CÉSAR, J. A. et al. Prescrição de chás para crianças menores de 6 meses: a opinião dos médicos de uma cidade de porte médio do sul do Brasil. **J. Pediat**, v.72, n.1, p.27-31, 1996.
12. CHAN, J. T.; KOH, S. H. Fluoride content in caffeinated, decaffeinated and herbal teas. **Caries Res.**, v.30, n.1, p.88-92, Jan./Feb. 1996.
13. COLLARES, E. F.; SOUZA, N. M. Soluções alternativas para hidratação oral em pediatria. I – Composição de refrigerantes, de infusões e de água de coco. **Rev. paul. Pediat.**, v.3, n.9, p.46-9, jan./fev. 1985.
14. COUNCIL ON DENTAL THERAPEUTICS. **Guidelines for acceptance of chemotherapeutic products for the control of supragingival dental plaque and gingivitis**. American Dental Association, 1985.

15. CURY, J. A. Concentração de fluoretos em chás brasileiros e seu significado na prevenção de cárie. **Rev. gaúcha Odont.**, v.29, n.2, p.136-8, abr./jun. 1981.
16. CURY, J. A.; REBELLO, M. A. B.; DEL BEL CURY, A. A. In situ relationship between sucrose exposure and the composition of dental plaque. **Caries Res.**, v.31, n.5, p.356-60, Sep./Out. 1997.
17. CURY, J. A. et al. Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in the presence of sucrose or glucose and fructose. **Caries Res.**, v.34, n.6, p.491-7, Nov./Dec. 2000.
18. DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.**, v.28, p.350-6, 1956.
19. DUGGAL, M. S. et al. The acidogenic potential of herbal baby drinks. **Brit. dent. J.**, v.180, n.3, p.98-103, Feb. 1996.
20. ELVIN-LEWIS, M. et al. Anticariogenic potential of comercial teas. **J. Prev. Dent.**, v.6, p.273-84, 1980.
21. FEJERSKOV, O. Concepts of dental caries and their consequences for understanding the disease. **Community Dent. oral Epidem.**, v.25, n.1, p.5-12, Feb. 1997.
22. FROSTELL, G. Quantitative determination of the acid production from different carbohydrates in suspensions of dental plaque material. **Acta odont. Scand.**, v.22, p.457-75, 1964.

23. GEBARA, E. C. E.; ZARDETTO, C.G.D.C.; MAYER, M. P. A. Estudo *in vitro* da ação antimicrobiana de substâncias naturais sobre *S. mutans* e *S. sobrinus*. **Rev. Odont. USP**, v.10, n.4, p.251-6, out./dez. 1996.
24. KASHKET, S. et al. *In vitro* inhibition of glucosyltransferase from the dental plaque bacterium streptococcus mutans by common beverages and food extracts. **Arch. oral Biol.**, v.30, n.11/12, p.821-6, 1985.
25. KASHKET, S.; YASKELL, Y. Limitations in the intraoral demineralization of bovine enamel. **Caries Res.**, v.26, p.98-103, 1992.
26. LEE, E. N. C., et al. Efeito do mate e do chá, comparado ao do flúor, na prevenção da cárie em ratos. **Estomat. Cult.**, v.16, n.2, p.17-22, abr./jun. 1986.
27. LINGSTRÖM, P. et al. Effect of frequent consumption of starchy food items on enamel and dentin demineralization and on plaque *in situ*. **J. dent. Res.**, v.73, n.3, p.652-60, Mar. 1994.
28. LÍRIO, V. S. et al. Qualidade microscópica de chás: comparação com parâmetros legais. **Hig. Aliment.**, v.15, n.82, p.27-32, mar. 2001.
29. LUKE, G. A. et al. Human salivary sugar clearance after sugar rinses and intake of foodstuffs. **Caries Res.**, v.33, n.2, p.123-9, Mar./Apr. 1999.
30. MARGOLIS, H. C. et al. Effect of sucrose concentration on the cariogenic potential of pooled plaque fluid from caries-free and caries-positive individuals. **Caries Res.**, v.27, n.6, p.467-73, 1993.

