UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

AGNES DE FÁTIMA FAUSTINO PEREIRA

**Estudo dos efeitos de um verniz contendo xilitol sobre
estreptococos do grupo mutans**

BAURU
2010

AGNES DE FÁTIMA FAUSTINO PEREIRA

**Estudo dos efeitos de um verniz contendo xilitol sobre
estreptococos do grupo mutans**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências Odontológicas Aplicadas.

Área de concentração: Biologia Oral
Orientadora: Prof.^a Dr.^a Marília Afonso Rabelo Buzalaf

BAURU
2010

Fátima Faustino Pereira, Agnes

Estudo dos efeitos de um verniz contendo xilitol
sobre estreptococos do grupos mutans /Agnes de
Fátima Faustino Pereira. – Bauru, 2010.

117 p. : il. ; 31cm.

Tese Doutorado – Faculdade de Odontologia
de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marília Afonso Rabelo
Buzalaf

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

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº: 126/2007
Data: 28/11/2007

AGNES DE FÁTIMA FAUSTINO PEREIRA

Dados Curriculares

04 de outubro de 1980
Bauru - SP

Nascimento

Filiação

Lineu Pereira
Ondina de Fátima Faustino

2000 - 2003

Curso de Graduação em Fonoaudiologia –
Faculdade de Odontologia de Bauru da
Universidade de São Paulo – USP.

2005-2007

Curso de Pós-Graduação em Odontologia, área
de Saúde Coletiva, nível Mestrado – Faculdade
de Odontologia de Bauru da Universidade de
São Paulo – USP, com bolsa CAPES.

2007-2010

Curso de Pós-Graduação em Ciências
Odontológicas Aplicadas, área de Biologia Oral,
nível Doutorado – Faculdade de Odontologia de
Bauru da Universidade de São Paulo – USP,
com bolsa FAPESP.

2009 -2010

Estágio Doutorado “*Sandwich*” na Academisch
Centrum Tandheelkunde Amsterdam/Holanda
(ACTA), com bolsa CNPq.

DEDICATÓRIA

À minha querida mãe, **Ondina**, e ao meu querido irmão, **Hermes**, pelo apoio, amor, dedicação, ensinamento e estímulos dispensados em todos os momentos da minha vida.

Ao meu amado **Thiago**, ao qual serei eternamente grata por seu constante incentivo, companheirismo e compreensão durante todos os momentos que compartilhamos.

AGRADECIMENTOS

À Deus, fonte de toda sabedoria, por me mostrar a cada dia que com ELE tudo é possível.

À minha orientadora, **Prof^a Dr^a Marília Afonso Rabelo Buzalaf**, pelo acompanhamento, orientação, confiança e incentivo a mim dedicados. Seus preciosos ensinamentos enriquecem minha vida profissional e pessoal. Serei eternamente grata por ter proporcionado um dos mais espetaculares momentos da minha vida, minha experiência científica no exterior. *Muito obrigada!*

Aos Professores **Jacob M. ten Cate** e **Wim Crielaard**, pela preciosa orientação durante meu estágio de Doutorado “*Sandwich*” na Academisch Centrum Tandheelkunde Amsterdam/Holanda (ACTA).

Aos funcionários do laboratório de Cariologia da Academisch Centrum Tandheelkunde Amsterdam/Holanda, em especial, **Mark Buijs**, **Rob Exterkate** e **Michel Hoogenkamp**, por todo o auxílio prestado durante meu estágio internacional.

Aos meus queridos amigos que conheci em Amsterdam, **Derya**, **Jeroen**, **Saskia**, **Ricardo Macedo**, **Gláuber Vale**, **Ana Paula**, **Eliana Takeshita**, **Lei-Meng**, **Chen**, **Chi Pham**, **Tomiyama**, **Rugero**, **Denise**, **Edílson**, **Elizângela**, **João Vítor**, **Carol**, **Juliana**, **Clarissa**, **Luiz**, **Manon**, **David** e **Joelly**, por tornarem ainda mais especial toda a minha experiência vivenciada na Europa. Muito obrigada!

À **Prof^a Dr^a Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado**, pela amizade, confiança, apoio e constante incentivo em minha carreira docente. *Muito obrigada!*

Aos **professores e funcionários do Departamento de Ciências Biológicas**, pela amizade e pela convivência agradável e construtiva.

À **Faculdade de Odontologia de Bauru – USP**, na pessoa do senhor diretor, Prof. Dr. José Carlos Pereira, e da senhora coordenadora de pós-graduação, Prof^a Dr^a Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado.

À **Pós Graduação da FOB/USP e seus funcionários**, pela responsabilidade, apoio e cuidado que sempre dedicaram aos alunos

À minha segunda família, **João, Maria Isabel, D. Neusa, D. Edson, Diogo, Giuliana e Lucas**, que sempre foram muito carinhosos e acolhedores durante todo o nosso convívio. Registro aqui toda a minha admiração e respeito pessoal e profissional que tenho por vocês.

À **DANISCO BRASIL LTDA**, pela contribuição no fornecimento de xilitol.

À indústria **Dentscare/FGM - Brasil**, pela contribuição na formulação dos vernizes com xilitol.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pela bolsa de Doutorado concedida.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pela bolsa de Doutorado “*Sandwich*” concedida.

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

Muito Obrigada!

**“E nunca te desespere
Pois quem tem fé
Tem poderes
E não fica ao desabrigo...
Quem ama mais
Que é amado,
Tem sempre, sempre, ao seu lado
U’a mão, um rosto amigo...”**

(Alfredo Brasília de Araújo/Hominho)

RESUMO

O presente estudo foi dividido em quatro etapas distintas. A primeira etapa teve por objetivo avaliar a liberação de xilitol na saliva de humanos ao longo do tempo após aplicação de verniz controle e contendo 10% e 20% de xilitol. Um estudo cruzado foi realizado pela aplicação de 32 mg de cada verniz sobre as superfícies vestibulares de todos os incisivos centrais de 10 voluntários. Amostras salivares foram coletadas no *baseline* e após 5 min, 10 min, 15 min, 30 min, 1 h, 1 h 30 min, 2 h, 4 h e 8 h da aplicação dos vernizes para posterior análise da concentração de xilitol na saliva. Um estudo clínico foi realizado na segunda etapa com o objetivo de verificar a influência do verniz contendo xilitol a 20% sobre a contagem de estreptococos do grupo mutans provenientes de biofilme dentário. Semanalmente, 32 mg de verniz controle (grupo G1) ou verniz contendo xilitol a 20% (grupo G2) foram aleatoriamente aplicados sobre as superfícies vestibulares dos incisivos centrais de 67 crianças. Após quatro semanas de procedimento, amostras de biofilme dentário foram coletadas do terço cervical de todos os dentes presentes na cavidade bucal e a contagem relativa e absoluta dos microrganismos foi determinada. A terceira etapa objetivou analisar a influência do xilitol sobre a ultra-estrutura de *Streptococcus mutans* ATCC 33478 e *Streptococcus sobrinus* ATCC 25175. Além disso, a capacidade do xilitol e do flúor em promover estresse celular em *S. mutans* UA 159 geneticamente modificados (deleção do gene *vick*) foi determinada na quarta etapa. As concentrações de xilitol na saliva ($F=5,228$, $p=0,024$) em diferentes tempos de coleta ($F=18,24$, $p<0,0001$) foram estatisticamente diferentes após aplicação dos vernizes contendo 10% e 20% do açúcar (etapa 1). Na etapa 2, contagens absolutas inicial e final de estreptococos do grupo mutans (Teste-t, $p=0,4192$) e de estreptococos totais (Teste-t, $p=0,3506$) não foram significativamente diferentes nos indivíduos pertencentes ao grupo G2. No entanto, uma redução significativa na porcentagem relativa inicial e final de estreptococos do grupo mutans em relação aos estreptococos totais foi observada (Teste-t, $p=0,0095$). Xilitol a 20% promoveu alterações na morfologia de *S. mutans* ATCC 33478 e *S. sobrinus*, ATCC 25175, resultando em paredes celulares mais difusas e menos definidas, cápsulas

polissacarídicas mais dispersas e irregulares em relação ao grupo controle (etapa 3). Os tratamentos envolvendo xilitol a 1,25% e 2,5% mostraram-se capazes de produzir maior estresse celular à *S. mutans* geneticamente modificados quando comparados aos tratamentos com NaF a 22,5 mM e 45 mM em todos os tempos analisados (ANOVA a um critério, Teste de Tukey, $p < 0,05$). Portanto, o verniz contendo xilitol pode ser considerado um interessante veículo para a administração do açúcar, uma vez que demonstrou propiciar uma liberação mais lenta do poliol na cavidade bucal. Além disso, a significativa redução da contagem relativa de estreptococos do grupo mutans em relação aos estreptococos totais pode auxiliar na prevenção de cárie dentária. Este estudo também demonstrou a habilidade do xilitol em produzir alterações ultra-estruturais de *S. mutans* ATCC 33478 e *S. sobrinus*, ATCC 25175, além de ser capaz de produzir estresse celular em *S. mutans* UA159 com deleção do gene *vick*.

Palavras-chave: Xilitol. Cárie dentária. *Streptococcus mutans*.

ABSTRACT

Study of effects of a xylitol varnish on mutans streptococci

This study was divided in four distinct stages. The first one aimed to assess the xylitol release in human saliva along time after application of control, 10% or 20% xylitol varnishes. A cross-over design study was performed by application of 32 mg of each varnish on buccal surfaces of all incisors of 10 volunteers. Salivary samples were collected to analyze the xylitol concentration in baseline and after 5 min, 10 min, 15 min, 30 min, 1 h, 1 h 30 min, 2 h, 4 h and 8 h from varnishes application. A clinical study was executed in the second stage aiming observe the influence of 20% xylitol varnish on mutans streptococci counts from dental plaque. Weekly, 32 mg of control varnish (group G1) or 20% xylitol varnish (group G2) were randomly applied on buccal surfaces of central incisors of 67 children. After 4 weeks of procedures, dental plaque samples were collected from cervical of all teeth and relative and absolute counts of microorganisms were determined. The third stage aimed to analyze the effect of xylitol on the ultrastructure of *Streptococcus mutans* ATCC 33478 and *Streptococcus sobrinus* ATCC 25175. Moreover, the capacity of xylitol and fluoride to promote cellular stress in *S. mutans* UA 159 knockout vick gene was determined in the fourth stage. Salivary xylitol concentrations ($F=5,228$, $p=0,024$) in different collection times ($F=18,24$, $p<0,0001$) were statistically different after 10% and 20% varnishes application (stage 1). In stage 2, initial and final absolute mutans streptococci (Teste-t, $p=0,4192$) and total streptococci counts (Teste-t, $p=0,3506$) did not differ significantly in volunteers from group G2. However, a significant reduction of initial and final relative mutans streptococci counts was observed in relation to total streptococci (Teste-t, $p= 0,0095$). 20% xylitol promoted alterations in morphology of *S. mutans* ATCC 33478 and *S. sobrinus*, ATCC 25175, resulting in more diffuse and less defined cellular wall, more dispersive and irregular polysaccharidic capsules in comparison to control group (stage 3). 1.25% and 2.5% xylitol treatments were able to produce higher cellular stress to genetically modified *S. mutans* when compared to 22.5 mM and 45 mM NaF treatments throughout the time (ANOVA, Tukey's test,

p<0.05). Therefore, xylitol varnish can be regarded as interesting vehicle to administer the polyol because it achieved a slower xylitol release into the oral cavity. Furthermore, a significant reduction of relative mutans streptococci counts in relation to total streptococci can aid in prevention of dental caries. The present study also demonstrated the ability of xylitol in producing ultrastructural alterations in *S. mutans* ATCC 33478 and *S. sobrinus*, ATCC 25175, besides generating cellular stress to *S. mutans* UA159 knockout *vick* gene.

Key words: Xylitol. Dental Caries. *Streptococcus mutans*.

Lista de abreviaturas e símbolos

EGM – estreptococos do grupo mutans

F – flúor

g – grama

h – hora

L – litro

M – molar

MAL – maltitol

min – minuto

mL – mililitro

N – número

NaF – fluoreto de sódio

°C – graus Celsius

pH – potencial hidrogênionico

ppm – parte por milhão

S. mutans – *Streptococcus mutans*

S. sobrinus – *Streptococcus sobrinus*

UFC – unidade formadora de colônia

XYL – xilitol

% - porcentagem

µg – micrograma

µL – microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	21
3	PROPOSIÇÃO	43
4	MATERIAL E MÉTODOS	46
4.1	PRIMEIRA ETAPA	46
4.1.1	Caracterização da amostra	46
4.1.2	Aplicação dos vernizes	47
4.1.3	Coleta de saliva	49
4.1.4	Análise da concentração salivar de xilitol	49
4.2	SEGUNDA ETAPA	49
4.2.1	Caracterização da amostra	49
4.2.2	Aplicação dos vernizes	50
4.2.3	Coleta do biofilme dentário e da saliva	51
4.2.4	Preparo da suspensão de biofilme dentário	51
4.2.5	Diluição da suspensão de biofilme dentário	51
4.2.6	Contagem de estreptococos do grupo mutans	52
4.3	TERCEIRA ETAPA	54
4.3.1	Análise ultra-estrutural do <i>S. mutans</i> e <i>S. sobrinus</i>	54
4.4	QUARTA ETAPA	55
4.4.1	Atividade do gene promotor	55
5	RESULTADOS	63
6	DISCUSSÃO	77
7	CONCLUSÕES	87
	REFERÊNCIAS	90
	ANEXOS	102

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

O xilitol é um açúcar álcool (pentitol) naturalmente encontrado em algumas frutas e plantas. Pode também ser produzido industrialmente a partir de sabugo de milho, cana de açúcar, cascas de sementes e de nozes (CUNHA, 2003). Este carboidrato tem sido comumente utilizado em gomas de mascar e confeitos, como também em produtos farmacêuticos e de higiene oral (TAPIAINEN, 2002; MAKINEN, 2000a).

Estudos relatam que o xilitol pode ter inúmeras aplicações médicas, dentre elas: nutrição intravenosa, prevenção de lesões de cárie dentária, infecção de ouvido médio, osteoporoses e distúrbios musculares (MAKINEN, 2000b).

Investigações sobre os efeitos anticariogênicos do açúcar tiveram início na década de 70, em Turku, na Finlândia. Nesta época, foi observada a capacidade que o xilitol tem de reduzir o crescimento e a produção de ácidos do *Streptococcus mutans*, principal bactéria responsável pelo desenvolvimento da cárie dentária (KAKUTA et al., 2003; MIYASAWA et al., 2003; MAKINEN, 2000a).

O mecanismo pelo qual o xilitol inibe o crescimento e metabolismo bacteriano ainda não é totalmente esclarecido. Acredita-se que a explicação mais plausível esteja no conhecimento do “ciclo fútil”, onde o xilitol é transportado via sistema frutose-fosfotransferase para o interior da bactéria, resultando em acúmulo intracelular de xilitol-5-fosfato (GONÇALVES, 2004; KAKUTA et al., 2003). Este metabólito intermediário não é utilizado, sendo então desfosforilado e expelido do interior celular como xilitol. Este “ciclo fútil” consome energia e resulta na inibição do crescimento e metabolismo bacteriano (GONÇALVES, 2004; LYNCH & MILGROM, 2003; ISOKANGAS et al., 2000; MAKINEN, 2000b).

Respostas específicas são essenciais para a adaptação e sobrevivência bacteriana frente a estímulos agressores. *Streptococcus mutans* possuem sistemas reguladores capazes de permitir a sua sobrevivência em ambientes inóspitos, com baixo pH e escassez de nutrientes. O sistema VicRK é um dos treze sistemas TCRS (sistema regulador de dois componentes) identificados nestas bactérias. Ele é composto por proteínas sensitivas, codificadas pelo gene VicK, e por proteínas

reguladoras de resposta, codificadas pelo gene VicR, e está diretamente ligado à expressão de genes relacionados à virulência. Em *Streptococcus mutans*, estes incluem os genes relacionados diretamente à natureza cariogênica dos organismos, como *gtfBCD*, *ftf* e *gpbB*, bem como à formação do biofilme (LEE et al., 2004, SENADHEERA et al., 2005). Não se sabe exatamente qual (is) sinais ambientais induzem a regulação causada pelo sistema VicRK. Recentemente, foi relatado que a superexpressão dos genes VicRK está ligada ao aumento da tolerância bacteriana ao estresse oxidativo, o que pode conferir resistência a este microrganismo ao longo do tempo. Então, o estresse oxidativo poderia ser um dos sinais relacionados à ativação do sistema VicRK. A capacidade dos *S. mutans* em monitorar os níveis intracelulares de oxigênio é importante, pois moléculas reativas de oxigênio podem ser altamente tóxicas para tais microrganismos (DENG et al., 2007; SENADHEERA et al., 2007). Ainda não existem evidências que demonstrem a capacidade do xilitol em interferir com a regulação do sistema VicRK, o que estaria relacionado à capacidade deste açúcar em interferir na tolerância bacteriana ao estresse oxidativo.

Tapiainen et al. (2004) observaram alterações morfológicas em *Streptococcus pneumoniae* após administração de xilitol 0,5% e 5% concentrado pelo período de 2 h. A estrutura da parede celular destas bactérias tornou-se mais difusa, menos bem definida e mais irregular que aquelas pertencentes ao grupo controle. Além disso, o diâmetro da cápsula polissacarídica das bactérias foi reduzido com a administração do açúcar nas duas concentrações estudadas pelo período de 2 h. Porém, após a administração de xilitol por 30 min não foram observadas alterações estatisticamente significativas em relação ao grupo controle. Portanto, o tempo que o açúcar permaneceu disponível foi mais importante que a concentração administrada, para que pudessem ser observadas alterações ultra-estruturais nas bactérias estudadas. Sabendo-se que a descoberta do benefício do xilitol na prevenção de otite média aguda deu-se a partir de estudos comparativos na área odontológica (MAKINEN, 2000a), resultados similares podem ser esperados na alteração morfológica de estreptococos do grupo mutans.

Apesar de vários estudos terem obtido resultados positivos em relação à diminuição da contagem de bactérias cariogênicas no biofilme dentário e saliva e prevenção da cárie dentária com a utilização do xilitol (MILGROM et al., 2006; HONKALA et al., 2006; TRINDADE, 2005; SINTES et al., 2002; HAYES, 2001; ALANEN et al., 2000; HILDEBRANDT & SPARKS, 2000), Uhari et al. (2001)

consideraram as formas de administração do açúcar inaceitáveis para a realidade atual, levando-se em consideração o número de vezes que estes veículos (gomas de mascar e pastilhas) devem ser utilizados diariamente para que a concentração salivar de xilitol seja capaz de prevenir lesões de cárie dentária.

Novos veículos de administração do xilitol devem ser pesquisados, com o intuito de providenciar a manutenção de níveis salivares adequados do açúcar, possibilitando a interferência no metabolismo e crescimento das bactérias cariogênicas. Além disso, estudos clínicos randomizados são necessários para analisar a capacidade desses veículos em prevenir o aparecimento de novas lesões de cárie dentária em crianças, adultos e idosos.

Na Odontologia, o verniz dentário é uma estratégia amplamente utilizada para a aplicação tópica de flúor com a finalidade de prevenir a cárie dentária (TEN CATE, 2004; ELIAS, 2005). Geralmente, os vernizes são preparados em base alcoólica e, quando aplicados nas superfícies dos dentes, têm secagem bastante rápida, apresentando uma forte adesão à estrutura do dente (BASTOS et al., 2001), o que possibilita uma liberação contínua e lenta do íon flúor. Outra vantagem da técnica é o fato de depender menos da colaboração do paciente (BADER, 2001).

Não há no mercado um verniz que possua em sua composição o xilitol. Refletindo sobre a aderência que este veículo possui na superfície dentária, provavelmente propiciando uma liberação mais lenta do açúcar, a facilidade de aplicação do verniz em indivíduos de diferentes idades, bem como sobre a capacidade que o xilitol possui em prevenir inúmeras doenças (cárie dentária, otite média aguda, osteoporoses, distúrbios musculares, entre outras), foi desenvolvido um verniz contendo xilitol a 10% e 20% (patente USP requerida, processo nº 07.1.2553.25.0).

Pereira e col (2010) realizaram estudo *in vitro* para verificar a liberação de xilitol em saliva artificial ao longo do tempo após aplicação de verniz contendo 10% (G1) e 20% (G2) do açúcar. Durante todo o período de análise (72 h) foi observada liberação de xilitol pelos vernizes utilizados nos grupos G1 e G2. Além disso, os grupos G1 e G2 apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação à liberação de xilitol nos diferentes intervalos de tempo. Portanto, são necessários

estudos clínicos para um melhor conhecimento da real concentração de xilitol que será disponibilizada na saliva humana após aplicação do verniz contendo 10% e 20% do açúcar, bem como os efeitos que este veículo pode exercer no processo de formação e acúmulo do biofilme dentário.

2 Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Xilitol

O xilitol é um carboidrato naturalmente encontrado em frutas e vegetais. Este açúcar foi obtido pela primeira vez a partir da xilose, derivada do xilema encontrado nos caules de árvores. Possui aspecto cristalino, similar ao da sacarose e pode ser classificado como um açúcar-álcool, como o manitol e o sorbitol. Bioquimicamente é classificado como um poliol acíclico composto por cinco carbonos (pentitol) (PELDYAK & MÄKINEN, 2002).

O poder adoçante do xilitol é igual ao da sacarose. Porém, apresenta as vantagens de possuir menos calorias (2,4 Kcal/g) (BURT, 2006), gerar menores alterações nos níveis de glicose plasmática e nas concentrações de insulina (NATAH et al., 1997) e não ser metabolizado por bactérias orais (ANDERSON, 2003). A extração comercial deste substituto da sacarose ocorre principalmente através de resíduos de milho, caules, cascas de sementes e castanhas (PELDYAK, MÄKINEN, 2002).

Atualmente, a produção mundial de xilitol ultrapassa 10.000 toneladas por ano e o mesmo pode ser introduzido em diferentes alimentos consumidos por crianças e adultos, como gomas de mascar, doces, gelatinas, sorvetes e xaropes. Além disso, produtos farmacêuticos e de higiene e limpeza, como multivitamínicos, pastilhas, dentifrícios e enxaguatórios bucais, podem conter o açúcar em sua formulação (ÇAGLAR et al., 2007).

A absorção do xilitol ocorre lentamente no intestino delgado. Porções não adequadamente absorvidas após o consumo de grandes quantidades do açúcar podem alcançar o intestino grosso e produzir efeitos colaterais como diarreia osmótica, flatulência e dor gastrointestinal. A dose máxima para ingestão segura do xilitol por adultos e crianças varia entre os estudos analisados (MAKINEN, SCHEININ, 1978; AKERBLOM et al., 1982; FOSTER et al., 1982). Adultos podem ingerir uma quantidade diária de até 60-70 g de xilitol, sendo que 10-30 g do açúcar podem ser consumidos em uma única vez sem causar efeitos colaterais. Já as

crianças podem ingerir até 50 g de xilitol diariamente, sendo que 10 g podem ser consumidos seguramente durante uma única refeição. Após o consumo sucessivo de grandes doses de xilitol ocorre a redução gradativa dos efeitos colaterais como resposta de adaptação orgânica (FOSTER et al., 1982; KITCHENS, 2005).

O organismo humano produz entre 5 e 15 g de xilitol por dia, como um intermediário no metabolismo de carboidratos (MAKINEN, SCHEININ, 1978). O metabolismo do xilitol ocorre principalmente nos tecidos hepáticos. Tecidos adiposos, renais, pulmonares e cerebrais podem responder por até 20% do metabolismo deste açúcar (MÄKINEN, 2000).

2.2 Aplicações Médicas e Odontológicas

O xilitol pode ser usado para o consumo de pacientes diabéticos como substituto da sacarose. Após a ingestão deste poliol, os níveis de insulina apresentam uma elevação muito menor que aqueles observados após a ingestão de sacarose (NATAH, 1997). Em ambiente hospitalar, pode servir como fonte de energia intravenosa, principalmente após casos de trauma e durante sépsie, com o intuito de aumentar o catabolismo de proteínas e evitar a hiperglicemia (SCHRIKER et al., 1993).

Por conferir um sabor adocicado aos produtos onde é utilizado e apresentar 40% menos calorias que a sacarose, o xilitol pode ser considerado um substituto adequado do açúcar convencional em casos onde seja necessário o controle de peso de pacientes. Além disso, por ser absorvido de forma muito lenta, o xilitol atrasa o processo de esvaziamento gástrico, gerando sensação de maior saciedade (SHAFER et al., 1987).

A absorção de cálcio pode ser melhorada pela ingestão de xilitol, possibilitando a prevenção de osteoporose em modelos animais. O estudo de Mattila et al. (2005) demonstrou que a suplementação dietética com 10% de xilitol diminuiu a reabsorção óssea e aumentou a densidade trabecular e conteúdo mineral em ratos. Estes resultados foram ainda melhores quando a mesma concentração do açúcar foi administrada de forma associada ao etanol 10%. Ainda não existem evidências científicas que comprovem a importância do papel do xilitol na prevenção de osteoporose em seres humanos.

Bactérias formadoras de biofilme podem ser afetadas pela administração do xilitol. Este carboidrato possui propriedades capazes de diminuir o crescimento e aderência de microrganismos otopatogênicos (TAPIAINEN et al., 2004; KONTIOKARI et al., 1998) e cariogênicos (HOLGERSON, 2007; MASSOTH et al., 2006; MÄKINEN et al., 2002). Estudos clínicos randomizados têm demonstrado que o xilitol pode ser utilizado efetivamente na prevenção de otite média aguda em crianças (UHARI et al., 1998; UHARI, 1996) e da cárie dentária em adultos (SCHEININ et al., 1976; MÄKINEN et al., 1996) e crianças (SINTES et al., 2002; KOVARI et al., 2003; MÄKINEN, 2005). A cárie dentária é uma doença multifatorial, dependente do aproveitamento de carboidratos fermentáveis por microrganismos acidogênicos e acidúricos, aderidos sobre as superfícies dentárias. Ácidos são produzidos principalmente por estreptococos do grupo mutans (EGM) após o metabolismo de açúcares, especialmente da sacarose. A liberação destes ácidos na interface entre biofilme e esmalte promove uma rápida queda do pH local e consequente estímulo aos processos de desmineralização. Quanto maior a exposição dos tecidos dentários a condições críticas de pH, maiores serão as chances de se evidenciarem sinais clínicos advindos do processo de cárie dentária, como manchas brancas e cavidades em esmalte e dentina (SELWITZ, 2007). O processo de desmineralização-remineralização é dinâmico e inevitável, ocorrendo durante toda a vida do indivíduo. Porém, pode ser controlado (FEJERSKOV, 2005).

Investigações sobre os efeitos anticariogênicos do xilitol tiveram início na década de 1970, em Turku, na Finlândia. Nesta época, foi observada a capacidade que este açúcar possuía em reduzir o crescimento de *S. mutans* e a produção de ácidos provenientes de bactérias cariogênicas (MAKINEN, 2000; KAKUTA, 2003).

2.3 Mecanismos de ação do xilitol na prevenção de cáries

O crescimento e metabolismo de *Streptococcus mutans* podem ser inibidos através da ação direta do xilitol sobre o processo de glicólise dessas bactérias. O xilitol pode ser incorporado por estes microrganismos através da utilização do sistema frutose-fosfotransferase (TRAHAN et al., 1985). Já no

interior da célula, a molécula do açúcar é fosforilada, acarretando na formação de xilitol-5-fosfato, que não pode ser metabolizado (SÖDERLING et al., 1989). O acúmulo de xilitol-5-fosfato no interior da bactéria resulta na inibição da produção de enzimas glicolíticas. Após a administração de xilitol a *Streptococcus mutans* NCTC 10449, Maehara et al. (2005) observaram a inibição da maioria dos intermediários da via glicolítica, dentre os quais: glicose-6-fosfato, frutose-6-fosfato, gliceraldeído-3-fosfato, frutose-1,6-bifosfato, 3-fosfoglicerato, 2-fosfoglicerato e fosfoenolpiruvato, muitas vezes essenciais para a ativação enzimática. A inibição de intermediários da cadeia metabólica prejudica o metabolismo do açúcar, e, consequentemente, a produção de energia. Posteriormente, o xilitol-5-fosfato é desfosforilado e excretado da célula. Esse processo é responsável pela criação de um “ciclo fútil” (TRAHAN et al., 1985), ou seja, a energia necessária para a manutenção e desenvolvimento bacterianos é consumida e não reposta.

Os resultados do estudo de Kakuta et al. (2003) demonstraram que o maior acúmulo de xilitol-5-fosfato no interior de estreptococos, após administração de xilitol associado ou não a outros tipos de açúcares, diminuiu o crescimento dos microrganismos e a produção de ácidos pelas bactérias. Entretanto, quando o xilitol foi associado à frutose, a quantidade de xilitol-5-fosfato produzida no interior celular foi menor, acarretando na não diminuição da produção de ácidos pelos *Streptococcus mutans*. Esse resultado evidencia o fato de que a coexistência de xilitol e frutose no meio impede a formação eficiente de xilitol-5-fosfato devido ao transporte preferencial de frutose pelo sistema frutose-fosfotransferase, o que não ocorre com outros tipos de açúcares.

Em adição, a estrutura molecular de cinco carbonos do xilitol é estequiometricamente desfavorável para ser fermentada por *Streptococcus mutans*, o que dificulta a produção de ácidos extensos, produtos do metabolismo de bactérias orais cariogênicas e principais responsáveis pelo processo de desmineralização observado durante a progressão da cárie dentária (ASSEV et al., 1983; MIAKE et al., 2003).

O estudo realizado por Haukioja et al. (2008) demonstrou que quando bifidobactérias e lactobacilos probióticos, microrganismos potencialmente cariogênicos, foram expostos *in vitro* ao xilitol (100 mM), não foram observadas quedas de pH que pudessem ser consideradas clinicamente relevantes para o desenvolvimento de lesões de cárie dentária após 30 min (minutos) da exposição ao

açúcar. Por outro lado, glicose, sacarose, lactose e sorbitol foram responsáveis por quedas de pH consideradas críticas para o início do processo de desmineralização em esmalte, em pelo menos um dos grupos estudados.

2.4 Estudos que avaliaram os efeitos do xilitol sobre as bactérias cariogênicas

Muitos estudos objetivaram entender os efeitos do xilitol sobre o metabolismo, a capacidade acidogênica e a contagem de *Streptococcus mutans* na saliva e no biofilme dentário (HARESAKU et al., 2007; HOLGERSON, 2007; HOLGERSON, 2006; ISOTUPA et al., 1995; LY et al., 2006; MÄKINEN et al., 2005; MILGROM et al., 2006; SCHEIE et al., 1998; SENGUN et al., 2004; STECKSÉN-BLICKS et al., 2004; MASSOTH et al., 2006; TWETMAN, STECKSÉN-BLICKS, 2003; MÄKINEN et al., 2002), bem como a influência deste açúcar sobre o processo de remineralização do esmalte (MIAKE et al., 2003; SUDA et al., 2006) e a possibilidade de desenvolvimento de bactérias resistentes ao xilitol (MEURMAN et al., 2005; TANZER et al., 2006).

Çaglar et al. (2007) realizaram um estudo controlado randomizado em Istambul, Turquia, com o objetivo de analisar a influência de gomas de mascar contendo xilitol ou bactérias probióticas sobre a contagem de *Streptococcus mutans* e lactobacilos na saliva de 80 adultos jovens saudáveis com idades entre 21 e 24 anos. Os voluntários foram divididos aleatoriamente em quatro grupos: A (indivíduos que consumiram gomas contendo bactérias probióticas três vezes ao dia), B (indivíduos que consumiram dois tabletes de 1,03 g cada, contendo 77% de xilitol, três vezes ao dia), C (indivíduos que consumiram diariamente dois tabletes contendo bactérias probióticas e quatro tabletes contendo 77% de xilitol) e D (indivíduos consumiram gomas de mascar placebo três vezes ao dia). A duração do período experimental foi de três semanas e todos os indivíduos foram instruídos a mascar os produtos determinados por 10 min após cada refeição. Os resultados mostraram uma redução significativa na contagem de *S. mutans* presentes na saliva dos voluntários pertencentes aos grupos A e B após o uso das gomas de mascar. Uma tendência de diminuição dos níveis salivares das mesmas bactérias foi observada no

grupo C, porém sem diferenças estatisticamente significativas. Não foram observadas alterações significativas para os níveis de lactobacilos em nenhum dos grupos estudados, bem como para o nível de *S. mutans* no grupo D.

Com o objetivo de determinar os efeitos de uma goma de mascar contendo xilitol e outra contendo maltitol sobre a contagem de *Streptococcus mutans* na saliva e no biofilme dentário, Haresaku et al. (2007) realizaram um estudo clínico randomizado envolvendo 104 oficiais japoneses com idades entre 18 e 53 anos. Os oficiais foram divididos em três grupos: XYL (mastigaram dois tabletes de uma goma contendo xilitol por 5 min após todas as refeições, totalizando 7,9 g do açúcar ao dia), MAL (mastigaram dois tabletes de uma goma contendo maltitol por 5 min após todas as refeições, totalizando 7,1 g do açúcar ao dia) e CR (não mastigaram gomas contendo xilitol nem gomas contendo maltitol). A duração do estudo foi de seis meses. Após este período, os níveis de *Streptococcus mutans* na saliva e no biofilme dentário foram mensurados e comparados com aqueles obtidos durante o *baseline*. No grupo XYL, foi observada redução nos níveis de *Streptococcus mutans* na saliva e no biofilme dentário. Um aumento no número das mesmas bactérias foi observado no biofilme dentário coletado dentre os indivíduos pertencentes ao grupo MAL. Nenhuma diferença significativa foi observada entre os níveis iniciais e finais de *Streptococcus mutans* na saliva dos indivíduos pertencentes ao grupo MAL e no biofilme dentário e saliva dos indivíduos do grupo CR.

Hildebrandt e Sparks (2000) avaliaram a capacidade do xilitol, contido em gomas de mascar, em manter níveis reduzidos de *Streptococcus mutans* na saliva de 151 pacientes, com idade média de 36 anos, submetidos ao uso tópico prévio de clorexidina 0,12%, em formato de enxaguatório, duas vezes ao dia durante duas semanas. Os voluntários foram aleatoriamente divididos em três grupos: teste (uso de goma de mascar contendo xilitol por 5 min, três vezes ao dia), placebo (uso de goma contendo sorbitol) e controle (não utilização de qualquer tipo de goma de mascar). Após um período experimental de três meses, os níveis salivares de *S. mutans* foram significativamente menores no grupo teste ($3,6 \log_{10}$ UFC/mL $\pm 1,2$) UFC quando comparado com o grupo placebo ($4,7 \log_{10}$ UFC/mL $\pm 1,2$) ou controle ($4,4 \log_{10}$ UFC/mL $\pm 1,3$). Portanto, gomas de mascar contendo xilitol podem retardar o retorno dos níveis salivares de *S. mutans* após a prévia supressão quimioterápica deste tipo bacteriano.

Holgerson et al. (2007) investigaram os efeitos do xilitol sobre a contagem de *S. mutans* e a formação de ácido láctico na saliva, bem como a quantidade de biofilme dentário visível. Foram recrutadas 128 crianças, com idade média de 12,7 anos, as quais foram divididas em dois grupos: A (crianças mastigaram dois tabletes de um tipo de goma contendo sorbitol e maltitol, três vezes ao dia) e B (crianças mastigaram dois tabletes de um tipo de goma contendo xilitol, três vezes ao dia, totalizando a ingestão diária de 6,18 g de xilitol). O período experimental durou quatro semanas. Os resultados mostraram uma redução significativa nos índices de placa em ambos os grupos após as quatro semanas. Porém não foram observadas diferenças significativas entre os grupos A e B. Os níveis salivares de *S. mutans* foram significativamente menores no grupo B após o período experimental. Não foram observadas diferenças significativas entre os níveis do *baseline* e final no grupo A. Ainda, foi observada uma redução de 25% na produção de ácido láctico detectado na saliva em ambos os grupos, após o uso das gomas de mascar. Os resultados permitiram concluir que a utilização de gomas de mascar contendo xilitol ou sorbitol/maltitol durante quatro semanas pode reduzir a quantidade de biofilme dentário formado e a produção de ácido láctico na saliva de crianças escolares. Além disso, a goma contendo xilitol foi capaz de reduzir a proporção de *S. mutans* na saliva, ao contrário da goma contendo sorbitol/maltitol.

Holgerson et al. (2006) observaram elevação do pH do biofilme interdentário após a mastigação de gomas sem xilitol (CTR), contendo 2,0 g de xilitol (LX) e contendo 6,0 g de xilitol (HX) por 11 crianças saudáveis com idades entre 10 e 15 anos, que fizeram uso diário de 4,0 g de xilitol duas semanas antes dos períodos experimentais. Os efeitos de elevação do pH foram maiores no grupo HX, estatisticamente diferente do grupo CTR, 5 min após o processo de mastigação. Quando um bochecho subsequente com sacarose 10% foi realizado após o processo de mastigação, uma queda do pH foi observada em todos os grupos, embora menos pronunciada no grupo HX. Após 5 min do final da mastigação, uma diferença estatisticamente significativa foi observada entre os valores de pH dos grupos HX e LX. Em nenhum dos grupos foram observadas diferenças entre os níveis de *S. mutans* na saliva após a utilização das gomas de mascar. Estes

resultados sugerem que consumidores habituais de xilitol podem se beneficiar, por um curto período de tempo, da utilização de gomas de mascar contendo altas quantidades do açúcar.

Twetman e Stecksén-Blicks (2003) realizaram um estudo cruzado prospectivo para avaliar a concentração de ácido láctico proveniente de amostras de biofilme dentário supragengival de crianças pré-escolares com presença de lesões de cárie ativa em dentina, após o uso de três vezes ao dia de gomas de mascar contendo xilitol (5,0 g ao dia) ou sorbitol, durante 14 dias. Os resultados evidenciaram uma redução significativa (22%) na concentração de ácido láctico após o uso de gomas de mascar contendo xilitol, diferente do que ocorreu após a utilização de gomas de mascar contendo sorbitol, onde a concentração do ácido láctico permaneceu inalterada. Os níveis de estreptococos do grupo mutans não foram afetados em ambos os grupos após os períodos experimentais. Portanto, gomas de mascar contendo xilitol podem diminuir a formação de ácido láctico no biofilme dentário de crianças com lesões ativas de cárie.

Miake et al. (2003) utilizaram dois tipos de soluções remineralizadoras, contendo (1) ou não contendo (2) xilitol 20%, sobre superfícies de esmalte artificialmente desmineralizadas, com o intuito de observar a influência do açúcar nos processos de remineralização de superfícies não afetadas pela atividade microbiana. Os graus de remineralização observados nas camadas médias e profundas das superfícies de esmalte foram estatisticamente melhores quando as mesmas foram expostas à solução remineralizadora contendo xilitol. Já na camada mais externa do esmalte, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos. Estes resultados sugerem que o xilitol seja capaz de facilitar o movimento e acesso de íons cálcio até as camadas mais profundas do esmalte, induzindo sua remineralização.

Suda et al. (2006) estudaram a capacidade de remineralização *in situ* de lesões artificiais em blocos de esmalte, pela utilização de gomas de mascar contendo xilitol associado ou não ao lactato de cálcio. Os blocos previamente desmineralizados foram fixados em aparelhos acrílicos utilizados por 10 voluntários. Em cada um dos três períodos experimentais, os indivíduos obedeceram às recomendações específicas de utilizarem (fase teste) ou não (fase controle) dois tabletes de gomas de mascar contendo xilitol (2,5 g em cada tablete) associado (teste 1) ou não (teste 2) ao lactato de cálcio (94 mg em cada tablete), quatro vezes

ao dia durante duas semanas. A média do grau de remineralização dos blocos de esmalte foi maior após o uso das gomas de mascar contendo xilitol associado ao lactato de cálcio ($0,46 \pm 0,10$) quando comparada ao não uso de gomas de mascar ($0,16 \pm 0,14$) ou ao uso de gomas contendo apenas xilitol ($0,33 \pm 0,10$). Portanto, o consumo de gomas de mascar contendo xilitol associado ao lactato de cálcio pode melhorar o processo de remineralização da superfície do esmalte.

O consumo de xilitol por longos períodos de tempo pode levar à seleção de *S. mutans* resistentes. O fato de a quantidade formada de biofilme dentário ser reduzida após a utilização de produtos contendo xilitol pode ser considerado um fenômeno transitório. Haresaku et al. (2007) observaram uma menor quantidade de biofilme sobre as estruturas dentárias de pacientes que utilizaram gomas de mascar contendo xilitol durante 4-14 dias. Porém, no mesmo estudo, após a utilização da goma pelo período de seis meses, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na quantidade formada de biofilme entre o baseline e o final do período experimental. Segundo Trahan et al. (1992) e Tanzer et al. (2006), bactérias expostas por longos períodos ao xilitol tornam-se menos aderentes, sendo facilmente destacadas da superfície dentária e eliminadas do ambiente bucal pela saliva.