31. MARSH, P. D. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. **Advanc. dent. Res.**, v.8, n.2, p.263-71, July 1994.
32. MATSUMOTO, M. et al. Effects of oolong tea extract on caries-inducing properties of *Mutans Streptococci*. **Caries Res.**, v.33, n.6, p.441-5, Nov./Dec. 1999.
33. MEDEIROS, U. V.; SANTIAGO, B. M.; SOUZA, M. I. C. Análise dos conteúdo de fluoreto em diversas bebidas. **Rev. bras. Odont.**, v.59, n.1, p.36-40, jan/fev. 2002.
34. MEYEROWITZ, C.; SYRRAKOU, E. P.; RAUBERTAS, R. F. Effect of sucralose – alone or bulked with maltodextrin and/or dextrose – on plaque pH in humans. **Caries Res.**, v.30, n.6, p.438-44, Nov./Dec. 1996.
35. OOSHIMA, T. et al. Oolong tea polyphenols inhibit experimental dental caries in SPF rats infected with *mutans streptococci*. **Caries Res.**, v.27, n.2, p.124-9, Mar./Apr. 1993.
36. OOSHIMA, T. et al. Reduction of dental plaque deposition in human by oolong tea extract. **Caries Res.**, v.28, n.3, p.146-9, May/June 1994.
37. OOSHIMA, T. et al. Comparison of the cariostatic effects between regimens to administer oolong tea polyphenols in SPF rats. **Caries Res.**, v. 32, n.1, p.75-80, Jan./Feb. 1998.

38. PINHEIRO, C. E. et al. Efeito dos extratos de guaraná e de stévia rebaudiana bertonii (folhas), e do esteviosídeo, sobre a fermentação e a síntese de polissacarídeos extracelulares insolúveis da placa dentária. **Rev. Odont. USP.**, v.1, n.4, p.9-13, out/dez., 1987.
39. PINHEIRO, C. F. Avaliação de goma de mascar. **Rev. gaúcha Odont.**, v.42, n.5, p.251-5, set./out. 1994.
40. PORTARIA 519 de 26 de junho de 1998, Sec. de Vigilância Sanitária – Min. da Saúde, **publicada no D. O. U., Seção I**, em 29 de junho de 1988.
41. SANSONE, C. et al. The association of mutans streptococci and non-mutans streptococci capable of acidogenesis at a low pH with dental caries on enamel and root surfaces. **J. dent. Res.**, v.72, n.2, p.508-16, Feb. 1993.
42. SANTOS, C. F.; SANTOS, R. E. ; TARZIA O. Soluções fluoretadas para bochecho: influência do pH sobre o metabolismo da placa dentária humana. **Rev. FOB**, v.6, n.4, p.15-21, out./dez. 1998.
43. SHEIK, C.; ERICKSON, P. R. Evaluation of plaque pH changes following oral rinse with eight infants formulas. **Pediat. Dent.**, v.18, n.3, p.200-4, May/Jun. 1996.
44. SIMPSON, A.; SHAW, L.; SMITH, A. J. The bio-availability of fluoride from black tea. **J. Dent.**, v.29, n.1, p.15-21, Jan. 2001.

45. SIMPSON, A.; SHAW, L.; SMITH, A. J. Tooth surface pH during drinking of black tea. **Brit. dent. J.**, v.190, n.7, p.374-6, Apr. 2001.
46. STAAT, R. H. et al. Effect of dietary sucrose levels on the quantity and microbial composition of human dental plaque. **J. dent. Res.**, v.54, n.4, p.872-80, July/Aug. 1975.
47. STEPHAN, R. M. Changes in the hydrogenion concentration on tooth surfaces and in caries lesions. **J. Amer. dent. Ass.**, v.27, p. 718-23, 1940.
48. SULLIVAN, A. et al. Number of mutans streptococci or lactobacilli in a total dental plaque sample does not explain the variation in caries better than the numbers in stimulated whole saliva. **Community Dent. oral Epidem.**, v.24, n.3, p.159-63, June 1996.
49. TANZER, J. M. On changing the cariogenic chemistry of coronal plaque. **J. dent. Res.**, v.68, p. 1576-87, Nov. 1989. Special issue.
50. THYLSTRUP, A.; FEJERSKOV, O. **Cariologia clínica**. 3. ed. São Paulo, Livraria Santos Editora Ltda, 2001.
51. TINNANNOF, N. Introduction to the Early Childhood Caries Conference: initial description and current understanding. **Community. Dent oral Epidem.**, v.26, Supplement 1 , p. 5-7, 1998.