2.5 Estudos clínicos sobre a utilização do xilitol na prevenção da cárie dentária

Ainda são poucos os estudos clínicos randomizados que se preocuparam em avaliar a verdadeira eficiência do xilitol para a prevenção de cárie dentária. A definição sobre os melhores veículos para entrega do açúcar, as doses mínimas necessárias para se alcançar a prevenção de doenças, a frequência de utilização e os grupos de indivíduos aos quais o xilitol deve ser oferecido, ainda dependem da realização de inúmeros estudos clínicos e laboratoriais, os quais subsidiarão protocolos pautados em evidências científicas.

Atualmente, a forma considerada ideal para prevenir cárie dentária por meio da utilização de xilitol é pela administração diária de 4 a 12 g do açúcar através da distribuição de gomas de mascar em quatro períodos distintos do dia (PELDYAK,

MÄKINEN, 2002). Porém, estudos já obtiveram resultados satisfatórios através da adoção de outros parâmetros clínicos. Honkala et al. (2006) administraram doces contendo xilitol enquanto Kovari et al. (2003) ofereceram aos voluntários apenas 2,5 g do poliol divididos em três sessões diárias. Os protocolos de ambos os estudos mostraram-se eficientes para a prevenção de cárie dentária.

Kandelman e Gagnon (1990) observaram a incidência e progressão da cárie dentária em 274 crianças com idades entre 8 e 9 anos, de baixo nível socioeconômico e altos índices de cárie. As crianças foram divididas em três grupos: xilitol 15% (três vezes, totalizando 0,9 g ao dia), xilitol 65% (três vezes, totalizando 3,3 g ao dia) e grupo controle (não usou goma de mascar). Crianças que receberam gomas de mascar tiveram uma menor progressão das lesões de cárie quando comparadas às pertencentes ao grupo controle, após 24 meses de acompanhamento clínico. O incremento do índice CPOS foi de 2,24 nos grupos xilitol e de 6,06 no grupo controle. Os dois grupos xilitol (15% e 65%) não apresentaram diferenças significativas. Os pesquisadores esperavam observar resultados diferentes, como uma maior redução dos níveis de cárie dentária entre os participantes do grupo xilitol 65% em relação aos participantes do grupo xilitol 15%, já que a ingestão diária de 0,9 g de xilitol pode ser considerada extremamente baixa para alcançar resultados satisfatórios sobre o controle da cárie dentária.

Mäkinen et al. (1995) realizaram um estudo duplo-cego coorte em Belize, com a participação de 1277 crianças, com idade média de 10,2 anos, que foram divididas em nove grupos, de acordo com o tipo de goma de mascar a ser utilizada: um grupo controle, quatro grupos xilitol (4,3 a 9,0 g/dia), dois grupos xilitol-sorbitol (8,0 ou 9,7 g/dia), um grupo sorbitol (9,0 g/dia) e um grupo sacarose (9,0 g/dia). Os resultados demonstraram uma redução significativa nos níveis de cárie dentária para os grupos sorbitol, xilitol e xilitol-sorbitol quando comparados com o grupo controle. O grupo xilitol foi o que apresentou os melhores resultados preventivos. O grupo sacarose apresentou um aumento significativo nos níveis de cárie dentária em relação ao grupo controle. Estes resultados podem sugerir que o uso sistemático de gomas de mascar contendo polióis é capaz de reduzir a proporção de lesões de cárie dentária em crianças, sendo que o xilitol deve ser mais efetivo que o sorbitol.

Kovari et al. (2003) avaliaram o efeito de uma goma de mascar contendo xilitol na prevenção da cárie dentária em 921 crianças cuidadas em creches da cidade de Savonlinna, Finlândia. As crianças foram divididas em dois

grupos: xilitol (gomas de mascar três vezes ao dia, totalizando 2,5 g do açúcar) e escovação (uma vez, logo após o almoço). O grupo xilitol apresentou um número significativamente maior de crianças livres de cárie quando comparado ao grupo escovação. Além disso, aos nove anos de idade, um menor índice CPOD foi observado entre as crianças pertencentes ao grupo xilitol em relação ao grupo escovação. Estes achados permitem concluir que o xilitol pode ser recomendado, principalmente quando não existe a possibilidade de supervisão da escovação.

O estudo de Machiulskiene et al. (2001) não encontrou relação entre a utilização de polióis contidos em gomas de mascar e a diminuição dos índices de cárie dentária em 432 crianças com idades entre 9 e 14 anos, acompanhadas durante 3 anos. O índice CPOD dos grupos de crianças foram os seguintes: goma controle (8,3), sorbitol (9,0), xilitol (8,1), sorbitol/carbamida (11,8) e sem uso de goma de mascar (12,4). Os resultados dos grupos goma controle, sorbitol e xilitol foram estatisticamente semelhantes entre si e diferentes dos grupos sorbitol/carbamida e sem uso de goma de mascar. Os autores concluíram que os índices CPOD foram reduzidos pela ação da remoção mecânica do biofilme dentário, já que os resultados dos grupos que utilizaram gomas contendo polióis não foram diferentes dos observados no grupo que utilizou goma controle. Durante a pesquisa, as crianças dos grupos xilitol e sorbitol deveriam ingerir uma dose diária mínima de aproximadamente 3,0 g do açúcar determinado, logo após as refeições. A dose um pouco abaixo do valor mínimo recomendado para a prevenção de cárie dentária pode ter sido um dos fatores contribuintes para a não obtenção de resultados positivos. Além disso, trabalhos clínicos longitudinais não conseguem averiguar *in loco* a contribuição do sujeito da pesquisa em relação ao cumprimento do protocolo determinado previamente pelos pesquisadores.

A capacidade em prevenir cárie dentária pelo xilitol introduzido em dentifrícios também já foi testada. Sintes et al. (2002) acompanharam durante 30 meses, 2539 crianças com idades entre 7 e 12 anos, as quais utilizavam um dentifrício contendo 1100 ppm de flúor associado (grupo 1) ou não (grupo 2) a uma concentração de 10% de xilitol. O índice CPOS registrou um aumento de 1,30 no grupo 1 e 1,51 no grupo 2, enquanto que o índice CPOD aumentou 0,69 no grupo 1 e 0,81 no grupo 2.

Em ambos os casos foram observadas diferenças estatisticamente significativas. Portanto, o acréscimo de xilitol na concentração de 10% ao dentifrício foi capaz de melhorar a capacidade preventiva contra a cárie dentária.

Honkala et al. (2006) testaram a eficácia de doces contendo 49% de xilitol na prevenção de cárie dentária em 145 estudantes com necessidades especiais. Enfermeiras treinadas distribuíram doces contendo xilitol aos alunos, três vezes ao dia, durante 18 meses. Ao final do estudo, o grupo que consumiu doces contendo xilitol teve seus índices CPOD e CPOS diminuídos significativamente em relação ao baseline. Ao contrário, os mesmos índices aumentaram no grupo controle. A diminuição dos índices CPOD e CPOS no grupo que consumiu xilitol ocorreu devido à paralisação de 212 superfícies dentárias cavitadas no momento do *baseline*. Este efeito foi observado em apenas uma superfície dentária do grupo controle. Portanto, o uso regular de doces contendo xilitol apresentou um significativo efeito preventivo e remineralizador em lesões de cárie de indivíduos com necessidades especiais.

A maioria das crianças parece adquirir *S. mutans* e *S. sobrinus* de suas mães, através do contato salivar durante o irrompimento dos dentes decíduos (CAULFIELD et al., 1993). Quanto mais precoce a aquisição de bactérias cariogênicas pela criança, maiores serão as chances do desenvolvimento da cárie dentária (KÖHLER et al., 1988). Isokangas et al. (2000) analisaram a experiência de cárie de 143 crianças, aos 5 anos de idade, filhos de mães submetidas à terapia antimicrobiana com utilização de (1) xilitol (6-7 g diárias, em gomas de mascar), (2) clorexidina (três tratamentos com verniz) ou (3) fluoreto (três tratamentos com verniz). As mães pertencentes ao grupo (1) utilizaram gomas de mascar do sétimo mês de gestação até o segundo aniversário da criança. Já as mães pertencentes aos grupos (2) e (3) receberam seus respectivos tratamentos 6, 12 e 18 meses após o nascimento de seus filhos. Aos 2 anos de idade, as crianças foram submetidas a exames clínicos e microbiológicos. Os resultados mostraram que crianças colonizadas por estreptococos do grupo mutans aos dois anos de idade apresentam 3,6 vezes mais chance de desenvolver lesões de cárie dentária quando comparadas com aquelas não colonizadas. Os riscos para o desenvolvimento de cárie dentária não foram estatisticamente diferentes entre os grupos. Aos 5 anos de idade, o grupo xilitol apresentou experiência de cárie significativamente menor que os demais grupos. Pode-se concluir que o uso materno de gomas de mascar contendo xilitol é

capaz de impedir a transmissão de estreptococos do grupo mutans de mãe para filho e prevenir o aparecimento de lesões de cárie dentária nas crianças.

Söderling et al. (2000) também estudaram a relação entre o consumo de gomas de mascar contendo xilitol pelas mães e a diminuição da transmissibilidade de estreptococos do grupo mutans (MS) para os respectivos filhos. As mães pertencentes ao grupo xilitol consumiram gomas de mascar 2 a 3 vezes ao dia, a partir do terceiro mês de vida de seus filhos. A quantidade de xilitol ingerida variou durante o estudo, apresentando uma tendência de menor ingestão com o passar do tempo. As mães pertencentes aos grupos clorexidina e fluoreto receberam aplicações de vernizes contendo as substâncias mencionadas 6, 12 e 18 meses após o nascimento de seu filho. A microbiota das mães foi analisada através da coleta de saliva a cada seis meses, até o período de 24 meses. A microbiota das crianças foi analisada aos 12 e aos 24 meses, pela coleta de biofilme dentário. Após dois anos de estudo, 9,7% das crianças cujas mães receberam gomas de mascar contendo xilitol, 28,6% dos filhos de mães tratadas com verniz de clorexidina e 48,5% das crianças cujas mães foram tratadas com verniz fluoretado apresentavam níveis detectáveis de MS. Portanto, o consumo habitual de xilitol pelas mães diminuiu os índices de transmissibilidade de MS para seus respectivos filhos. Estes resultados são concordantes com o estudo de Thorild et al. (2003), que utilizaram gomas de mascar contendo xilitol, clorexidina/xilitol ou fluoreto durante 18 meses para prevenir a transmissibilidade de MS.

2.6 Dose ideal de xilitol a ser utilizada e efeito dose-resposta

Não existe consenso na literatura a respeito da dose mínima eficaz e dos efeitos dose-resposta do xilitol na prevenção da cárie dentária. Segundo Peldyak e Mäkinen (2002) a forma considerada ideal para prevenir cárie dentária por meio da utilização de xilitol é pela administração diária de 4 a 12 g do açúcar através da distribuição de gomas de mascar em quatro períodos distintos do dia. Porém, alguns estudos já obtiveram resultados satisfatórios através da utilização de doses bem mais baixas (KANDELMAN et al., 1990; PENG et al., 2004).

Kandelman e Gagnon (1990) observaram um menor incremento do índice CPOS entre crianças que consumiram 0,8 g ou 3,4 g de xilitol por dia, em relação àquelas que não fizeram uso do açúcar, sem, porém, serem observadas diferenças estatisticamente significativas entre o consumo de diferentes doses de xilitol. Já os resultados de Mäkinen et al. (1995) permitiram estabelecer uma relação linear positiva entre o aumento das doses consumidas de xilitol (4,3 g a 9,0 g/dia) e a diminuição do incremento de novas lesões de cárie dentária, através do uso de gomas de mascar contendo o açúcar.

Após 30 meses de estudo, Sintès et al. (2002) observaram que o uso de dentifrício contendo 10% de xilitol associado a 1100 ppm de flúor, duas vezes ao dia, foi capaz de diminuir o incremento do índice COS em relação às crianças que utilizaram dentifrício contendo apenas 1100 ppm de flúor.

A associação do uso do xilitol com outros polióis também pode interferir na relação dose-resposta. Peng et al. (2004) conseguiram observar uma diminuição significativa nos índices CPOS de crianças que consumiram uma mistura de 0,14 g de xilitol, 1,78 g de sorbitol e 0,01 g de carbamida por dia, através da utilização de gomas de mascar.

Machiulskiene et al. (2001) não observaram diferenças significativas no incremento dos índices CPOS de crianças que consumiram 2,95 g de xilitol ou sorbitol por dia, em relação àquelas crianças que utilizaram gomas sem adição de polióis. Stecksén-Blicks et al. (2008) também não observaram diferenças estatisticamente significativas entre os valores de incremento do índice CPOS dos grupos que consumiram gomas de mascar contendo 2,5 g de xilitol, associado ou não a 1,5 mg de flúor, e o grupo controle, que não utilizou gomas de mascar. Contrariamente, Kovari et al. (28), utilizando-se do mesmo protocolo do estudo anterior, obtiveram resultados favoráveis ao uso do xilitol para prevenção de cárie dentária.

Mesmo quando os parâmetros clínicos adotados envolvem respostas laboratoriais, como a interferência na contagem de estreptococos mutans e potencial acidogênico do biofilme dentário, não há consenso sobre o efeito dose-resposta do xilitol. Lif Holgersson et al. (2005) observaram aumento significativo de pH do biofilme interdentário, na ausência ou presença de sacarose, até 5 min após a mastigação de gomas de mascar contendo 6,0 g de xilitol. Quando uma dose de 2,0 g de xilitol foi ingerida antes do consumo de sacarose, o potencial acidogênico do biofilme dentário

foi maior que aquele observado no grupo controle, que mastigou gomas de parafina. Já em outro estudo do mesmo grupo de pesquisas (HOLGERSON et al., 2007), a produção de ácido láctico diminuiu, mas não foi diferente entre o grupo que consumiu gomas de mascar contendo 6,18 g de xilitol e aquele que consumiu gomas contendo uma associação de 4,14 g de sorbitol e 0,3 g de carbamida.

Milgrom et al. (2006) observaram que uma dose igual a 3,44 g/dia de xilitol não foi capaz de reduzir o número de EGM em relação ao *baseline*. Ao contrário, uma dose de 6,88 g do açúcar foi bastante eficiente na redução da contagem dessas bactérias. Porém, quando a dose ingerida foi de 10,32 g/dia de xilitol, não foi observada maior diminuição de EGM em relação à dose de 6,88 g/dia, sugerindo um efeito *plateau*.

Isotupa et al. (1995) observaram uma diminuição significativa de *S. mutans* no biofilme dentário e na saliva de crianças que utilizaram 10,5 g de xilitol ou uma associação de 9,72 g de xilitol e 2,46 g de sorbitol por dia, durante 4 semanas. Além disso, uma dose diária menor de xilitol (7,29 g) associada a 4,76 g de sorbitol não foi capaz de diminuir a contagem de *S. mutans* em relação ao *baseline*, ao contrário do observado no estudo de Milgrom et al. (2006). Isso pode ser explicado pela presença de uma proporção maior de bactérias capazes de realizar o aproveitamento energético do sorbitol em relação ao xilitol (13).

Entretanto, Ly et al. (2008) não observaram diferenças significativas na contagem de *S. mutans* e *S. sobrinus* entre os grupos que consumiram xilitol (15,6 g ou 11,7 g/dia) e maltitol (44,7 g/dia), apesar de constatarem redução do número dessas bactérias em todos os grupos, após a utilização dos polióis.

Scheie et al. (1998) não observaram qualquer alteração nos níveis de formação de biofilme dentário, potencial acidogênico e perfil glicolítico entre adultos jovens que consumiram 4,0 g de xilitol por dia, contidos em gomas de mascar, e aqueles que consumiram gomas contendo sacarose.

2.7 Veículos e frequências ideais de utilização do xilitol

O veículo de administração é um dos fatores preponderantes no sucesso de técnicas que envolvam a utilização de drogas e/ou qualquer tipo de substância química para tratamento ou prevenção de doenças. Estes veículos devem permitir a entrega da substância química em seu local de ação determinado e propiciar um aproveitamento máximo de biodisponibilidade, com maior conforto e praticidade, permitindo a ampliação do grau de comprometimento do paciente e, conseqüentemente, possibilitando a obtenção de resultados positivos.

Para que o xilitol tenha a capacidade de exercer qualquer efeito sobre a prevenção da cárie dentária, os produtos que o contêm devem propiciar concentrações salivares adequadas do açúcar pelo maior tempo possível após a sua utilização. Lif Holgerson et al. (2006) observaram que o consumo de gomas de mascar contendo 1,32 g de xilitol e a utilização de 10 mL (mililitros) de solução contendo 1,0 g do açúcar foram capazes de aumentar significativamente os níveis de xilitol na saliva por até 16 min. Tabletes, balas e dentifrício também foram capazes de liberar o açúcar em quantidade detectável, porém por até 8 min após o consumo. Tapiainen et al. (2002) observaram concentrações salivares iguais ou superiores a 1% do açúcar até 15 min após a utilização de gomas de mascar (1,68 g) e até 10 min após o uso de 5 mL de solução contendo 2,0 g de xilitol.

A maioria dos estudos clínicos que objetivaram estudar a influência do xilitol sobre a acidogenicidade do biofilme dentário, diminuição da contagem de *S. mutans* e prevenção do desenvolvimento de novas lesões de cárie dentária utilizou a goma de mascar como veículo de administração (MACHIULSKIENE et al., 2001; KANDELMAN et al., 1990; PENG et al., 2004; MÄKINEN et al., 1995; LIF HOLGERSON et al., 2005; HOLGERSON et al., 2007; ISOTUPA et al., 1995; SCHEIE et al., 1998; HARESAKU et al., 2007; HUJOEL et al., 1999). Isso se deve à crença de que maiores concentrações salivares de xilitol são obtidas após a utilização deste veículo em relação aos outros estudados. Adicionalmente, as gomas de mascar providenciam estímulo salivar, fator extremamente importante para aumentar a capacidade tampão da saliva e contribuir para o processo de remineralização dos tecidos dentários. Mickenautsch et al. (2007) evidenciaram o efeito anticariogênico produzido pelo consumo de gomas de mascar livres de açúcares fermentáveis, independentemente da utilização de xilitol ou sorbitol.

A maioria dos estudos que utilizaram gomas de mascar como veículos de administração do xilitol obteve resultados positivos em relação ao controle de fatores de risco ou prevenção da cárie dentária (KANDELMAN & GAGNON, 1990; PENG et al., 2004; MÄKINEN et al., 1995; LIF HOLGERSON et al., 2005; MILGROM et al., 2006; ISOTUPA et al., 1995; SCHEIE et al., 1998; HARESAKU et al. 2007; HUJOEL et al, 1999). Porém, a ausência de um grupo controle que consumiu gomas de mascar sem adição de qualquer tipo de açúcar foi representativa entre tais estudos. Ao contrário, a inclusão de um grupo controle que utilizou gomas de parafina foi comum no desenho metodológico das pesquisas que não conseguiram apontar resultados favoráveis na utilização do xilitol para o controle de fatores de risco ou prevenção da doença (MACHIULSKIENE et al, 2001; SCHEIE et al., 1998). A impossibilidade de se evidenciar com clareza a influência do estímulo salivar produzido pela mastigação das gomas pode interferir sobremaneira nos resultados alcançados, o que impossibilita afirmar categoricamente que o xilitol age ativamente na prevenção da cárie dentária quando administrado por este veículo.

O uso da goma de mascar impede o acesso de grupos de pacientes de tenra idade ao xilitol e aos seus eventuais benefícios de atraso da aquisição de uma microbiota bucal patogênica. Além disso, a frequência diária com que o paciente deve utilizar as gomas de mascar (3-6 vezes/dia) (MACHIULSKIENE et al., 2001; KANDELMAN & GAGNON, 1990; PENG et al., 2004; MÄKINEN et al., 1995; LIF HOLGERSON et al., 2005; MILGROM et al., 2006; ISOTUPA et al., 1995; SCHEIE et al., 1998; HARESAKU et al., 2007; HUJOEL et al., 1999) é considerada desconfortável pelos próprios pesquisadores (MILGROM et al., 2006).

Outros veículos de administração do xilitol já foram utilizados em estudos clínicos, tais como: chupetas perfuradas, balas, tabletes, dentifrícios, enxaguatórios, balas de goma e pastilhas. Coincidentemente, a maioria deles também estimula a produção mecânica de saliva durante a sua utilização, tanto pela sucção, mastigação e/ou bochecho. A eficiência de tais veículos no controle de *Streptococcus mutans* e na prevenção da cárie dentária deve ser melhor investigada, já que poucos são os estudos com esta preocupação (SINTES et al.,

2002; STECKSÉN-BLICKS et al., 2008; LY et al., 2008; AALTONEN et al., 2000; HONKALA et al., 2006).

Resultados benéficos em relação à prevenção da aquisição precoce de *Streptococcus mutans* e desenvolvimento de novas lesões de cárie dentária foram obtidos após a administração de 0,25 mg de fluoreto de sódio associado a 159 mg de xilitol e 153 mg de sorbitol por dia, através de comprimidos introduzidos no interior de chupetas perfuradas (AALTONEN et al., 2000). Esse dispositivo pode ser utilizado em momentos de mais baixo fluxo salivar, durante o sono, por crianças de tenra idade. Além disso, pode permitir uma liberação mais lenta e gradual do açúcar.

Não há um consenso sobre a efetividade da utilização de dentifrícios, balas e/ou pastilhas contendo xilitol na prevenção da cárie dentária. Enquanto o consumo de 2,5 g de xilitol por dia, através do uso de pastilhas, falhou em provar a influência do açúcar sobre a diminuição do incremento do índice CPOS de crianças (STECKSÉN-BLICKS et al., 2008), o consumo de 10% de xilitol associado a 1100 ppm de flúor, contido em um dentifrício, foi capaz de reduzir significativamente o número de novas superfícies cariadas e restauradas em relação ao grupo controle, que utilizou dentifrício contendo 1100 ppm de flúor (SINTES et al., 2002). Honkala et al. (2006) também constataram que os índices CPOD e CPOS foram diminuídos entre deficientes físicos que consumiram balas contendo xilitol (49%) devido à paralisação da progressão das lesões de cárie observadas durante o *baseline* em 212 superfícies dentárias.

O consumo superior a 10 g/dia de xilitol, através do uso de balas de goma, não foi mais eficiente na redução da contagem de *S. mutans* e *S. sobrinus* que o maltitol (44,7 g/dia) (33). O consumo de eritritol (7,0 g) também foi tão eficiente quanto o de xilitol (7,0 g) na redução da contagem de *Streptococcus mutans* no biofilme dentário e na saliva de adolescentes após o uso de tabletes mastigáveis associados a dentifrícios contendo os polióis específicos (Mäkinen et al., 2005).

Poucos são os estudos que se preocuparam em estudar o papel da frequência de ingestão do xilitol sobre a prevenção da cárie dentária (LY et al., 2006; ISOKANGAS et al., 1987; REKOLA et al., 1989). Isokangas (1987) observou que apenas quando os indivíduos utilizavam gomas de mascar contendo o açúcar por pelo menos três vezes ao dia, efeitos preventivos poderiam ser alcançados. Rekola (1989) obteve a redução do incremento do índice CPOS com o aumento da frequência de administração de xilitol contido em gomas de mascar. Ly et al. (2006)

verificaram uma redução linear dos níveis de *Streptococcus mutans* no biofilme dentário e na saliva com o aumento da frequência de consumo do xilitol. Além disso, quando uma mesma dose do açúcar (10,32 g) foi distribuída em apenas duas vezes por dia, a contagem de bactérias não foi alterada em relação ao grupo controle. Embora o padrão de resultados sobre este parâmetro clínico pareça ser homogêneo, o número de estudos relevantes ainda é muito pequeno para propiciar um alto grau de evidência científica.

Em virtude do exposto, torna-se necessário desenvolver e avaliar outros veículos e protocolos clínicos de aplicação para o xilitol. Recentemente, foi desenvolvido um verniz contendo xilitol para prevenção de cárie dentária. Vernizes contendo duas concentrações de xilitol (10 e 20%) foram testados em relação à liberação de xilitol em saliva artificial. Durante todo o período de análise (72 h) foi observada liberação de xilitol pelos vernizes utilizados nos grupos G1 e G2. Além disso, os grupos G1 e G2 apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação à liberação de xilitol nos diferentes intervalos de tempo (Tabela 1) (Pereira et al., 2010). Apesar dos resultados aparentemente favoráveis, torna-se necessário testar a liberação de xilitol dos vernizes em condições clínicas, na presença de fluxo salivar, bem como avaliar se o xilitol liberado a partir deste veículo é capaz de exercer um efeito no processo de formação e acúmulo do biofilme dentário.

Tabela 1 - Média ($\pm$ DP) dos valores de concentração de xilitol em mg/L liberados pelos grupos G1 (verniz contendo xilitol a 10%) e G2 (verniz contendo xilitol a 20%) nos diferentes tempos.

Tempo	G1^A	G2^B
1 h	63,42 $\pm$ 2,71 ^a	168,96 $\pm$ 1,53 ^a
8 h	69,52 $\pm$ 4,04 ^a	164,22 $\pm$ 0,77 ^b
12 h	56,92 $\pm$ 5,94 ^b	29,90 $\pm$ 3,68 ^c
16 h	49,70 $\pm$ 7,16 ^c	18,52 $\pm$ 2,24 ^e
24 h	49,40 $\pm$ 3,78 ^c	19,76 $\pm$ 1,89 ^e
48 h	55,52 $\pm$ 2,11 ^{bc}	24,20 $\pm$ 0,57 ^d
72 h	32,66 $\pm$ 0,87 ^d	12,72 $\pm$ 0,35 ^f

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

3 Proposição

3 PROPOSIÇÃO

O presente estudo foi teve como objetivo geral avaliar os efeitos de um verniz contendo xilitol sobre estreptococos do grupo mutans, bem como o mecanismo de ação do poliol sobre estas bactérias. Foi dividido em quatro etapas, que tiveram como objetivos específicos:

1ª etapa:

- Verificar a liberação de xilitol na saliva de humanos ao longo do tempo após a aplicação de verniz contendo 10% e 20% de xilitol;

2ª etapa:

- Verificar a influência de um verniz contendo 20% de xilitol na contagem de estreptococos do grupo mutans provenientes do biofilme dentário de crianças;

3ª etapa:

- Analisar a ultra-estrutura de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* após tratamento com solução de xilitol 20%;

4ª etapa:

- Avaliar a capacidade do xilitol e do flúor em promover estresse ao *Streptococcus mutans* UA 159 com deleção do gene VicK.

Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi devidamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo (processo nº 126/2007, Anexo A).

4.1 Primeira Etapa

4.1.1 Caracterização da amostra

Participaram desta etapa 10 indivíduos de ambos os gêneros, com idades entre 20 e 30 anos (idade média 24 anos e 3 meses, $DP \pm 2,75$), que aceitaram participar voluntariamente da pesquisa, assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Os voluntários possuíam características de saúde sistêmica satisfatória, não se utilizavam de qualquer tratamento medicamentoso e não faziam uso de aparelhos ortodônticos

4.1.2 Aplicação dos vernizes

Nesta etapa, foram utilizados três tipos de vernizes: controle (sem xilitol), contendo 10% de xilitol ou contendo 20% de xilitol. Estes vernizes foram idealizados pelos pesquisadores e elaborados pela indústria FGM® - Produtos Odontológicos. Estes veículos foram previamente testados em estudo *in vitro*, o qual demonstrou liberação do açúcar pelo período de 72 horas (PEREIRA et al., 2010). A composição básica dos vernizes inclui colofônia (resina formadora de filme), resina sintética (formador de filme), polímero espessante (para o ajuste de viscosidade), essência, adoçante artificial, etanol (solvente) e xilitol nas concentrações já descritas.

Os vernizes foram aplicados nos voluntários pelo período da manhã sob isolamento relativo com utilização de rolos de algodão. A quantidade total de verniz utilizada foi de aproximadamente 32 mg, padronizada previamente em estudo piloto,

aplicada com utilização de *microbrush* descartável nos incisivos centrais e laterais superiores e inferiores. O isolamento relativo foi mantido até a secagem do verniz.

Posteriormente, os voluntários permaneceram 8 horas sem ingerir alimentos ou líquidos sem utilização de canudos, além de não terem realizado escovação dentária.

4.1.3 Coleta de saliva

Durante a primeira etapa do estudo, os voluntários receberam um béquer de vidro estéril para a coleta não estimulada de saliva total expectorada durante 5 min, para que pudesse ser feita a análise da concentração salivar de xilitol após 5 min, 10 min, 15 min, 30 min, 1 h, 1 h e 30 min, 2 h, 4 h e 8 h da aplicação dos vernizes contendo ou não o açúcar. Foram pipetados do béquer aproximadamente 1.000 µL da saliva de cada indivíduo, os quais foram armazenados em tubos de microcentrifuga estéreis, e imediatamente estocados em freezer a -20°C , até o momento da sua utilização. Cada indivíduo recebeu a aplicação dos três tipos de verniz (controle, contendo 10% de xilitol e contendo 20% de xilitol) em diferentes períodos (intervalo de 1 semana entre uma aplicação e outra), caracterizando um estudo cruzado.

A **B** **C** **D** **E** **F** **G**

Figura 1 - (A) Vernizes utilizados na pesquisa, desenvolvidos em parceria com a empresa FGM/Brasil. (B) Aplicação dos vernizes sobre os incisivos centrais e laterais superiores e inferiores de cada voluntário. (C) Tubos de microcentrifuga contendo amostras salivares coletadas em diferentes tempos. (D) Centrífuga 5417 R utilizada para adequação das amostras salivares, previamente à análise colorimétrica. (E) Kit enzimático Boehringer-Mannheim. (F) Micro placa contendo amostras salivares após reação com o kit enzimático. (G) Leitura das absorbâncias no equipamento Bio Rad 680.

4.1.4 Análise da concentração salivar de xilitol

Inicialmente foi feita centrifugação das amostras de saliva a 15 000 RPM por 8 min (Centrifuge 5417 C/R, Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha). Para a quantificação da liberação de xilitol em cada amostra, foi utilizado o kit enzimático D-Sorbitol/Xylitol, Boehringer Mannheim, R-Biopharm. O presente kit contém: uma solução de 25 mL (fosfato de potássio/ trietanolamina; Triton X-100), três frascos de 35 mg (diaforase, nicotinamida adenina dinucleotídeo/NAD), uma solução de cloreto de iodonitrotetrazolio/INT, três frascos contendo sorbitol desidrogenase/SDH e um frasco de solução controle D-sorbitol. A análise foi feita pelo método colorimétrico, utilizando o leitor de microplaca Bio Rad 680 (Bio-Rad Laboratories, USA).

Um volume de 6 µL de saliva de cada voluntário foi utilizado para a análise da concentração salivar de xilitol, em duplicata. As concentrações dos reagentes do kit enzimático D-Sorbitol/Xylitol foram utilizadas de acordo com as instruções do fabricante. Depois de obtidos os resultados em absorbância (492 nm), uma equação determinada pelo fabricante do kit enzimático foi utilizada para a conversão dos valores em concentração de xilitol em g/L:

$$C = \frac{V \times MW}{E \times v \times 1000} \times A \text{ [g/L]}$$

onde: C= concentração pesquisada; V= volume final [mL]; v= volume da amostra [mL]; MW= peso molecular do xilitol [g/mol]; E= coeficiente: 19,9 [l x mmol x cm]; A= Absorbância a 492 nm.

4.2 Segunda Etapa

4.2.1 Caracterização da amostra

A amostra aleatória foi constituída por 67 crianças na faixa etária de 63 a 143 meses de idade (idade média = 107,7 meses; DP= 20,9) de ambos os gêneros.

Os pais e/ou responsáveis legais foram informados por escrito e verbalmente através de explicação detalhada sobre os objetivos e procedimentos

que foram realizados durante o estudo. Somente as crianças que apresentaram a permissão expressa dos pais e/ou responsáveis legais participaram da pesquisa.

As crianças da amostra preencheram os seguintes requisitos (ERNST et al., 2005; MILGROM et al., 2006; PARASKEVAS, 2005; SOET, 2005):

1. Possuir uma quantidade maior ou igual a 10^4 UFC/mg de estreptococos do grupo mutans no biofilme dentário coletado;
2. Características de saúde sistêmica satisfatórias;
3. Não ter feito uso de antibióticos ou antiinflamatórios não esteroidais até um mês antes ou durante a realização do estudo;
4. Não utilizar quaisquer outras formas de controle químico do biofilme dentário durante o período do estudo;
5. Não ser usuário de aparelhos ortodônticos ou próteses;
6. Não apresentar lesões bucais, cálculo supragengival e maloclusão severa.

4.2.2 Aleatorização da amostra

O software Microsoft Excel 2003[®] foi responsável por alocar aleatoriamente os voluntários selecionados a dois grupos: G1, grupo verniz controle e G2, grupo verniz contendo 20% de xilitol, selecionado de acordo com os resultados obtidos na primeira etapa da pesquisa.

4.2.3 Aplicação dos vernizes

Nesta etapa, foram utilizados dois tipos de vernizes: controle (sem xilitol) e contendo 20% de xilitol (concentração selecionada pelos resultados obtidos na primeira etapa desse estudo). Estes veículos foram aplicados quatro vezes, sob isolamento relativo com utilização de rolos de algodão, em intervalos semanais e sempre no período da manhã (logo após o café da manhã fornecido pela escola). A quantidade total de verniz a ser utilizada foi de aproximadamente 32 mg, determinada previamente em estudo piloto, aplicada com utilização de *microbrush* descartável em um total de oito dentes anteriores decíduos ou permanentes, sendo

quatro superiores e quatro inferiores. O isolamento relativo foi mantido até a secagem do verniz utilizado. Posteriormente, a criança foi orientada a permanecer 2 h (tempo padronizado seguindo a rotina alimentar da escola) sem ingerir líquidos ou alimentos, além de não realizar escovação dentária durante o mesmo dia da aplicação do verniz.

4.2.4 Coleta do biofilme dentário e da saliva

O biofilme dentário foi coletado no início do estudo, para determinar a seleção da amostra, e 48 h após a última aplicação do verniz contendo ou não xilitol. O biofilme foi coletado do terço cervical das faces vestibulares de todos os dentes presentes na cavidade bucal com o auxílio de espátulas estéreis. Posteriormente, foi acondicionado em tubos de microcentrifuga previamente pesados, contendo 1,5 mL de solução salina tamponada.

4.2.5 Preparo da suspensão de biofilme dentário

O biofilme dentário coletado foi suspenso em 1,5 mL de solução salina tamponada, pH 7,4, em tubo de microcentrifuga estéril. Em seguida, os tubos contendo o biofilme dentário coletado foram novamente pesados, para determinar o peso do material coletado. Posteriormente, a suspensão de biofilme foi agitada em um agitador de tubos do tipo “mixer” (Thermolyne) durante 30 seg, para degradar as células bacterianas.

4.2.6 Diluição da suspensão de biofilme dentário

A partir da suspensão do biofilme dentário foram preparadas diluições decimais seriadas (10^{-1} a 10^{-4}), misturando-se 0,5 mL de suspensão de biofilme com 4,5 mL de solução salina tamponada esterilizada em tubo de ensaio 13 x 100 mm. Entre cada diluição, os tubos foram agitados no “mixer” (Thermolyne) durante 20 a 30 segundos.

4.2.7 Contagem de estreptococos do grupo mutans do biofilme dentário

4.2.7.1 Meio de cultura

Os meios de cultura utilizados para a contagem bacteriana de estreptococos totais e estreptococos do grupo mutans foram o ágar mitis salivarius (MS) e ágar mitis salivarius com bacitracina modificado pela adição de kanamicina (MSKB), respectivamente (ESTRELA; PIMENTA; ESTRELA, 2001; MILGROM et al., 2006). Roberts et al. (2002) observaram que o meio MSKB foi mais específico que o meio agar mitis salivarius com bacitracina (MSB) para o isolamento de estreptococos do grupo mutans.

Tais meios foram preparados a partir do meio base ágar mitis salivarius (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA), suplementado com 15% de sacarose e 1% de telurito de potássio. Para o preparo do meio MSKB, além dos componentes anteriormente citados, foram adicionadas bacitracina na concentração de 50 U/mL e kanamicina na concentração de 0,5 mg/mL (MILGROM et al., 2006). O meio foi autoclavado a 121 °C durante 15 min e em seguida resfriado em banho-maria a 45-50°C. Assepticamente, 0,5 mg/mL de kanamicina foram adicionados ao meio. O meio foi distribuído assepticamente em volumes de 15 a 20 mL para placas de Petri descartáveis 90 x 15 mm (Inlab, Diadema, SP). Após a solidificação, as placas foram incubadas em estufa, a 37°C, durante 24 horas, para realização do controle da esterilidade. O meio de cultura foi armazenado em refrigerador a 4°C, acondicionado em papel filme e utilizado até o sétimo dia após o preparo.

4.2.7.2 Preparo

4.2.7.2.1 Semeadura e Incubação

Para a determinação da contagem dos microorganismos, volumes de 0,02 mL das diluições 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} foram semeadas em duplicata na superfície de uma placa de Petri contendo o meio de cultura específico. As placas

foram incubadas na estufa a 37°C, durante 72 horas, em atmosfera de microaerofilia obtida pelo método da vela (GOMES; CAMPOS; TRABULSI, 1999).

4.2.7.2.2 Contagem de colônias

As contagens e identificação das colônias de estreptococos do grupo mutans foram feitas com o auxílio de um microscópio estereoscópico 60X (Carl Zeiss, Alemanha).

Colônias brancas com 0,5 a 1,0 mm de diâmetro, convexas, com aspecto rugoso, com ou sem a presença de uma gota na superfície, constituídas por cocos gram positivos em cadeias foram consideradas colônias típicas pertencentes aos *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*. Para a contagem das colônias de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*, foram consideradas as colônias típicas e aquelas que apresentaram um crescimento misto de cocos gram positivos e bacilos gram negativos ou positivos (HARDIE, 1986). Nenhum método de identificação bioquímica foi utilizado na contagem de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*.

Os dados foram convertidos em UFC/mg de suspensão de placa, multiplicando-se o número de colônias encontradas por 50 (correção para 1 mL) e pela recíproca da diluição.

4.3 Terceira etapa: Análise ultra-estrutural dos *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*

4.3.1 Meio de cultura

Colônias de *S. mutans* ATCC33478 e *S. sobrinus* ATCC 25175 cresceram planctonicamente no meio Brain Heart infusion (BHI), acrescido de 0,2% de sacarose.

Streptococcus mutans ATCC33478 e *Streptococcus sobrinus* ATCC 25175 cresceram aerobicamente a uma temperatura de 35°C em uma atmosfera 5% concentrada de CO₂ até uma densidade óptica de 0,3 – 0,4 em 650 nm. Um volume de 10 µL de um meio básico estéril contendo glicose (grupo GI) ou 20% de xilitol (grupo GII), de acordo com a concentração do verniz utilizado na segunda fase do estudo, foi adicionado a 1 mL da suspensão de bactérias durante 2 h. As cepas de

Streptococcus mutans e *Streptococcus sobrinus* foram avaliadas através da sua morfologia pela visualização das colônias utilizando um microscópio estereoscópico (TAPIAINEN et al., 2004).

4.3.2 Análise bacteriana em microscópio eletrônico de transmissão

As bactérias foram obtidas pela centrifugação de um volume de 1,5 mL (3000 rpm, 10 min) do meio básico. O precipitado bacteriano foi fixado durante a noite a uma temperatura de 4°C utilizando-se 1 mL de glutaraldeído a 2,5% em um tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,4. Posteriormente, foram lavadas três vezes em tampão cacodilato, fixadas em tetróxido de ósmio a 1%, desidratadas em álcool e acetona e embebidas em um meio epóxico de baixa viscosidade (Spurr's). Finas secções foram cortadas com utilização de um ultramicrotomo (Leica Ultracut UC2) e examinadas com um microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss EM 900) pertencente ao Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada à Pesquisa Agropecuária (NAP/MEPA) da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"-ESALQ/USP, sob responsabilidade do Prof. Dr. Elliot Watanabe Kitajima.

A proporção de bactérias com membrana e/ou parede celular danificadas foi calculada baseada em pelo menos 100 bactérias de cada grupo de estudo. Além disso, o diâmetro da bactéria e a espessura da cápsula polissacarídica e parede celular bacteriana foram analisadas em uma amostra de 30 bactérias do tipo *Streptococcus mutans* e 30 bactérias do tipo *Streptococcus sobrinus* de cada grupo de estudo.

4.4 Quarta etapa

A quarta etapa do estudo teve por objetivo avaliar a capacidade do xilitol e fluoreto de sódio em promover estresse às células planctônicas de *S. mutans* UA159 modificadas geneticamente (deleção do gene *VicK*)(Deng et al., 2007).