52. TOUYZ, L. Z. G.; AMSEL, R. Anticariogenic effects of black tea (*Camellia sinensis*) in caries prone-rats. **Quintessence Int.**, v.32, n.8, p.647-50, Sept. 2001.
53. VAN HOUTE, J. Bacterial specificity in the etiology of dental caries. **Int. dent. J.**, v.30, n.4, p. 305-26, 1980.
54. VAN HOUTE, J.; RUSSO, J.; PROSTAK, K. S. Increased pH-lowering ability of *Streptococcus mutans* cell masses associated with extracellular glucan-rich matrix material and the mechanisms involved. **J. dent. Res.**, v.68, n.3, p.451-9, Mar. 1989.
55. VAN HOUTE, J. et al. *In vitro* acidogenic potential and mutans streptococci of human smooth-surface plaque associated with initial caries lesions and sound enamel. **J. dent. Res.**, v.70, n.12, p.1497-502, Dec. 1991.
56. VAN HOUTE, J. Role of micro-organisms in caries etiology. **J. dent. Res.**, v.73, n.3, p.672-81, Mar. 1994.
57. VICTORA, C. G. et al. A pastoral da criança e a saúde materno-infantil em dois municípios do Maranhão. **UNICEF**, Brasília, 1991.
58. VICTORA, C. G.; BARROS, F. C.; VAUGHAN, J. P. **Hospitalizações: In: epidemiologia da desigualdade.** São Paulo: Ed. Hucitec, p.86-93, 1988.
59. VILLAVICENCIO, V. V. et al. Influência do pré-tratamento com fluoreto estânico e fluoreto de sódio, sobre o metabolismo da placa dentária

humana (estudo " *in vitro*"). **Rev. FOB**, v.2, n.4, p.82-8, out./dez. 1994.

60. WU, C. Tea fights cavities, reduces plaque. **J. Calif. dent. Ass.**, v.29, n.7, p.482, July 2001.

61. YU, H.; OHO, T.; XU, L.X. Effects of several tea components on acid resistance of human tooth enamel. **J. Dent.**, v.23, n.2, p.101-5, Apr. 1995.

62. ZERO, D. T.; VAN HOUTE, J.; RUSSO, J. Enamel demineralization by acid produced from endogenous substrate in oral streptococci. **Arch. oral Biol.**, v.31, n.4, p.229-34, 1986.

63. ZERO, D. T.; VAN HOUTE, J.; RUSSO, J. The intra-oral effect on enamel demineralization of extracellular matrix material synthesized from sucrose by *Streptococcus mutans*. **J. dent. Res.**, v.65, n.6, p.918-23, June 1986.

64. ZHANG, J.; KASHKET, S. Inhibition of salivary amylase by black and green teas and their effects on the intraoral hydrolysis of starch. **Caries Res.**, v.32, n.3, p.233-8, May/June 1998.

Abstract

Abstract

"Evaluation of the effects of chamomile, lemon balm and anise teas on the fermentation and synthesis of polysaccharides present in human dental plaque-an *in vitro* study."

The aim of this study was to conduct an *in vitro* analysis of the effect of the chamomile, lemon balm and anise teas in relation to the metabolism of human dental plaque (fermentation and synthesis of extracellular polysaccharides). Dental plaque was collected from children and adolescents and yielded a "pool" of plaque, which was treated in laboratory and submitted to biochemical processes. For fermentation, the study groups were divided in endogenous, control (2,5% glucose), test (tea with glucose) and test_(A) (tea) groups; as regards the synthesis of extracellular polysaccharides, the groups tested were the control group (sucrose) and the test_(A) group (tea). The results achieved were submitted to one- and two-way analysis of variance (ANOVA) at a significance level of 5%, and in case of significance the Tukey-Kramer test was employed for comparison between the different types of substrate. As regards fermentation, the chamomile tea with glucose was more harmful than the other teas investigated, and the difference between them was statistically significant ($p < 0,05$). The synthesis of extracellular polysaccharides was higher for all teas tested compared to the

control group (sucrose), with statistical significance just for the lemon balm tea ($p=0,009$). It was concluded that, *in vitro*, none of the teas employed inhibited the fermentation or synthesis of extracellular polysaccharides in human dental plaque.