Nesta etapa, os procedimentos realizados foram similares aos descritos por Deng et al. (2007) e Deng et al. (2009). A atividade do sistema promotor *VicRK*

foi determinada pela expressão da proteína-informante verde fluorescente (GFP), após à exposição de *S. mutans* UA159 a estímulos geradores de estresse. Portanto, a ocorrência de transdução de sinal foi observada pela variação da fluorescência captada durante a citometria de fluxo. Todos os procedimentos desta etapa foram realizados nos laboratórios do Departamento de Cariologia, Endodontia e Periodontia do Academicsh Centrum Tandheelkunde Amsterdam (ACTA, Holanda) e no laboratório de Biologia Oral da Vrije Universiteit, sob orientação dos Profs. Drs. Wim Crielaard e Jacob M. ten Cate. Por questões logísticas, as bactérias utilizadas foram as mesmas desenvolvidas no estudo de Deng et al. (2007).

3.4.1 Atividade do gene promotor

Colônias informantes de *S. mutans* foram utilizadas para testar a resposta do promotor *vic* aos estímulos de estresse. As colônias contendo pVA838 (sem GFP) foram usadas como controle negativo para excluir a autofluorescência. As colônias contendo pDM15 (com GFP constitutivamente expressa) foram usadas como controle positivo para indicar efeitos diretos, não biológicos, sobre a fluorescência. As colônias com pMJ9, denominadas pDM17 (GFP sob controle do *vic*) foram usadas como teste.

No dia anterior aos experimentos envolvendo estresse celular, uma colônia de cada um dos três tipos de cepas bacterianas (pVA838, pDM15 e pDM17) foi inoculada em 10 mL do meio infusão cérebro-coração (BHI, pH 7,2) com adição de 10 µg/mL de eritromicina. A cultura bacteriana foi mantida a 37°C em condições aeróbicas até o dia seguinte.

Os procedimentos gerais para os testes de resposta ao estresse foram realizados como se segue: 1,25 mL de cada cultura bacteriana foi misturado a um volume de 23,75 mL de meio BHI fresco (pH 7,2) contendo eritromicina a 10 µg/mL. As colônias foram incubadas em condições aeróbicas a 37°C até que os valores de DO600 se aproximassem a 0,3. Um volume de 400 µL de PBS a 4°C foi estocado em cada um dos 42 tubos de microcentrifuga. No momento da DO600 ≈ 0,3, as culturas bacterianas foram estocadas em gelo para cessar a síntese de proteínas. Um volume de 50 µL de cada cepa de bactéria foi misturado ao PBS contido em 14 tubos de microcentrifuga. Em seguida, as suspensões bacterianas foram tratadas

através da adição de 50 µL dos respectivos produtos: NaF 45mM; NaF 22,5mM; Xilitol 2,5%, Xilitol 1,25% e água deionizada.

As concentrações dos agentes utilizados foram diluídas em mais 10 vezes quando misturadas às suspensões bacterianas. Tais concentrações foram estipuladas após estudo piloto.

Antes e após 30, 60 e 90 min da aplicação dos estímulos de estresse, 50 µL das amostras bacterianas tratadas foram diluídas em 950 µL de PBS e posteriormente estocadas a 4°C até o momento de realização da citometria de fluxo.

Durante a citometria de fluxo, realizada no aparelho EPICS-XL-MCL (Beckman Coulter, Mijdrecht, Netherlands), sinais fluorescentes foram emitidos após excitação realizada pela irradiação de um laser de argônio 488 nm. Estes sinais foram detectados e mensurados após a passagem por um filtro de banda de 525/10 nm (FL1). O espalhamento frontal e lateral das células foi mensurado para avaliar a distribuição celular, através da coleta de 10.000 eventos em cada amostra. Todos os dados foram adquiridos e analisados com o uso do software EXPO32-ADC (Beckman Coulter, Mijdrecht, Netherlands).

4.4.1 Colônias bacterianas, plasmídeos e meios de cultura

Os procedimentos que foram realizados nesta etapa se utilizaram das bactérias geneticamente modificadas desenvolvidas por Deng et al. (2007). As colônias bacterianas e os plasmídeos que foram utilizados por tais autores encontram-se listados na tabela 2.

4.4.2 Manipulação do DNA

Os plasmídeos foram extraídos e purificados de *E. coli* através da utilização do kit QIAPREP SPIN MINIPREP (Qiagen GMH, Hilden, Alemanha). O DNA foi extraído dos géis de agarose 1% e posteriormente purificado utilizando o kit QIAQUICK GEL EXTRACTION (Qiagen GMH, Hilden, Alemanha). A transformação do DNA ocorre pelo choque gerado por calor sobre *E. coli*. O DNA cromossômico de

S. mutans foi isolado de acordo com o descrito por Hanna *et al.* (2001). A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada com o uso do termociclador DISCIPLE™ (Bio-Rad, Veenendaal, Holanda). Os *primers* que foram utilizados estão descritos na tabela 2.

4.4.3 Construção de colônias informantes

Duas fusões de GFP foram construídas em um esqueleto de pVA838 (vetor de transferência entre *E. coli* - *S. mutans*). Para construir *Pvic::gfp*, a completa região intergênica *upstream* do operon *vic* foi amplificada a partir de *S. mutans* por meio de PCR, com os *primers* de *vicpF* e de *vicpR*. O promotor foi ligado ao gene pAYBG854S *gfpmut2* e inserido no pVA838, resultando no pMJ9. Um promotor de referência constitutivo sintético, CP25 (HANSEN *et al.*, 2001), com um sítio de ligação ribossômica sintético, também foi fusionado ao gene *gfpmut2* e posteriormente inserido no pVA838, resultando no pDM15. As colônias informantes de *S. mutans* contendo estes vetores foram obtidas através da transformação natural das colônias UA159 (LI *et al.*, 2001). Todas as sequências construídas foram confirmadas por sequenciamento de nucleotídeos.

4.4.4 Construção de colônias de *S. mutans* com deleção do gene *vicK* (*S. mutans* $\Delta vicK$)

Um método preciso de deleção foi usado para supressão do gene *vicK* (LINK *et al.*, 1997). Um produto de deleção cruzada foi construído através de PCR: (1) dois fragmentos foram gerados (sendo um *upstream* e outro *downstream* do gene *vicK*) com a combinação de *primers* *vicKuf/vicKur* e *vicKdf/vicKdr*; (2) os fragmentos *upstream* e *downstream* foram anelados e amplificados por PCR como um único fragmento, com *vicKuf* e *vicKdr*. Este fragmento foi restringido com *EcoRI* e *SphI* e ligado ao vetor suicida pORI280, resultando no pDM28. O pDM28 foi transformado no interior das colônias UA 159. A seleção para a substituição gênica foi realizada de acordo com Leenhouts *et al.* (1996). A deleção do gene *VicK* foi confirmada pela realização de PCR com uso dos *primers* *vicR* e *vicKuf* (DENG *et al.*, 2007).

Tabela 2 - Colônias bacterianas, plasmídeos e primers usados no estudo (DENG et al., 2007)

Colônias, plasmídeos	Características relevantes	Fonte de referência
Colônias de <i>E. coli</i>		
DH5α	<i>F⁻</i> , <i>endA1deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>hsdR17</i> (<i>r_k⁻</i> , <i>m_k⁺</i>), <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	Invitrogen
EC1000	RepA ⁺ MC1000, Km ^r , carregando uma cópia simples do gene pWV01 <i>repA</i> no gene <i>glgB</i>	Leenhouts et al., 1996
Colônias de <i>S. mutans</i>		
UA159	tipo comum	Ajdic ¹ et al., 2002
Δ <i>vicK</i>	UA159 com deleção do gene <i>vicK</i>	Deng et al., 2007
Plasmídeos		
pVA838	Vetor ponte entre <i>E. coli</i> -streptococcus; Em ^r	Macrina et al., 1982
pAYBG854S	pDL276 protegendo <i>PgtfB::gfp</i> ; Em ^r , Km ^r	Yoshida and Kuramitsu, 2002
pDM15	P _{CP25} -RBSII-gfpmut2 em pVA838	Deng et al., 2007
pMJ9	<i>Pvic::gfpmut2</i> em pVA838	Deng et al., 2007
pORI280	Em ^r , LacZ ⁺ , ori ⁺ de pWV01, replicados somente nas colônias provedoras de <i>repA in trans</i>	Leenhouts et al., 1996
pDM28	Truncado com o alelo <i>vicK</i> carregado em pORI280, Em ^r	Deng et al., 2007

Primers	Oligonucleotídeos e seqüências (5' to 3') ^{a,b}
<i>vicpF</i>	TCTAGA ATGAATACCTCGCTTATGGTC
<i>vicpR</i>	GAATTC AGTCTTCTCCTTATTTGACATAA
<i>vicKuf</i>	GAATTC AAGCAGTATCTGGCGAGGTAT
<i>vicKur</i>	<u>ATGACTAATGACGAATCATGACAGAAACAGGTTTTAG</u>
<i>vicKdf</i>	<u>TGATTCGTCATTAGTCATATGATTTTCATGTAATAAC</u>
<i>vicKdr</i>	GCATGC GAAGGTTATGACACGATTACA
<i>vicR</i>	ATGAAGAAAATTCTAATCGTTGAC

a Os sítios de restrição estão em negrito: XbaI, TCTAGA; EcoRI, GAATTC; and SphI, GCATGC.

b As seqüências sublinhadas de *vicKur* e *vicKdf* são complementares.

4.5 Análise estatística

Foram utilizados os *softwares* GraphPad Prism version 4.0 for Windows e GraphPad InStat version 3.0 for Windows (GraphPad software Inc., La Jolla, CA, EUA). Inicialmente os dados foram checados em relação à normalidade e homogeneidade pelos testes de Kolmogorov-Smirnov e Bartlett, respectivamente. Os dados da concentração salivar de xilitol após a aplicação dos vernizes foram avaliados por ANOVA a dois critérios de medidas repetidas e teste de Bonferroni para comparações individuais. Os fatores avaliados foram tipo de verniz e tempo de coleta salivar. Para os dados de contagem de estreptococos, foram utilizados os testes T pareado e não pareado. Dados de ultra-estrutura de *S. mutans* e *S. sobrinus* foram analisados de forma descritiva. Resultados da capacidade do xilitol e flúor proporcionar estresse celular em *S. mutans* UA 159 foram analisados por ANOVA a um critério e teste de Tukey. O nível de significância adotado em todos os testes foi de 5%.

5 Resultados

5 RESULTADOS

Foram analisadas amostras salivares de 10 voluntários. As coletas de saliva obedeceram à metodologia descrita. A análise das concentrações salivares de xilitol foi realizada por meio do método colorimétrico através da utilização do kit enzimático Boehringer-Manheim®. As absorbâncias foram mensuradas com auxílio de um leitor de microplaca (Bio Rad 680) ajustado com o comprimento de onda de 490 nm. Posteriormente, os valores obtidos em absorbância foram convertidos em mg/L de xilitol, por meio de uma fórmula pré-determinada pelo fabricante. Os valores de absorbância obtidos em duplicata, após análise das amostras salivares de cada voluntário, podem ser observados no anexo B.

A tabela 3 apresenta os valores médios de concentração de xilitol (mg/L) observados em todas as amostras salivares analisadas após a aplicação dos vernizes contendo 10% e 20% do açúcar.

Tabela 3 Médias ($\pm$ DP, n=10) dos valores de concentração de xilitol (mg/L) observadas em todas as amostras salivares analisadas nos diferentes tempos, após aplicação de verniz placebo e vernizes contendo 10 e 20% do açúcar

Tempo	Placebo (mg/L)	Verniz contendo 10% de xilitol	Verniz contendo 20% de xilitol
Baseline	1,45 ($\pm$ 0,99) ^a	5,40 ($\pm$ 4,39) ^a	3,96 ($\pm$ 4,08) ^a
5 min*	0,30 ($\pm$ 0,29) ^a	85,70 ($\pm$ 43,7) ^b	115,40 ($\pm$ 34,5) ^b
10 min	0,22 ($\pm$ 0,24) ^a	73,76 ($\pm$ 52,1) ^b	87,49 ($\pm$ 49,7) ^{b,c}
15 min	0,20 ($\pm$ 0,18) ^a	64,52 ($\pm$ 48,2) ^{b,c}	68,09 ($\pm$ 48,0) ^c
30 min	0,19 ($\pm$ 0,15) ^a	37,67 ($\pm$ 33,5) ^{c,d}	38,33 ($\pm$ 33,9) ^d
1 h	0,19 ($\pm$ 0,08) ^a	19,21 ($\pm$ 17,1) ^{ad}	24,83 ($\pm$ 21,1) ^{ad}
1h30min	0,08 ($\pm$ 0,04) ^a	14,94 ($\pm$ 15,3) ^{ad}	15,97 ($\pm$ 11,6) ^{ad}
2 h	0,08 ($\pm$ 0,09) ^a	8,70 ($\pm$ 7,30) ^{ad}	12,72 ($\pm$ 13,0) ^{ad}
4 h	0,05 ($\pm$ 0,02) ^a	6,23 ($\pm$ 5,81) ^a	6,67 ($\pm$ 5,99) ^a
8 h	0,05 ($\pm$ 0,03) ^a	5,38 ($\pm$ 5,79) ^a	7,83 ($\pm$ 13,5) ^a

* Só houve diferenças significativas entre os vernizes 10% e 20% no tempo de 5 min. Letras diferentes sobrescritas nas mesmas colunas indicam diferenças significativas entre os tempos de coleta de saliva para cada tipo de verniz ($p < 0,05$).

Na figura 3, os valores médios da concentração de xilitol em mg/L podem ser observados após coleta salivar nos diferentes tempos.

Figura 3 - Valores médios da concentração de xilitol em mg/L após aplicação de vernizes placebo e contendo 10% e 20 % do açúcar em diferentes tempos.

Os resultados da análise estatística utilizando-se o teste paramétrico de Análise de Variância a dois critérios de medidas repetidas mostraram haver diferenças significativas na liberação do açúcar na saliva entre os vernizes contendo 10% ou 20% de xilitol ($F=5,228$, $p=0,024$), bem como entre os tempos de coleta salivar ($F=18,24$, $p<0,0001$), não tendo havido interação entre estes critérios ($F=1,289$, $p=0,254$). Ambos os vernizes apresentaram um padrão de liberação de xilitol na saliva bastante semelhante. Apenas no tempo de 5 min o teste de Bonferroni mostrou ter havido uma liberação significativamente maior do açúcar na saliva para o verniz contendo 20% de xilitol, quando comparado com o verniz contendo 10% ($p<0,01$). Em todos os outros tempos avaliados, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os vernizes contendo 10% e 20% de xilitol ($p>0,05$). Em relação aos tempos de coleta de saliva, observou-se que para ambos os vernizes houve um aumento significativo na concentração salivar de xilitol em relação ao baseline até 30 min apenas. Embora os níveis de xilitol encontrados na saliva para os tempos de 60 min e 90 min tenham sido cerca de 4 e 3 vezes superiores àqueles observados no *baseline*, as diferenças em relação ao *baseline* não foram significativas ($p>0,05$).

Pelos presentes resultados, pôde-se observar um maior pico de concentração salivar de xilitol após a aplicação do verniz contendo 20% de xilitol em relação ao verniz contendo 10% de xilitol. Ao longo do tempo, nota-se uma semelhança entre os valores de concentração do açúcar após a aplicação dos vernizes contendo 10% ou 20% de xilitol. Logo, o verniz contendo 20% de xilitol foi escolhido para ser utilizado no transcorrer da segunda etapa do estudo.

Durante a segunda etapa da pesquisa, 96 crianças com idades entre 63 e 143 meses, de acordo com os critérios de inclusão e exclusão previamente determinados, foram selecionadas e distribuídas aleatoriamente entre os grupos G1 e G2. Deste total, 67 crianças chegaram ao final do estudo sem faltar durante as sessões de aplicação dos vernizes ou descumprir as orientações dos pesquisadores. Portanto, foi observada uma perda de 30,3% das crianças durante o transcorrer do estudo.

Do total de crianças que chegaram ao final do estudo, 25 eram meninas e 42 eram meninos, com idade média de 108 meses (63 -143 meses). O índice CPOD médio de toda a amostra participante foi de 2,28 (0-15). O grupo G1 foi caracterizado pela presença de 12 meninas e 20 meninos, com idade média de 108,8 meses (72-143) e CPOD médio igual a 2,23 (0-15). O grupo G2 foi caracterizado pela presença de 13 meninas e 22 meninos, com idade média de 107,2 meses (63-138) e CPOD médio igual a 2,34 (0-11).

Os valores médios da contagem absoluta de bactérias provenientes do biofilme dentário (estreptococos do grupo mutans - e estreptococos totais) proveniente do terço cervical da superfície vestibular dos dentes das crianças pertencentes aos grupos G1 e G2 estão representados na tabela 4.

Tabela 4 – Valores médios e respectivos desvios-padrão da contagem absoluta de estreptococos do grupo mutans (M/S) e estreptococos totais (ST) (UFC, $\times 10^6$) durante o *baseline* (1) e coleta final do biofilme dentário (2).

Grupos experimentais	Tipos Microbianos	Período de coleta	
		1	2
G1	M/S	2,6 ($\pm 1,9$) ^{aA}	4,9 ($\pm 5,2$) ^{bA}
G2	M/S	5,2 ($\pm 10,9$) ^{aA}	5,4 ($\pm 7,8$) ^{aA}
G1	ST	3,3 ($\pm 2,3$) ^{aA}	6,2 ($\pm 6,4$) ^{bA}
G2	ST	6,5 ($\pm 12,5$) ^{aA}	7,1 ($\pm 8,9$) ^{aA}

G1 – verniz placebo; G2 – verniz contendo 20% de xilitol. Letras minúsculas diferentes nas mesmas linhas indicam diferenças estatisticamente significativas entre os períodos de coleta. Letras maiúsculas distintas nas mesmas colunas indicam diferenças significativas entre os grupos experimentais para cada tipo microbiano ($p < 0,05$).

Os valores médios da contagem relativa de bactérias provenientes do biofilme dentário (porcentagem de estreptococos do grupo mutans em relação aos estreptococos totais) proveniente do terço cervical da superfície vestibular dos dentes das crianças pertencentes aos grupos G1 e G2 estão representados na tabela 5.

Tabela 5 – Valores médios e respectivos desvios-padrão da porcentagem relativa de estreptococos do grupo mutans (M/S) em relação aos estreptococos totais (ST) durante o *baseline* (1) e coleta final do biofilme dentário (2).

Grupos experimentais	Período de coleta	
	1	2
G1	78,8 ($\pm 16,0$) ^{aA}	78,0 ($\pm 16,0$) ^{aA}
G2	80,2 ($\pm 18,0$) ^{aA}	69,7 ($\pm 18,0$) ^{bB}

G1 – verniz placebo; G2 – verniz contendo 20% de xilitol. Letras minúsculas diferentes nas mesmas linhas indicam diferenças estatisticamente significativas entre os períodos de coleta. Letras maiúsculas distintas nas mesmas colunas indicam diferenças significativas entre os grupos experimentais para cada tipo microbiano ($p < 0,05$).

Entre os indivíduos pertencentes ao Grupo G1 (verniz controle), o teste-t demonstrou diferenças estatisticamente significativas entre a contagem absoluta inicial e final de estreptococos do grupo mutans (Teste-t pareado, $p = 0,0057$) e de estreptococos totais (Teste-t pareado, $p = 0,0066$). Em relação à contagem relativa inicial e final de estreptococos do grupo mutans no grupo G1, não foram observadas

diferenças estatisticamente significativas (Teste-t pareado, $p= 0,3653$). Já entre os indivíduos pertencentes ao Grupo G2 (verniz contendo 20% de xilitol), não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as médias das contagens absolutas inicial e final de estreptococos do grupo mutans (Teste-t pareado, $p=0,4192$) e de estreptococos totais (Teste-t pareado, $p=0,3506$). No entanto, em ambos os grupos (G1 e G2), a contagem final absoluta encontrou-se aumentada.

Comparando os resultados da contagem absoluta inicial e final de *S. estreptococos* do grupo mutans entre os grupos G1 e G2 não foram observadas diferenças estatisticamente significativas (Teste-t não pareado, $p=0,0966$ e $p= 0,3914$, respectivamente), o que também foi observado na contagem absoluta inicial e final de estreptococos totais entre ambos os grupos (Teste-t não pareado, $p= 0,0762$ e $p= 0,3118$, respectivamente).

Em relação à contagem relativa inicial e final de estreptococos do grupo mutans em relação aos estreptococos totais no grupo G1, não foram encontradas diferenças significativas ($p=0,3473$). Já para o grupo G2, foi observada uma redução significativa na porcentagem final (Teste-t, $p= 0,0095$). Em relação à contagem relativa inicial de estreptococos do grupo mutans em relação aos estreptococos totais, não foram observadas diferenças significativas entre os dois grupos (Teste-t não pareado, $p= 0,3744$). No entanto, no período final o G2 apresentou uma porcentagem significativamente menor em relação ao G1 ($p=0,0262$).

Qualitativamente, pode-se observar na análise ultra-estrutural que a exposição a 20% de xilitol causou alterações na morfologia de *S. mutans* (Figura 6) e *S. sobrinus* (figura 7), sendo que suas paredes celulares tornaram-se mais difusas e menos definidas que aquelas observadas no grupo controle (20% de glicose, Figuras 4 e 5), enquanto as cápsulas polissacarídicas tornaram-se dispersas e irregulares. Além disso, o diâmetro absoluto da cápsula polissacarídica das bactérias expostas ao xilitol foi menor que o observado entre as bactérias do grupo controle.

Figura 4 – Ultra-estrutura de *Streptococcus mutans* após permanência durante 2 h em meio de cultura contendo 20% de glicose. Imagens obtidas pelo microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 900 A= 30000X (Zeiss EM 900, Zeiss, Munich, Germany) - NAP/MEPA/ESALQ/USP.

Figura 5 – Ultra-estrutura de *Streptococcus sobrinus* após permanência durante 2 h em meio de cultura contendo 20% de glicose. Imagens obtidas pelo microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 900, A= 30000X (Zeiss EM 900, Zeiss, Munich, Germany) - NAP/MEPA/ESALQ/USP.

Figura 6 – Ultra-estrutura de *Streptococcus mutans* após permanência durante 2 h em meio de cultura contendo 20% de xilitol. Imagens obtidas pelo microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 900 A= 30000(Zeiss EM 900, Zeiss, Munich, Germany) - NAP/MEPA/ESALQ/USP.

Figura 7 – Ultra-estrutura de *Streptococcus sobrinus* após permanência durante 2 h em meio de cultura contendo 20% de xilitol. Imagens obtidas pelo microscópio eletrônico de transmissão A=30000(Zeiss EM 900, Zeiss, Munich, Germany) - NAP/MEPA/ESALQ/USP.

5.4 QUARTA ETAPA

A quarta etapa do estudo teve por objetivo avaliar a capacidade do xilitol e fluoreto de sódio em promover estresse às células planctônicas de *S. mutans* UA159 modificadas geneticamente (deleção do gene *VicK*)(Deng et al., 2007).

Nesta etapa, os procedimentos realizados foram similares aos descritos por Deng et al. (2007) e Deng et al. (2009). A atividade do sistema promotor *VicRK* foi determinada pela expressão da proteína-informante verde fluorescente (GFP), após à exposição de *S. mutans* UA159 a estímulos geradores de estresse. Portanto,

a ocorrência de transdução de sinal foi observada pela variação da fluorescência captada durante a citometria de fluxo. Todos os procedimentos desta etapa foram realizados nos laboratórios do Departamento de Cariologia, Endodontia e Periodontia do Academicsh Centrum Tandheelkunde Amsterdam (ACTA, Holanda) e no laboratório de Biologia Oral da Vrije Universiteit, sob orientação dos Profs. Drs. Wim Crielaard e Jacob M. ten Cate. Por questões logísticas, as bactérias utilizadas foram as mesmas desenvolvidas no estudo de Deng et al. (2007).

A resposta de pVA838 frente a um estímulo de estresse (NaF, 45mM; Xilitol, 2,5%) foi determinada para descartar a autofluorescência bacteriana. A bactéria pDM15 foi utilizada como controle positivo, portanto sendo submetida a um tratamento com baixa produção de estresse (água deionizada). Os resultados podem ser visualizados na Figura 8.

Após submeter suspensões bacterianas de *S. mutans* UA159 (pDM17) a diversos tipos de tratamentos (NaF 45mM; NaF 22,5mM; Xilitol 2,5% e Xilitol 1,25%), a condição de estresse celular foi observada em todas as condições quando comparadas ao tratamento com água deionizada (Figura 9).

Figura 8 – Alterações da intensidade de fluorescência após o tratamento de células planctônicas de *S. mutans* pDM15 com água deionizada e pVA838 com NaF 45mM, Xilitol 2,5% e água deionizada.

Figura 9 – Alterações da intensidade de fluorescência após o tratamento de células planctônicas de *S. mutans* pDM17 com diferentes concentrações de xilitol e fluoreto de sódio (NaF). Barras indicam $\pm$ DP. Letras minúsculas diferentes no mesmo tempo indicam diferenças estatísticas entre os grupos (ANOVA a um critério e teste de Tukey, $p < 0,05$).

Todos os grupos de tratamento foram responsáveis pelo aumento significativo das unidades aleatórias (UA) de fluorescência em relação à água deionizada após 30 e 60 min de tratamento. Após 90 min, somente as soluções de xilitol a 2,5% e xilitol a 1,25% produziram significativo aumento das UA de fluorescência em relação ao grupo que recebeu água deionizada (ANOVA a um critério, Teste de Tukey, $p < 0,05$). Os tratamentos envolvendo xilitol a 1,25% e xilitol a 2,5% mostraram-se capazes de produzir significativamente mais estresse celular quando comparados aos tratamentos de NaF 22,5 mM e 45 mM em todos os tempos analisados. Bactérias tratadas com xilitol a 2,5% produziram aumento estatístico de UA de fluorescência em relação ao grupo tratado com xilitol a 1,25% (ANOVA a um critério, Teste de Tukey, $p < 0,05$) após 60 min de tratamento. Entretanto essa diferença não foi observada após 30 e 90 min de tratamento (ANOVA a um critério, Teste de Tukey, $p > 0,05$).

Entre os grupos tratados com NaF 45 mM e 22,5 mM foram observados aumento significativos das UA de fluorescência somente após 30 min (ANOVA a um critério, Teste de Tukey, $p < 0,05$). Após 60 min e 90 min estas diferenças não foram significativas (ANOVA a um critério, Teste de Tukey, $p > 0,05$).

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

O uso de xilitol na dieta tem mostrado importante papel na prevenção da cárie dentária (KANDELMAN e GAGNON, 1990; SCHEIE et al., 1998; HILDEBRANDT e SPARKS, 2000; SINTES et al., 2002; MILGROM et al., 2006) através do seu papel na redução da contagem (MAKINEN et al., 1995; ALANEN et al., 2000; ISOKANGAS et al., 2000; HONKALA et al., 2006; ÇAGLAR et al., 2007; HARESAKU et al., 2007; HOLGERSON et al., 2007) e da transmissibilidade de *Streptococcus mutans* (ISOKANGAS et al., 2000; SÖDERLING et al., 2000), capacidade remineralizadora (MIAKE et al., 2003; SUDA et al., 2006), menor produção de ácidos pelo biofilme dentário e consequente manutenção do pH local (TWETMAN; STECKSÉN-BLICKS, 2003; SENGUN et al., 2004; STECKSÉN-BLICKS et al., 2004).

Fatores como a frequência de exposição ao xilitol, manutenção de uma concentração mínima do açúcar na saliva e a relação dose-efeito são considerados fundamentais para a obtenção de resultados preventivos contra a cárie dentária, porém tais parâmetros ainda não estão bem estabelecidos (PELDYAK; MÄKINEN, 2002; KITCHENS, 2005; MILGROM et al., 2006). Segundo Söderling et al. (2008), concentrações salivares de 0,1% de xilitol, ou até mesmo menores, podem ser capazes de inibir o crescimento de *S. mutans in vivo*, contrastando com outros estudos que afirmam ser necessária uma concentração salivar de pelo menos 1% de xilitol para a prevenção de cárie dentária. Milgrom et al. (2006) observaram uma relação entre o nível de xilitol administrado em gomas de mascar e alterações na contagem de *S. mutans* presentes na saliva e no biofilme dentário. Entretanto, os resultados apontaram para um efeito platô tanto na placa quanto na saliva, no qual foi observado

que a administração de 6,88 g/dia ou 10,32 g/dia de xilitol surtiram efeitos similares sobre a contagem das bactérias estudadas.

O xilitol é rapidamente eliminado da cavidade bucal. Tapiainen et al. (2002) observaram valores de concentração salivares significativos (1%) por até 15 min após a utilização de gomas de mascar ou xarope que continham o açúcar.

Gomas de mascar contendo xilitol são os veículos mais utilizados para a administração do açúcar no mundo (PELDYAK; MÄKINEN, 2002). Porém, a necessidade de utilização do veículo por várias vezes ao dia (3-5 vezes) (MÄKINEN et al., 1995), para que o efeito preventivo contra a cárie dentária seja alcançado, pode ser considerada desconfortável (MILGROM et al., 2006) e impraticável no sistema de saúde pública. Dessa forma, existe a necessidade de desenvolvimento de novos veículos capazes de possibilitar uma liberação mais lenta do xilitol, de forma que sua utilização se torne mais racional e econômica. Taipale et al. (2007) desenvolveram e testaram um tipo de chupeta que permite a inserção de tabletes de xilitol em seu interior para que possam ser diluídos na saliva e manter níveis salivares do açúcar mais constantes (1-2%) e por maiores períodos de tempo.

Pensando em outras formas que poderiam propiciar a liberação lenta de xilitol e conseqüentemente sua maior permanência de tempo na saliva, Pereira et al. (2010) desenvolveram dois vernizes dentários, um contendo 10% e o outro 20% de xilitol. Estes veículos foram testados *in vitro* e demonstraram capacidade de liberação do açúcar por até 72 h. Porém, as concentrações do xilitol encontradas na saliva após a utilização dos vernizes podem ser consideradas extremamente baixas em comparação com àquelas obtidas após a administração de outros tipos de veículos, como as gomas de mascar. Isso se deve ao fato de, apesar dos vernizes serem compostos por concentrações relativamente elevadas do açúcar (10% e 20%), a quantidade média do produto que é utilizada sobre cada superfície dentária é de aproximadamente 4 mg (PEREIRA et al., 2010). Portanto, tal veículo também é capaz de permitir o ajuste de dosagens a serem utilizadas em cada indivíduo, através da aplicação do produto sobre o número pré-determinado de superfícies dentárias.

Na primeira etapa deste estudo, os vernizes contendo 10% e 20% de xilitol foram comparados com um verniz base placebo (sem adição de xilitol) através da liberação salivar do açúcar *in vivo* em voluntários humanos. Aproximadamente 32 mg do produto foram aplicados sobre as superfícies vestibulares dos incisivos centrais e laterais, tanto do arco superior quanto do inferior, de 10 voluntários. Notou-se a presença do açúcar na saliva pelo período de até 8 h após a aplicação dos vernizes, sendo observado um pico de liberação após 5 min da aplicação. Neste mesmo intervalo de tempo, a quantidade liberada de xilitol pelo verniz contendo 20%

do açúcar foi significativamente maior que aquela observada após a utilização do verniz contendo 10% de xilitol.

É importante ressaltar que na primeira etapa do estudo, apesar dos vernizes terem sido aplicados sobre a superfície dentária de voluntários, as condições experimentais puderam ser controladas pelos pesquisadores em condições laboratoriais, já que os indivíduos não puderam se alimentar durante todo o período de análise (8 h) e ingeriram apenas água com a utilização de canudos plásticos. Isso significa, portanto, que as condições estipuladas nesta etapa podem ser consideradas ideais, evitando a limitação da liberação salivar do açúcar pelo deslocamento prévio do verniz localizado sobre as superfícies dentárias. Tais condições poderiam ser consideradas impraticáveis na clínica odontológica, porém serviram como base de decisão sobre qual verniz seria utilizado na fase clínica do estudo. Entretanto, no caso de aplicação clínica dos vernizes, poder-se-ia sugerir que os mesmos fossem aplicados no período noturno, após a última refeição, para permitir que ficassem por mais tempo em contato com os dentes.

Estudos clínicos randomizados geralmente se utilizam de quantidades diárias de xilitol que variam entre 2,0 g e 15 g, normalmente divididas em três a cinco vezes pela utilização de gomas de mascar (THORILD et al., 2003; HOLGERSON et al., 2006; MILGROM et al., 2006; HARESAKU et al., 2007; LY et al., 2008). O presente estudo se utilizou apenas de aproximadamente 6,4 mg de xilitol, aplicado sobre as superfícies dentárias de crianças com idades entre 6 e 11 anos pelo uso também aproximado de 32 mg de verniz dentário. Esta alternativa pode ser justificada por trabalhos como o de Söderling et al. (2008), o qual observou capacidade de ação terapêutica do açúcar em baixas concentrações, ou ainda, por importantes análises como a de Peldyak e Mäkinen (2002), que afirmam ser a frequência de uso do xilitol mais importante do que as quantidades absolutas do açúcar.

Os níveis de contagem de estreptococos do grupo mutans, bem como de estreptococos totais no biofilme dentário, são mais rapidamente influenciados por terapias antimicrobianas do que aqueles observados na saliva (MILGROM et al., 2006). Portanto, como o objetivo do presente estudo foi observar a influência, em

curto período de tempo, de um verniz contendo 20% de xilitol sobre a contagem de estreptococos totais e estreptococos do grupo mutans, a coleta do biofilme dentário foi escolhida como método de obtenção das contagens desses tipos bacterianos.

O presente estudo possui algumas limitações que merecem ser discutidas. A primeira delas é a utilização de um verniz dentário contendo 20% de xilitol que libera concentrações consideráveis do açúcar já nos primeiros 30 min, sendo observado um decréscimo significativo após este período de tempo. Seria importante que o verniz dentário alcançasse padrões de liberação do açúcar mais uniformes por um período de tempo ainda mais longo, além de permitir uma maior incorporação do açúcar em sua fórmula base sem a observação de formação de precipitados. Quando comparado com os vernizes fluoretados já atualmente comercializados, foi possível observar diferenças quanto à consistência dos produtos. O verniz contendo xilitol 20% apresenta-se mais espesso e menos aderente quando comparado com os vernizes fluoretados. Isso é justificado pela dificuldade de maior dissolubilidade do xilitol no verniz. Portanto, o aperfeiçoamento deste produto é fundamental para possibilitar sua aplicação na clínica odontológica.

A segunda limitação do estudo se refere à quantidade de verniz utilizada em cada sessão de aplicação clínica. Por possibilitar a aplicação de aproximadamente 4 mg de verniz por superfície dentária irrompida (portanto, 0,8 mg de xilitol/superfície), uma quantidade bem superior de xilitol pode ser oferecida ao paciente utilizando-se este mesmo veículo, através de sua aplicação sobre superfícies oclusais, linguais e palatinas de todos os dentes presentes na boca, o que poderia representar um incremento de mais de 40 mg de xilitol em casos onde os segundos molares já estivessem irrompidos totalmente ou parcialmente. Neste caso, foi definida a aplicação apenas nas superfícies vestibulares de incisivos superiores e inferiores devido à facilidade de acesso pelo clínico e maior capacidade de padronização.

A frequência de aplicação do verniz dentário também caracteriza uma importante limitação do estudo. As aplicações foram realizadas semanalmente, durante 28 dias, totalizando 4 sessões de aplicação. Essa quantidade é bem inferior àquelas observadas em estudos clínicos que envolveram distribuição de gomas de mascar aos pacientes (THORILD et al., 2003; HOLGERSON et al., 2006; MILGROM et al., 2006; HARESAKU et al., 2007; LY et al., 2008), o que representa uma grande vantagem. Um período maior de aplicação tornaria o estudo impraticável, já que

esse dependia da realização de procedimento técnico-científico por um profissional cirurgião-dentista habilitado. Em adição, um aumento na frequência de aplicação poderia ser impraticável do ponto de vista clínico. Melhores resultados em relação à contagem de estreptococos do grupo mutans poderiam ser notados caso as próprias mães ou responsáveis fossem instruídos pelo cirurgião-dentista a aplicar o produto sobre os dentes das crianças antes de dormir. Essa possibilidade pode ser estudada devido ao baixo risco do produto em causar danos à saúde local ou sistêmica da criança, já que pequenas quantidades de xilitol são utilizadas.

Outro fator que pode ter comprometido os resultados do estudo é a dependência da colaboração dos voluntários em cumprir as recomendações pré-determinadas pelos pesquisadores. Após a aplicação dos vernizes placebo ou contendo 20% de xilitol, as crianças eram instruídas a permanecerem 2 h sem ingerir alimentos ou líquidos sem a utilização de canudos plásticos. As aplicações do produto ocorreram no período matutino, respeitando os intervalos de rotina alimentar estabelecidos pela escola, o que pode ter contribuído para o não cumprimento de tais recomendações. As crianças participantes desse estudo estavam inseridas em uma instituição filantrópica da cidade de Bauru (“Casa do Garoto”) o qual permaneciam em regime de “internato”. Todas as crianças possuíam a mesma rotina alimentar determinada pelo setor de nutrição da escola.

O aumento da contagem de estreptococos do grupo mutans e estreptococos totais entre as crianças pertencentes ao grupo G1, bem como o aumento da contagem de estreptococos totais entre as crianças pertencentes ao grupo G2, após o período experimental, podem ser explicados pela orientação que as crianças receberam em não utilizar métodos para remoção mecânica do biofilme dentário nos dias de aplicação dos vernizes placebo ou contendo 20% de xilitol. Além disso, durante o período do estudo, as crianças não puderam receber orientações quanto à execução dos procedimentos de higiene bucal e nem visitar outro cirurgião-dentista.

Entretanto, o verniz contendo xilitol foi capaz de reduzir significativamente a porcentagem de estreptococos do grupo mutans em relação aos estreptococos totais. Isto ocorreu tanto quando foram comparados os 2 períodos experimentais

para o verniz de xilitol, quando foram comparados os vernizes placebo e de xilitol no período final do estudo. Isto é um dado extremamente importante, pois uma revisão sistemática relativamente recente confirmou o papel chave dos estreptococos do grupo mutans no início da cárie dentária tanto em esmalte quanto na superfície radicular (TANZER et al., 2001). Em adição, numa extensão da hipótese da placa ecológica recentemente proposta (TAKAHASHI; NYVAD, 2008), foi reconhecido que altas proporções de *S. mutans* e/ou outras bactérias acidúricas no biofilme dentário podem ser consideradas biomarcadores de sítios de rápida progressão de cáries. Deste modo, o verniz de xilitol testado parece ter interferido na ecologia do biofilme, diminuindo a proporção de bactérias relacionadas com atividade de cárie. Deve ser destacado, que, como mencionado acima, esta alteração ecológica ocorreu na presença de quantidades de xilitol bem menores que aquelas utilizadas em outros veículos, sugerindo que a frequência de permanência de xilitol nos sítios orais, através da utilização de produtos que o liberem mais lentamente, parece ser suficiente para assegurar a eficácia clínica do produto. Desta forma, uma importante indicação do produto pode ser direcionada aos pacientes portadores de necessidades especiais que apresentam dificuldade de controle mecânico do biofilme oral, pois este grupo pode ser beneficiado com a utilização do verniz contendo xilitol como sendo mais uma estratégia preventiva na prevenção da cárie. É um método seguro e que não depende da ação do paciente.

Após realização da análise ultraestrutural qualitativa de *Streptococcus mutans* e *S. sobrinus*, foi possível observar as modificações produzidas pelo xilitol. As cápsulas polissacarídicas das bactérias expostas a 20% de xilitol tornaram-se mais dispersas e desiguais enquanto as paredes celulares tornaram-se difusas, em relação àquelas do grupo controle, expostas a 20% de glicose. As alterações observadas na cápsula polissacarídica destas bactérias podem ser devidas às alterações metabólicas dos polissacarídeos promovidas pela utilização do xilitol, incorporado rapidamente pelo microrganismo através do sistema ativo frutose-fosfotransferase. O xilitol-5-fosfato, metabólito produzido em consequência desse processo, não é capaz de gerar energia para bactéria. O déficit energético, acarretado pelo transporte ativo do xilitol para o interior do microrganismo e excreção do metabólito incapaz de gerar energia (ciclo fútil), é a principal teoria que explica a ação antimicrobiana do xilitol (ASSEV; ROLLA, 1983; SÖDERLING; PIHLANTO-LEPPALA, 1989). Após exposição ao xilitol, o metabolismo e estrutura

polissacarídicos tornaram-se alterados, sendo possível observar alterações morfológicas que podem conduzir à diminuição da aderência de *S. mutans* e *S. sobrinus* sobre as superfícies dentárias. A ultraestrutura alterada pode afetar a virulência de tais bactérias. Este efeito pode persistir depois de um curto tempo de exposição da bactéria ao xilitol presente na cavidade bucal, podendo explicar a boa eficácia clínica que pode ser obtida com o uso do xilitol e com os vernizes estudados.