Anexos

Anexos

ANEXO 1

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru
Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)235-8000 – FAX (0XX14)223-4679
Comitê de Ética em Pesquisa

Processo nº 054/2002

Bauru, 15 de outubro de 2002

Senhor Professor,

Temos o prazer de informar a V.Sª que após análise por este Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, seu pedido de alteração do título do projeto de pesquisa intitulado “Efeito de sucos infantis sobre a placa dentária humana: análise da capacidade de fermentação, síntese de polissacarídeos, flúor e pH (estudo *in vitro*)” de autoria do C.D. Alexandre Sabatini Cavazzola, sob a sua orientação, para “Avaliação do efeito dos chás de camomila, cidreira e erva doce sobre a fermentação e síntese de polissacarídeos da placa dentária humana – estudo *in vitro*”, foi aprovado considerando que sua metodologia não sofreu modificações.

Comunicamos que após o envio do trabalho concluído, este Comitê enviará o parecer final, que será utilizado para a publicação do trabalho.

Atenciosamente,

Profª Drª Ana Lúcia Alvares Capelozza
Coordenadora

Ilmº Sr. Prof. Dr. José Eduardo de Oliveira Lima
DD. Docente do Departamento de Odontopediatria, Ortodontia e Saúde Coletiva

ANEXO 2

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU
Comitê de Ética em Pesquisa**

CARTA DE INFORMAÇÃO AO PACIENTE

Nome do paciente: _____

As informações contidas nesta carta serão fornecidas pelo aluno de Mestrado em Odontopediatria da FOB/USP Alexandre Sabatini Cavazzola; sob orientação do Prof. Dr. José Eduardo de Oliveira Lima, com o intuito de informar o paciente e seu responsável sobre a natureza dos procedimentos a que se submeterá o mesmo ao participar da pesquisa, com a capacidade de livre arbítrio e sem qualquer coação.

1 – Título do Trabalho Experimental

“Avaliação dos efeitos dos chás de camomila, cidreira e erva doce sobre a fermentação e síntese de polissacarídeos da placa dentária humana - estudo *in vitro*. ”

2 – Objetivo

O objetivo deste estudo é avaliar, em laboratório, o efeito dos chás de camomila, cidreira e erva doce industrializados e da marca Dr. Oetker®. na fermentação (formação de ácidos) e síntese de polissacarídeos extracelulares (formação de açúcares) da placa dentária de crianças.

3 - Procedimentos da Fase Experimental

A pesquisa constará de duas etapas distintas. Na primeira parte, as crianças serão orientadas a suspender a higienização bucal (escovação e uso

de fio dental) por 24 horas, pois delas será coletado toda a placa dentária formada neste período. A coleta desta placa será feita com um instrumento odontológico esterelizado. Após a coleta cada criança fará uma escovação supervisionada, seguindo o protocolo de atenção odontológica normalmente oferecido pela Instituição (CIPS). Ao final da pesquisa, ela receberá uma aplicação tópica de flúor gel. Na segunda etapa, a placa dentária coletada será processada no Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Odontologia de Bauru, junto com os chás já mencionados.

4 – Benefícios do Experimento

Essa pesquisa fornecerá dados importantes com relação ao potencial cariogênico (capacidade de provocar a cárie dentária) dos chás, existentes no comércio, e freqüentemente oferecidos pelas mães às suas crianças. Semanalmente, as crianças que participarem da pesquisa terão remoção de placa das superfícies livres realizada por um cirurgião dentista, sendo em seguidas supervisionadas, orientadas e corrigidas pelo mesmo profissional, durante a escovação dentária. Estes procedimentos são reconhecidamente benéficos à saúde dentária e bucal. Além disso, a aplicação final de flúor em todos os dentes, visa torná-los mais resistentes ao ataque da cárie.