Recentes estudos têm buscado compreender a habilidade do *Streptococcus mutans* em se adaptar em ambientes não favoráveis ao seu desenvolvimento (SENADHEERA et al., 2007). O sistema VicRK tem sido alvo destas investigações, pois ele compõe um dos 13 sistemas TCRS (sistema regulador de dois componentes), o qual é responsável por propiciar maior adaptação, sobrevivência e virulência bacteriana (SENADHEERA et al., 2005). Esse sistema é composto por proteínas sensíveis, codificadas pelo gene VicK, e por proteínas reguladoras de resposta, codificadas pelo gene VicR, e está diretamente ligado à expressão de genes relacionados à virulência. Condições diferentes de estresse podem desencadear respostas do sistema VicRK favorecendo a adaptação e a sobrevivência bacteriana. Como os mecanismos de ação do xilitol sobre *S. mutans* não estão totalmente esclarecidos na literatura, propôs-se investigar a capacidade do xilitol em promover ou não estresse celular por meio da utilização de *S. mutans* modificados geneticamente, com deleção do gene VicK (DENG et al., 2007). Esse dado é importante, uma vez que este sistema está envolvido na regulação de expressão de *gtfBCD*, *gbpB* e *ftf*, formação de biofilme, produção de polissacarídeos extracelulares e no desenvolvimento da competência genética bacteriana (SENADHEERA et al., 2005). Os dados obtidos na etapa 4 demonstraram que o xilitol foi capaz de promover estresse bacteriano, no entanto, não foram observadas relevantes diferenças estatísticas entre as duas concentrações de xilitol testadas (1,25% e 2,5%). Estudos têm demonstrado que baixas concentrações de xilitol são suficientes para alterar o metabolismo de *S. mutans* e que, o fator mais preponderante neste caso, é o tempo de disponibilidade do carboidrato na cavidade bucal (ASSEV et al., 1983; SODERLING et al., 2008). Podemos observar que

mesmo utilizando o dobro de concentração de xilitol em um dos grupos, o comportamento de estresse bacteriano observado por meio da expressão da proteína GFP foi similar nos dois grupos de tratamento (1,25% e 2,5%) após 90 min. Sabendo que o sistema VicRK está relacionado ao fator de virulência, formação de biofilme e produção de polissacarídeos extracelulares por *S. mutans*, os dados obtidos nesta etapa podem ser corroborados com os descritos clinicamente pela literatura. Estudos clínicos têm demonstrado que o consumo de produtos contendo xilitol favorece a redução de biofilmes orais uma vez que as bactérias expostas ao xilitol tornam-se menos aderentes, sendo facilmente destacadas da superfície dentária e eliminadas da cavidade bucal pela saliva (HARESAKU et al., 2007; TRAHAN et al., 1992; TANZER et al., 2006). Desta maneira, os resultados referentes à capacidade do xilitol em promover estresse bacteriano podem estar relacionados com o mecanismo pelo qual este carboidrato age sobre o *S. mutans*, favorecendo assim, a prevenção da cárie dentária.

7 Conclusões

7 CONCLUSÕES

Pelo presente trabalho, pode-se concluir que:

- As concentrações salivares de xilitol foram significativamente maiores 5 min após a aplicação do verniz contendo 20% do açúcar sobre as superfícies vestibulares de incisivos superiores e inferiores de 10 voluntários, quando comparado com verniz contendo 10% de xilitol e verniz placebo. Nos demais tempos, as diferenças entre os vernizes contendo diferentes concentrações de xilitol não foram significativas e ambos os vernizes experimentais levaram a níveis salivares de xilitol significativamente aumentados em relação ao *baseline* até 30 min após a aplicação dos mesmos.
- O verniz contendo 20% de xilitol foi capaz de diminuir a contagem relativa de *S. mutans* e *S. sobrinus* em relação aos estreptococos totais provenientes de biofilmes dentários de crianças quando comparado ao verniz placebo, de acordo com os parâmetros utilizados neste estudo.
- Uma solução contendo 20% de xilitol foi capaz de promover mais alterações ultra-estruturais sobre *Streptococcus mutans* ATCC 33478 e *Streptococcus sobrinus* ATCC 25175 cultivados *in vitro*, quando comparada com os resultados obtidos por uma solução contendo 20% de glicose sobre os mesmos tipos bacterianos.
- Xilitol (1,25% e 2,5%) e fluoreto de sódio (22,5 ppm e 45 ppm) mostraram-se capazes de produzir estresse celular em *Streptococcus mutans* UA 159 com deleção do gene *vick*.

Referências

REFERÊNCIAS

Aaltonen A, Suhonen J, Tenovuo J, Inkilä-Saari I. Efficacy of a slow-release device containing fluoride, xylitol and sorbitol in preventing infant caries. *Acta Odontol Scand*. 2000 Dec; 58(6):285-92.

Akerblom HK, Koivukangas T et al. The tolerance of increasing amounts of dietary xylitol in children. *Int J Vitam Nutr Res* 1982; 22:53-66.

Alanen P, Isokongas P, Gutman K. Xylitol candies in caries prevention: results of a field study in Estonian children. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2000; 28:218-24.
Anderson M. Chlorhexidine and xylitol gum in caries prevention. *Spec Care Dentist* 2003; 23:173-6.

Assev S, Rolla G. Further studies on the growth inhibition of some oral bacteria by xylitol. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand*. 1983; 91:261-265.

Bader JD, Shugars DA, Bonito AJ. A systematic review of selected caries prevention and management methods. *Comm Dent Oral Epidemiol*. 2001; 29(6): 399-411.

Bastos JRM, Heintze SD, Prado SV. Contribuição ao estudo da toxicologia do xilitol e do flúor. *UFES Rev Odontol*. 2000; 2(2): 78-84.

Burt BA. The use of sorbitol and xylitol sweetened chewing gum in caries control. *JADA* 2006; 137:190-6.

Çaglar E, Kavaloglu SC, Kuscu OO, Sandalli N, Holgerson PL, Twetman S. Effect of chewing gums containing xylitol or probiotic bacteria on salivary mutans streptococci and lactobacilli. *Clin Oral Invest* 2007; DOI 10.1007/s00784-007-0129-9.

Caufield PW, Cutter GR, Dasanayake AP. Initial acquisition of mutans streptococci by infants: evidence for a discrete window of infectivity. *J Dent Res* 1993; 72:37-45.

Cunha, LSC. Uso do xilitol como agente anticariogênico. [Monografia]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2003.

Elias F. Influência do complexo flúor-xilitol no controle da placa dentária e sangramento gengival em pacientes herbiátricos com aparelho ortodôntico fixo. [Dissertação]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2005.

Ernst CP, Canbek K, Dillenburger A, Willershausen B. Clinical study on the effectiveness and side effects of hexetidine and chlorhexidine mouthrinses versus a negative control. *Quintessence Int.* 2005; 36(8):641-52.

Fejerskov O, Kidd E. Cariologia clínica e a dentística operatória no século XXI. In:____. Cárie dentária: a doença e seu tratamento. São Paulo: Editora Santos; 2005. p. 3-6.

Foster H, Quadbeck R, Gottsein U. Metabolic tolerance to high doses of oral xylitol. *Inter Journal Vit Nutr Res* 1982; 22:67-88.

Gonçalves NCLAV. Efeito da associação de polióis e outros agentes anticariogênicos sobre estreptococos do grupo mutans e inibição da desmineralização do esmalte dental [tese] Piracicaba (SP): UNICAMP; 2004.

Hardie JM. Oral streptococci. In: Berger DH. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986, p. 1054-1063.

Haresaku S, Hanioka T, Tsutsui A, Yamamoto M, Chou T, Gunjishima Y. Long-term effect of xylitol gum use on mutans streptococci in adults. *Caries Res.* 2007; 41:198-203.

Haukioja A, Soderling E, Tenovuo J. Acid production from sugars and sugar alcohols by probiotic lactobacilli and bifidobacteria in vitro. *Caries Res.* 2008;42(6):449-53.

Hayes C. The effect of non-cariogenic sweeteners on the prevention of dental caries: a review of the evidence. *J Dent Educ.* 2001; 65(10):1106-9.

Hildebrandt GH, Sparks BS. Maintaining mutans streptococci suppression with xylitol chewing gum. *J Am Dent Assoc.* 2000; 131(7):909-16.

Holgerson P, Sjöström I, Stecksén-Blicks C, Twetman S. Dental plaque formation and salivary mutans streptococci in schoolchildren after use of xylitol-containing chewing gum. *Int J Paediatr Dent.* 2007 Mar; 17(2):79-85.

Holgerson PL, Blicks CS, Sjostrom I, Oberg M, Twetman S. Xylitol concentration in saliva and dental plaque after use of various xylitol-containing products. *Caries Res.* 2006; 40(5):393-397.

Holgerson PL, Sjöström I, Stecksén-Blicks C, Twetman S. Dental plaque formation and salivary mutans streptococci in schoolchildren after use of xylitol-containing chewing gum. *Int J Paed Dent.* 2007; 17:79-85.

Holgerson PL, Stecksén-Blicks C, Sjöström I, Öberg M, Twetman S. Xylitol concentration in saliva and dental plaque after use of various xylitol-containing products. *Caries Res* 2006; 40:393–7.

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

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

Isokangas P, Soderling E, Pienihakkinen K, Alanen P. Occurrence of dental decay in children after maternal consumption of xylitol chewing gum a follow-up from 0 to 5 years of age. *Caries Res.* 2000; 34: 225-28.

Isokangas P. Xylitol chewing gum in caries prevention. A longitudinal study on Finnish school children. *Proc Finn Dent Soc.* 1987; 83 Suppl 1:1-117.

Isotupa KP, Gunn S, Chen CY, Lopatin D, Mäkinen KK. Effect of polyol gums on dental plaque in orthodontic patients. *Am J Orthod Dent Orthop* 1995; 107:497-504.

Kakuta H, Iwami Y, Mayanagi H, Takahashi N. Xylitol inhibition of acid production and growth of mutans Streptococci in the presence of various dietary sugars under strictly anaerobic conditions. *Caries Res.* 2003; 37 (6): 404-9.

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

Kitchens DH. Xylitol in the prevention of oral diseases. *Spec Care Dentist*. 2005; 25(3):140-4.

Kohler B, Andreen I, Jonsson B. The earlier the colonization by mutans streptococci, the higher the caries prevalence at 4 years of age. *Oral Microbiol Immunol* 1988; 3:14-7.

Kontiokari T, Uhari, M, Koskela M. Antiadhesive effects of xylitol on otopathogenic bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1998; 41:563-5.

Kovari H, Pienihäkkinen K, Alanen P. Use of xylitol chewing gum in daycare centers: a follow-up study in Savonlinna, Finland. *Acta Odontol Scand*. 2003 Dec; 61(6):367-70.

Lif Holgersson P, Stecksén-Blicks C, Sjöström I, Öberg M, Twetman S. Xylitol concentration in saliva and dental plaque after use of various xylitol-containing products. *Caries Res*. 2006; 40(5):393-7.

Ly K, Riedy C, Milgrom P, Rothen M, Roberts M, Zhou L. Xylitol gummy bear snacks: a school-based randomized clinical trial. *BMC Oral Health*. 2008; 8:20.

Ly KA, Milgrom P, Roberts MC, Yamaguchi DK, Rothen M, Mueller G. Linear response of mutans streptococci to increasing frequency of xylitol chewing gum use: a randomized controlled trial. *BMC Oral Health* 2006; 6:6.

Ly KA, Riedy CA, Milgrom P, Rothen M, Roberts MC, Zhou L. Xylitol gummy bear snacks: a school-based randomized clinical trial. *BMC Oral Health*. 2008; 8:20.

Lynch H, Milgrom P. Xylitol and dental caries: An overview for clinicians. *J Calif Dent Assoc*. 2003; 31(3):205-9.

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

Maehara H, Iwami Y, Mayanagi H, Takahashi N. Synergistic inhibition by combination of fluoride and xylitol on glycolysis by mutans streptococci and its biochemical mechanism. *Caries Res*. 2005 Nov-Dec;39(6):521-8.

Mäkinen K, Bennett C, Hujoel P, Isokangas P, Isotupa K, Pape HJ, et al. Xylitol chewing gums and caries rates: a 40-month cohort study. *J Dent Res*. 1995 Dec; 74(12):1904-13.

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

Mäkinen KK, Isotupa KP, Mäkinen PL, Söderling E. Six-month polyol chewing-gum programme in kindergarten-age children: a feasibility study focusing on mutans streptococci and dental plaque. *Int Dent J* 2005; 55:81-8.

Mäkinen KK, Pemberton D, Mäkinen PL, Chen C, Cole J, Hujoel P et al. Polyol-combinant saliva stimulants and oral health in Veterans Affairs patients-an exploratory study. *Spec Care Dentist* 1996; 16:104-15.

Mäkinen KK, Saag M, Isotupa KP, Olak J, Nömmela R, Söderling E, Mäkinen PL. Similarity of the Effects of Erythritol and Xylitol on Some Risk Factors of Dental Caries. *Caries Res* 2005; 39:207–215.

Mäkinen KK, Scheinin A. Turku sugar studies VII: principal biochemical findings on whole saliva and plaque. *Acta Odontol Scan* 1978; 70:129-71.

Mäkinen KK. Can the pentitol-hexitol theory explain the clinical observations made with xylitol? *Medical Hypotheses*. 2000b; 54 (4): 603-613.

Mäkinen KK. The rocky road of xylitol to its clinical application. *J Dent Res*. 2000a; 79(6): 1352-55.

Massoth D, Massoth G, Massoth R, Laflamme L, Shi W, Hu C et al. The effect of xylitol on *Streptococcus mutans* in children. *J Calif Dent Assoc* 2006; 34:231-4.

Mattila PT, Kangasmaa H, Knuuttila MLE. The effect of a simultaneous dietary administration of xylitol and ethanol on bone resorption. *Metabolism* 2005; 54:548-51.

Meurman P, Meriläinen L, Piehihäkkinen K, Alanen P, Trahan L, Söderling E. Xylitol-resistant mutans streptococci strains and the frequency of xylitol consumption in young children. *Acta Odontol Scand* 2005; 63:314-6.

Miake Y, Saeki Y, Takahashi M, Yanagisawa T. Remineralization effects of xylitol on demineralized enamel. *J Electr Microsc.* 2003; 52: 471–6.

Mickenautsch S, Leal S, Yengopal V, Bezerra A, Cruvinel V. Sugar-free chewing gum and dental caries: a systematic review. *J Appl Oral Sci.* 2007 Apr; 15(2):83-8.

Milgrom P, Ly K, Roberts M, Rothen M, Mueller G, Yamaguchi D. Mutans streptococci dose response to xylitol chewing gum. *J Dent Res.* 2006 Feb; 85(2):177-81.

Milgrom P, Ly KA, Roberts MC, Rothen M, Mueller G, Yamaguchi DK. Mutans streptococci dose response to xylitol chewing gum. *J Dent Res* 2006; 85:177-181.

Miyasawa H, Iwami Y, Mayanagi H, Takahashi N. Xylitol inhibition of anaerobic acid production by *Streptococcus mutans* at various pH levels. *Oral Microbiol Immunol.* 2003; 18:215-9.

Natah SS, Hussien KR, Tuominen JA, Koivisto VA. Metabolic responses to lactitol and xylitol in healthy men. *Am J Clin Nutr* 1997; 65:947-50.

Peldyak J, Mäkinen KK. Xylitol for caries prevention. *J Dent Hyg.* 2002; 76(4):276-85.

Peng B, Petersen P, Bian Z, Tai B, Jiang H. Can school-based oral health education and a sugar-free chewing gum program improve oral health? Results from a two-year study in PR China. *Acta Odontol Scand.* 2004 Dec; 62(6):328-32.

Pereira AFF, Silva TCS, Silva TL, Caldana ML, Bastos JRM, Buzalaf MA. Xylitol concentrations in artificial saliva after application of different xylitol dental varnishes. *J Appl Oral Sci, Bauru* 2010. In press.

Pereira AFF. Possíveis estratégias para a prevenção de otite média aguda: estudo in vitro da liberação de xilitol em saliva artificial após aplicação de verniz em diferentes concentrações. [dissertação]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2007.

Rekola M. Correlation between caries incidence and frequency of chewing gum sweetened with sucrose or xylitol. *Proc Finn Dent Soc.* 1989; 85(1):21-4.

Roberts MC, Riedy CA, Coldwell SE, Nagahama S, Judge K, Lam M, et al. How xylitol-containing products affect cariogenic bacteria. *J Am Dent Assoc.* 2002; 133:435-41.

Scheie A, Fejerskov O, Danielsen B. The effects of xylitol-containing chewing gums on dental plaque and acidogenic potential. *J Dent Res.* 1998 Jul; 77(7):1547-52.

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

Schriker T, Kugler B, Träger K, Anhäupl T, Vogt J, Georgieff M. Effects of xylitol on carbohydrate and protein metabolism after trauma and during sepsis. *Nutr Hosp* 1993; 8:471-8.

Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB. Dental caries. *Lancet* 2007; 369: 51–9.

Senadheera MD, Guggenheim B et al. A VicRK signal transduction system in *Streptococcus mutans* affects gtfBCD, gbpB, and ftf expression, biofilm formation, and genetic competence development. *J Bacteriol.* 2005; 187 (12): 4064-4076.

Sengun A, Sari Z, Ramoglu SI, Malkoc S, Duran I. Evaluation of the dental plaque pH recovery effect of a xylitol lozenge on patients with fixed orthodontic appliances. *Angle Orthodontist.* 2004; 74:240-4.

Shafer RB, Lavine AS, Marlette JM, Morley JE. Effects of xylitol on gastric emptying and food intake. *Am J Clin Nutr* 1987; 45:744-7.

Sintes J, Elías-Boneta A, Stewart B, Volpe A, Lovett J. Anticaries efficacy of a sodium monofluorophosphate dentifrice containing xylitol in a dicalcium phosphate dihydrate base. A 30-month caries clinical study in Costa Rica. *Am J Dent.* 2002 Aug; 15(4):215-9.

Soderling E, Isokangas P, Pienihakkinen K, Tenovuo J. Influence of maternal xylitol consumption on acquisition of mutans streptococci by infants. *J Dent Res* 2000; 79: 882-7.

Söderling E, Pihlanto-Leppala A. Uptake and expulsion of C-xylitol by xylitol-cultured *Streptococcus mutans* ATCC 25175 in vivo. *Scand J Dent Res*. 1989; 97:511-9.

Söderling EM, Ekman TC, Taipale TJ. Growth inhibition of *Streptococcus mutans* with low xylitol concentrations. *Curr Microbiol*. 2008; 56:382-5.

Söderling EM, Pihlanto-Leppala A. Uptake and expulsion of C-xylitol by xylitol-cultured *Streptococcus mutans* ATCC 25175 in vivo. *Scand J Dent Res*. 1989; 97:511-9.

Stecksén-Blicks C, Holgerson P, Twetman S. Effect of xylitol and xylitol-fluoride lozenges on approximal caries development in high-caries-risk children. *Int J Paediatr Dent*. 2008 May; 18(3):170-7.

Stecksén-Blicks C, Holgerson PL, Olsson M, Bylund B, Sjöström I, Sköld-Larsson K et al. Effect of xylitol on mutans streptococci and lactic acid formation in saliva and plaque from adolescents and young adults with fixed orthodontic appliances. *Eur J Oral Sci*. 2004; 112:244–8.

Suda R, Suzuki T, Takiguchi R, Egawa K, Sano T, Hasegawa K. The effect of adding calcium lactate to xylitol chewing gum on remineralization of enamel lesions. *Caries Res*. 2006; 40:43–6.

Taipale T, Pienihakkinen K, Alanen P, Jokela J, Söderling E. Dissolution of xylitol from a food supplement administered with a novel slow-release pacifier. *Eur Arch Ped Dent*. 2007; 8:123-25.

Takahashi N, Nyvad B. Caries ecology revisited: microbial dynamics and the caries process. *Caries Res*. 2008;42(6):409-18.

Tanzer JM, Livingston J, Thompson AM. The microbiology of primary dental caries in humans. *J Dent J Dent Educ*. 2001 Oct;65(10):1028-37.

Tanzer JM, Thompson A, Wen ZT, Burne RA. *Streptococcus mutans*: fructose transport, xylitol resistance, and virulence. *J Dent Res* 2006; 85:369-73.

Tapiainen T, Renko M, Kontiokari T, Uhari M. Xylitol concentrations in the saliva of children after chewing xylitol gum or consuming a xylitol mixture. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2002; 21: 53-55.

Tapiainen T, Sormunen R, Kaijalainen T, Kontiokari T, Ikäheimo I, Uhari M. Ultrastructure of *Streptococcus pneumoniae* after exposure to xylitol. *J Antimicrob Chemot*. 2004; 54: 225-28.

ten Cate JMT. Fluorides in caries prevention and control: empiricism or science. *Caries Research*. 2004; 38:254-257.