5 – Informações

Os pais ou responsáveis terão a garantia de receber esclarecimento de qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa. Qualquer dúvida ou problema, por favor entrar em contato com um dos pesquisadores nos telefones 235-8225 ou 235-8218 (Disciplina de Odontopediatria – FOB/USP) no horário comercial.

ANEXO 3

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Pelo presente instrumento que atende às exigências legais, o(a) senhor(a) _____ portador da cédula de identidade nº _____, responsável pelo menor _____, após leitura minuciosa da CARTA DE INFORMAÇÃO AO PACIENTE, devidamente explicada pelo profissional em seus mínimos detalhes, ciente dos serviços e procedimentos aos quais será submetido seu dependente, não restando quaisquer dúvidas a respeito do lido e explicado, firma seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO em concordância que o mesmo participe da pesquisa proposta no que lhe é cabível, conforme a CARTA DE INFORMAÇÃO AO PACIENTE.

Fica claro que o representante legal pode a qualquer momento retirar seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO e o menor deixar de participar do estudo, alvo da pesquisa, estando ambos cientes que todo trabalho realizado torna-se informação confidencial guardada por força do sigilo profissional (Art. 9º do Código de Ética de Odontologia).

Por estarem entendidos e conformados, assinam o presente termo.

Bauru - SP, ____ de maio de 2002.

Assinatura do Responsável

Alexandre Sabatini Cavazzola
Pesquisador Responsável

ANEXO 4- Resultados da fermentação da placa dentária do Grupo endógeno

ENDÓGENO

AMOSTRA	mg/mL de NaOH 0,05 M	µg de NaOH
Ea	$1,1 \times 2 = 2,2$	2200
Eb	$1,1 \times 2 = 2,2$	2200
Ec	$1,1 \times 2 = 2,2$	2200
Ed	$1,1 \times 2 = 2,2$	2200
Ee	$1,0 \times 2 = 2,0$	2000
Média da fermentação = 2160 µg/mL de NaOH		

CONTROLE (glicose 2,5%)

Resultados da fermentação da placa dentária do Grupo controle (glicose)

AMOSTRA	mg/mL de NaOH 0,05 M	µg de NaOH	FERMENTAÇÃO REAL (FR) Tx = média ferm. teste T1 = média ferm. endógeno FR = Tx - T1 FR = 1240 µg/mL de NaOH
GCa	$1,8 \times 2 = 3,6$	3600	
Gcb	$1,6 \times 2 = 3,2$	3200	
Gcc	$1,7 \times 2 = 3,4$	3400	
Gcd	$1,7 \times 2 = 3,4$	3400	
Gce	$1,7 \times 2 = 3,4$	3400	
Média = 3400			

ANEXO 5 - Resultados da fermentação da placa dentária do grupo teste(chá acrescido de glicose) e do grupo teste_(A) (chá)**CHÁ DE CAMOMILA**

AMOSTRA	mg/mL de NaOH 0,05 M	µg de NaOH	FERMENTAÇÃO REAL (FR) Tx = média ferm. teste T1 = média ferm. endógeno FR = Tx - T1 FR = 3280 µg/mL de NaOH
Chá acrescido de glicose			
T 1	2,8 x 2 = 5,6	5600	
T 2	2,7 x 2 = 5,4	5400	
T 3	2,7 x 2 = 5,4	5400	
T 4	2,8 x 2 = 5,6	5600	
T 5	2,6 x 2 = 5,2	5200	
Média = 5440			
Chá			FERMENTAÇÃO REAL (FR) Tx = média ferm. teste T1 = média ferm. endógeno FR = Tx - T1 FR = 1160 µg/mL de NaOH
T 1a	1,6 x 2 = 3,2	3200	
T 2a	1,6 x 2 = 3,2	3200	
T 3a	2,5 x 2 = 3,0	3000	
T 4a	1,8 x 2 = 3,6	3600	
T 5a	1,8 x 2 = 3,6	3600	
Média = 3320			

ANEXO 6 - Resultados da fermentação da placa dentária do grupo teste

(chá acrescido de glicose) e do grupo teste_(A) (chá)

CHÁ DE ERVA DOCE

AMOSTRA	mg/mL de NaOH 0,05 M	µg de NaOH	FERMENTAÇÃO REAL (FR) Tx = média ferm. teste T1 = média ferm. endógeno FR = Tx - T1 FR = 2320 µg/mL de NaOH
Chá acrescido de glicose			
T 1	2,2 x 2 = 4,4	4400	
T 2	2,4 x 2 = 4,8	4800	
T 3	2,2 x 2 = 4,4	4400	
T 4	2,1 x 2 = 4,2	4200	
T 5	2,3 x 2 = 4,6	4600	
Média = 4480			
Chá			FERMENTAÇÃO REAL (FR) Tx = média ferm. teste T1 = média ferm. endógeno FR = Tx - T1 FR = 2680 µg/mL de NaOH
T 1a	2,5 x 2 = 5,0	5000	
T 2a	3,0 x 2 = 6,0	6000	
T 3a	3,0 x 2 = 6,0	6000	
T 4a	3,0 x 2 = 6,0	6000	
T 5a	2,8 x 2 = 5,6	5600	
Média = 5720			

ANEXO 7 - Resultados da fermentação da placa dentária do grupo teste

(chá acrescido de glicose) e do grupo teste_(A) (chá)

CHÁ DE CIDREIRA

AMOSTRA	mg/mL de NaOH 0,05 M	µg de NaOH	FERMENTAÇÃO REAL (FR) Tx = média ferm. teste T1 = média ferm. endógeno FR = Tx - T1 FR = 2680 µg/mL de NaOH
Chá acrescido de glicose			
T 1	2,4 x 2 = 4,8	4800	
T 2	2,3 x 2 = 4,6	4600	
T 3	2,7 x 2 = 5,4	5400	
T 4	2,3x 2 = 4,6	4600	
T 5	2,4 x 2 = 4,8	4800	
Média = 4840			
Chá			
T 1a	1,8 x 2 = 3,6	3600	FERMENTAÇÃO REAL (FR) Tx = média ferm. teste T1 = média ferm. endógeno FR = Tx - T1 FR = 1400µg/mL de NaOH
T 2a	1,9 x 2 = 3,8	3800	
T 3a	1,6 x 2 = 3,2	3200	
T 4a	1,9 x 2 = 3,8	3800	
T 5a	1,7 x 2 = 3,4	3400	
Média = 3560			

ANEXO 8 - Resultados da síntese de polissacarídeos extracelulares (PE) pela placa dentária *in vitro* do grupo controle

Grupo Controle

Amostras	Leitura	Resultado (µg de glicose) Leitura x Fator (105,52)
Controle a	0,249	26,27
Controle b	0,241	25,43
Controle c	0,331	34,92
Controle d	0,303	31,97
Controle e	0,309	32,60
Média = 30,23 µg de glicose		

ANEXO 9 - Resultados da síntese de polissacarídeos extracelulares (PE) pela placa dentária *in vitro* do teste de chá de camomila

Chá de camomila

Amostras	Leitura	Resultado (µg de glicose) Leitura x Fator (105,52)
1a	0,360	37,98
2a	0,316	33,34
3a	0,399	42,10
4a	0,323	34,13
5a	0,313	33,02
Média = 36,11 µg de glicose		

ANEXO 10 - Resultados da síntese de polissacarídeos extracelulares (PE)

pela placa dentária *in vitro* do teste de chá de erva doce

Chá de erva doce

Amostras	Leitura	Resultado (µg de glicose) Leitura x Fator (105,52)
1a	0,437	46,16
2a	0,358	37,82
3a	0,299	31,60
4a	0,346	36,50
5a	0,329	34,76
Média = 37,36 µg de glicose		

ANEXO 11 - Resultados da síntese de polissacarídeos extracelulares (PE)

pela placa dentária *in vitro* do teste de chá de cidreira

Chá de cidreira

Amostras	Leitura	Resultado (µg de glicose) Leitura x Fator (105,52)
1a	0,350	36,93
2a	0,405	42,73
3a	0,377	39,83
4a	0,425	44,89
5a	0,353	37,30
Média = 40,33 µg de glicose		