Thorild I, Lindau B, Twetman S. Effect of maternal use of chewing gums containing xylitol, chlorhexidine or fluoride on mutans streptococci colonization in the mothers`infant children. *Oral Health Prev Dent*. 2003; 1:53-7.

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

Trahan L, Söderling E et al., Effect of xylitol consumption on the plaque-saliva distribution of mutans streptococci and the occurrence and long-term survival of xylitol-resistant strains. *J Dent Res* 1992; 71:1785-91.

Trindade CP. Efeito do uso de goma de mascar contendo xilitol sobre os níveis salivares de estreptococos do grupo mutans, sobre os genótipos de *S. mutans* e sobre a presença de amostras xilitol-tolerantes na saliva. [tese]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 2005.

Twetman S, Stecksén-Blicks C. Effect of xylitol-containing chewing gums on lactic acid production in dental plaque from caries active pre-school children. *Oral Health Prev Dent*. 2003; 1:195-9.

Uhari M, Kontiokari T, Koskela M, Niemela M. Xylitol chewing gum in prevention of acute otitis media: double-blind randomised trial. *BMJ* 1996; 313:1180-4.

Anexos

ANEXO A – Carta Comitê de Ética

**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)3235-8000 – FAX (0XX14)3223-4679

Comitê de Ética em Pesquisa (14)3235-8356
mferrari@fob.usp.br

Processo nº 126/2007

Bauru, 13 de dezembro de 2007.

Senhora Professora,

Informamos que após o envio da documentação solicitada referente ao projeto de pesquisa encaminhado a este Comitê de Ética em Pesquisa "**Estudo dos efeitos de um verniz contendo xilitol sobre a contagem e ultra-estrutura de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* provenientes de biofilmes dentários**" de autoria de Agnes de Fátima Faustino Pereira e Thiago Cruvinel da Silva, sob sua orientação foi novamente analisado e considerado **APROVADO** por este Colegiado, em reunião realizada no dia 28 de novembro de 2007.

Solicitamos que ao término do trabalho, seja enviado a este Comitê um relatório final para parecer do trabalho concluído o qual será utilizado para publicação em revista científica.

Atenciosamente,

Profª Drª Maria Teresa Atta
Coordenadora

Profª Drª Marília Afonso Rabelo Buzalaf
Docente do Departamento de Ciências Biológicas

ANEXO B – Valores de absorvância observados em diferentes tempos de coleta salivar após aplicação de verniz contendo xilitol 10% (tabela 1) e 20% (tabela 2) em cada voluntário participante da segunda etapa experimental.

Voluntário 1

Tabela 1.1 - Valores de absorvância observados após aplicação de verniz contendo xilitol 10% em diferentes tempos de coleta salivar

Tempo	Análise 1 (10%)	Análise 2 (10%)	Valor médio absorvância	Valor médio [xilitol] mg/L
Baseline	0,024	0,024	0,024	5,60
5 min	0,217	0,282	0,250	58,19
10 min	0,119	0,142	0,131	30,40
15 min	0,109	0,086	0,098	22,7
30 min	0,039	0,05	0,045	10,38
1 h	0,031	0,032	0,032	7,35
1h30min	0,026	0,03	0,028	6,52
2 h	0,022	0,027	0,025	5,71
4 h	0,016	0,018	0,017	3,97
8 h	0,013	0,015	0,014	3,27

Tabela 1.2 - Valores de absorvância observados após aplicação de verniz contendo xilitol 20% em diferentes tempos de coleta salivar

Tempo	Análise 3 (20%)	Análise 4 (20%)	Valor médio absorvância	Valor médio [xilitol] mg/L
Baseline	0,022	0,023	0,023	5,24
5 min	0,372	0,379	0,376	87,50
10 min	0,354	0,341	0,348	81,03
15 min	0,236	0,233	0,235	54,7
30 min	0,094	0,104	0,099	23,00
1 h	0,070	0,076	0,073	17,02
1h30min	0,059	0,082	0,071	16,40
2 h	0,034	0,026	0,030	7,00
4 h	0,027	0,027	0,027	6,30
8 h	0,072	0,007	0,0405	9,21

Voluntário 2

Tabela 2.1 - Valores de absorvância observados após aplicação de verniz contendo xilitol 10% em diferentes tempos de coleta salivar

Tempo	Análise 1 (10%)	Análise 2 (10%)	Valor médio absorvância	Valor médio [xilitol] mg/L
Baseline	0,020	0,065	0,043	9,91
5 min	0,233	0,249	0,241	56,20
10 min	0,183	0,181	0,182	42,40
15 min	0,129	0,128	0,129	30,00
30 min	0,052	0,063	0,059	13,40
1 h	0,038	0,048	0,043	10,02
1h30min	0,038	0,034	0,036	8,40
2 h	0,032	0,034	0,033	7,70
4 h	0,019	0,017	0,018	4,20
8 h	0,012	0,012	0,012	2,80

Tabela 2.2 - Valores de absorvância observados após aplicação de verniz contendo xilitol 20% em diferentes tempos de coleta salivar

Tempo	Análise 3 (20%)	Análise 4 (20%)	Valor médio absorvância	Valor médio [xilitol] mg/L
Baseline	0,023	0,025	0,024	5,60
5 min	0,477	0,516	0,497	115,80
10 min	0,208	0,206	0,207	48,30
15 min	0,207	0,217	0,212	49,40
30 min	0,096	0,116	0,106	24,80
1 h	0,058	0,057	0,059	13,40
1h30min	0,042	0,052	0,047	11,00
2 h	0,037	0,03	0,034	7,80
4 h	0,021	0,023	0,022	5,13
8 h	0,014	0,016	0,015	3,50

Voluntário 3

Tabela 3.1 - Valores de absorvância observados após aplicação de verniz contendo xilitol 10% em diferentes tempos de coleta salivar

Tempo	Análise 1 (10%)	Análise 2 (10%)	Valor médio absorvância	Valor médio [xilitol] mg/L
Baseline	0,038	0,033	0,036	8,28
5 min	0,608	0,602	0,605	141,00
10 min	0,607	0,61	0,609	141,90
15 min	0,584	0,574	0,579	135,00
30 min	0,338	0,384	0,361	84,20
1 h	0,185	0,192	0,189	44,00
1h30min	0,172	0,178	0,175	40,90
2 h	0,089	0,087	0,088	20,52
4 h	0,07	0,064	0,067	15,70
8 h	0,059	0,067	0,063	14,70

Tabela 3.2 - Valores de absorvância observados após aplicação de verniz contendo xilitol 20% em diferentes tempos de coleta salivar

Tempo	Análise 3 (20%)	Análise 4 (20%)	Valor médio absorvância	Valor médio [xilitol] mg/L
Baseline	0,045	0,041	0,043	10,00
5 min	0,575	0,576	0,576	134,20
10 min	0,565	0,599	0,582	135,80
15 min	0,323	0,553	0,438	102,15
30 min	0,184	0,177	0,181	42,09
1 h	0,188	0,170	0,179	41,80
1h30min	0,155	0,092	0,124	28,80
2 h	0,105	0,091	0,098	22,80
4 h	0,048	0,035	0,042	9,70
8 h	0,035	0,032	0,034	7,80

Voluntário 4

Tabela 4.1 - Valores de absorvância observados após aplicação de verniz contendo xilitol 10% em diferentes tempos de coleta salivar

Tempo	Análise 1 (10%)	Análise 2 (10%)	Valor médio absorvância	Valor médio [xilitol] mg/L
Baseline	0,051	0,033	0,042	9,80
5 min	0,576	0,545	0,561	130,70
10 min	0,559	0,567	0,563	131,30
15 min	0,402	0,463	0,433	100,80
30 min	0,282	0,297	0,290	67,50
1 h	0,132	0,126	0,129	30,00
1h30min	0,053	0,083	0,068	15,90
2 h	0,047	0,073	0,060	14,00
4 h	0,036	0,037	0,037	8,52
8 h	0,039	0,039	0,0390	9,00

Tabela 4.2 - Valores de absorvância observados após aplicação de verniz contendo xilitol 20% em diferentes tempos de coleta salivar

Tempo	Análise 3 (20%)	Análise 4 (20%)	Valor médio absorvância	Valor médio [xilitol] mg/L
Baseline	0,003	0,042	0,023	5,25
5 min	0,633	0,680	0,657	153,00
10 min	0,665	0,767	0,716	167,00
15 min	0,627	0,651	0,639	149,00
30 min	0,363	0,408	0,386	90,00
1 h	0,154	0,193	0,174	40,50
1h30min	0,092	0,153	0,123	28,50
2 h	0,093	0,181	0,137	32,00
4 h	0,043	0,102	0,073	17,00
8 h	0,059	0,324	0,192	44,60

Voluntário 5

Tabela 5.1 - Valores de absorvância observados após aplicação de verniz contendo xilitol 10% em diferentes tempos de coleta salivar

Tempo	Análise 1 (10%)	Análise 2 (10%)	Valor médio absorvância	Valor médio [xilitol] mg/L
Baseline	0,039	0,034	0,036	8,50
5 min	0,604	0,610	0,607	141,50
10 min	0,601	0,602	0,602	140,20
15 min	0,573	0,578	0,576	134,20
30 min	0,414	0,408	0,411	95,80
1 h	0,202	0,210	0,206	48,00
1h30min	0,188	0,184	0,186	43,40
2 h	0,090	0,084	0,080	20,30
4 h	0,070	0,068	0,069	16,09
8 h	0,068	0,067	0,068	15,70

Tabela 5.2 - Valores de absorvância observados após aplicação de verniz contendo xilitol 20% em diferentes tempos de coleta salivar

Tempo	Análise 3 (20%)	Análise 4 (20%)	Valor médio absorvância	Valor médio [xilitol] mg/L
Baseline	0	0	0	0
5 min	0,354	0,423	0,389	90,60
10 min	0,229	0,229	0,229	53,40
15 min	0,163	0,175	0,169	39,50
30 min	0,158	0,167	0,163	37,90
1 h	0,084	0,09	0,087	20,30
1h30min	0,062	0,072	0,067	15,70
2 h	0,030	0,034	0,032	7,47
4 h	0,018	0,018	0,018	4,20
8 h	0,007	0,007	0,007	1,60

Voluntário 6

Tabela 6.1 - Valores de absorvância observados após aplicação de verniz contendo xilitol 10% em diferentes tempos de coleta salivar

Tempo	Análise 1 (10%)	Análise 2 (10%)	Valor médio absorvância	Valor médio [xilitol] mg/L
Baseline	0	0	0	0
5 min	0,166	0,157	0,162	37,70
10 min	0,077	0,080	0,079	18,30
15 min	0,076	0,074	0,075	17,40
30 min	0,051	0,056	0,054	12,50
1 h	0,033	0,033	0,033	7,70
1h30min	0,016	0,016	0,016	3,73
2 h	0,014	0,016	0,015	3,50
4 h	0,008	0,008	0,008	1,87
8 h	0,004	0,003	0,004	0,81

Tabela 6.2 - Valores de absorvância observados após aplicação de verniz contendo xilitol 20% em diferentes tempos de coleta salivar

Tempo	Análise 3 (20%)	Análise 4 (20%)	Valor médio absorvância	Valor médio [xilitol] mg/L
Baseline	0	0,011	0,006	1,28
5 min	0,284	0,287	0,286	66,60
10 min	0,228	0,222	0,225	52,50
15 min	0,160	0,171	0,166	38,60
30 min	0,023	0,026	0,025	5,71
1 h	0,011	0,015	0,013	3,03
1h30min	0,005	0,019	0,012	2,80
2 h	0,007	0,009	0,008	1,87
4 h	0,002	0,003	0,003	0,58
8 h	0	0,008	0,004	0,90

Voluntário 7

Tabela 7.1 - Valores de absorvância observados após aplicação de verniz contendo xilitol 10% em diferentes tempos de coleta salivar

Tempo	Análise 1 (10%)	Análise 2 (10%)	Valor médio absorvância	Valor médio [xilitol] mg/L
Baseline	0,001	0,006	0,004	0,80
5 min	0,243	0,253	0,248	58,00
10 min	0,201	0,210	0,206	48,00
15 min	0,188	0,184	0,186	43,40
30 min	0,040	0,039	0,040	9,21
1 h	0,015	0,020	0,018	4,08
1h30min	0,012	0,012	0,012	2,80
2 h	0,004	0,004	0,004	0,90
4 h	0,003	0,002	0,003	0,58
8 h	0	0,003	0,002	0,35

Tabela 7.2 - Valores de absorvância observados após aplicação de verniz contendo xilitol 20% em diferentes tempos de coleta salivar

Tempo	Análise 3 (20%)	Análise 4 (20%)	Valor médio absorvância	Valor médio [xilitol] mg/L
Baseline	0,004	0,002	0,003	0,70
5 min	0,535	0,553	0,544	127,00
10 min	0,275	0,268	0,272	63,30
15 min	0,125	0,137	0,131	30,50
30 min	0,071	0,071	0,071	16,50
1 h	0,045	0,05	0,048	11,00
1h30min	0,029	0,03	0,030	6,90
2 h	0,014	0,012	0,013	3,00
4 h	0,001	0,004	0,003	0,58
8 h	0,002	0	0,001	0,23

Voluntário 8

Tabela 8.1 - Valores de absorvância observados após aplicação de verniz contendo xilitol 10% em diferentes tempos de coleta salivar

Tempo	Análise 1 (10%)	Análise 2 (10%)	Valor médio absorvância	Valor médio [xilitol] mg/L
Baseline	0	0	0	0
5 min	0,161	0,183	0,172	40,10
10 min	0,057	0,049	0,053	12,30
15 min	0,062	0,057	0,060	13,90
30 min	0,061	0,053	0,057	13,30
1 h	0,029	0,027	0,028	6,53
1h30min	0,022	0,022	0,022	5,14
2 h	0,019	0,015	0,017	3,96
4 h	0,008	0,008	0,008	1,80
8 h	0,009	0,005	0,007	1,60

Tabela 8.2 - Valores de absorvância observados após aplicação de verniz contendo xilitol 20% em diferentes tempos de coleta salivar

Tempo	Análise 3 (20%)	Análise 4 (20%)	Valor médio absorvância	Valor médio [xilitol] mg/L
Baseline	0	0	0	0
5 min	0,286	0,325	0,306	71,24
10 min	0,100	0,107	0,104	24,13
15 min	0,071	0,076	0,074	17,10
30 min	0,049	0,046	0,048	11,00
1 h	0,031	0,034	0,033	7,58
1h30min	0,020	0,026	0,023	5,40
2 h	0,018	0,016	0,017	4,00
4 h	0,005	0,005	0,005	1,16
8 h	0	0	0	0

Voluntário 9

Tabela 9.1 - Valores de absorvância observados após aplicação de verniz contendo xilitol 10% em diferentes tempos de coleta salivar

Tempo	Análise 1 (10%)	Análise 2 (10%)	Valor médio absorvância	Valor médio [xilitol] mg/L
Baseline	0,003	0,008	0,006	1,28
5 min	0,284	0,279	0,281	65,70
10 min	0,253	0,261	0,257	60,00
15 min	0,201	0,201	0,201	47,00
30 min	0,101	0,102	0,102	23,70
1 h	0,018	0,02	0,019	4,45
1h30min	0,018	0,012	0,015	3,50
2 h	0,004	0,006	0,005	1,16
4 h	0,003	0,006	0,005	1,05
8 h	0,001	0,003	0,002	0,47

Tabela 9.2 - Valores de absorvância observados após aplicação de verniz contendo xilitol 20% em diferentes tempos de coleta salivar

Tempo	Análise 3 (20%)	Análise 4 (20%)	Valor médio absorvância	Valor médio [xilitol] mg/L
Baseline	0,004	0,002	0,003	0,70
5 min	0,635	0,628	0,631	147,30
10 min	0,388	0,392	0,39	91,00
15 min	0,215	0,222	0,218	51,00
30 min	0,105	0,108	0,106	25,00
1 h	0,089	0,092	0,090	21,10
1h30min	0,033	0,032	0,0325	7,58
2 h	0,016	0,018	0,017	3,96
4 h	0,01	0,04	0,025	5,83
8 h	0,002	0,002	0,002	0,47

Voluntário 10

Tabela 10.1 - Valores de absorvância observados após aplicação de verniz contendo xilitol 10% em diferentes tempos de coleta salivar

Tempo	Análise 1 (10%)	Análise 2 (10%)	Valor médio absorvância	Valor médio [xilitol] mg/L
Baseline	0,051	0,033	0,042	9,80
5 min	0,535	0,562	0,5485	128,00
10 min	0,489	0,478	0,483	112,80
15 min	0,402	0,463	0,433	100,80
30 min	0,201	0,201	0,201	46,80
1 h	0,132	0,126	0,129	30,00
1h30min	0,081	0,084	0,083	19,20
2 h	0,040	0,040	0,040	9,30
4 h	0,037	0,036	0,037	8,52
8 h	0,020	0,024	0,022	5,13

Tabela 10.2 - Valores de absorvância observados após aplicação de verniz contendo xilitol 20% em diferentes tempos de coleta salivar

Tempo	Análise 3 (20%)	Análise 4 (20%)	Valor médio absorvância	Valor médio [xilitol] mg/L
Baseline	0,051	0,042	0,047	10,84
5 min	0,688	0,694	0,691	161,15
10 min	0,679	0,681	0,680	158,50
15 min	0,651	0,627	0,639	149,00
30 min	0,458	0,463	0,460	107,30
1 h	0,301	0,322	0,312	72,64
1h30min	0,154	0,161	0,157	36,70
2 h	0,190	0,130	0,160	37,30
4 h	0,060	0,084	0,070	16,30
8 h	0,059	0,036	0,043	10,00

ANEXO C - Tabela indicando as contagens iniciais (1) e finais (2) de estreptococos do grupo mutans e estreptococos totais.

Criança	Grupo	Grupo mutans (1)	Grupo mutans (2)	Estreptococos totais (1)	Estreptococos totais (2)
1	1	$6,2 \times 10^6$	$7,6 \times 10^6$	$8,9 \times 10^6$	$9,2 \times 10^6$
2	1	5×10^5	$9,7 \times 10^5$	$7,0 \times 10^6$	$1,7 \times 10^6$
3	1	$3,6 \times 10^5$	$1,5 \times 10^6$	$5,2 \times 10^5$	$1,8 \times 10^6$
4	1	$3,0 \times 10^6$	$2,8 \times 10^6$	$3,5 \times 10^6$	$5,3 \times 10^6$
5	2	$3,5 \times 10^6$	$1,3 \times 10^6$	$3,6 \times 10^6$	$2,5 \times 10^6$
6	2	$1,0 \times 10^6$	$4,9 \times 10^6$	$1,3 \times 10^7$	$7,6 \times 10^6$
7	2	$5,8 \times 10^6$	$2,3 \times 10^7$	$6,5 \times 10^6$	$29,1 \times 10^6$
8	2	$3,1 \times 10^6$	$7,2 \times 10^5$	$5,9 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6$
9	1	$8,5 \times 10^5$	$5,1 \times 10^6$	$9,4 \times 10^5$	$5,6 \times 10^6$
10	1	$2,6 \times 10^6$	$2,5 \times 10^6$	$3,1 \times 10^6$	$2,7 \times 10^6$
11	1	$3,5 \times 10^6$	$6,3 \times 10^5$	$4,0 \times 10^6$	$7,1 \times 10^5$
12	2	$5,3 \times 10^6$	$2,9 \times 10^5$	$6,5 \times 10^6$	$5,3 \times 10^6$
13	1	$4,2 \times 10^6$	$2,9 \times 10^7$	$5,1 \times 10^6$	$36,3 \times 10^6$
14	1	$2,5 \times 10^6$	$4,7 \times 10^6$	$2,6 \times 10^6$	$5,8 \times 10^6$
15	2	$1,0 \times 10^6$	$4,9 \times 10^5$	$1,8 \times 10^6$	$8,2 \times 10^6$
16	1	$2,7 \times 10^6$	$4,3 \times 10^6$	$3,0 \times 10^6$	$4,5 \times 10^6$
17	2	$1,8 \times 10^6$	$3,9 \times 10^5$	$1,9 \times 10^6$	$9,8 \times 10^6$
18	2	$9,3 \times 10^5$	$1,5 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$	$1,7 \times 10^6$

Criança	Grupo	Grupo mutans (1)	Grupo mutans (2)	Estreptococos totais (1)	Estreptococos totais (2)
19	2	$5,2 \times 10^6$	$6,3 \times 10^6$	$5,7 \times 10^6$	$10,3 \times 10^6$
20	1	$3,3 \times 10^6$	$3,9 \times 10^6$	$3,5 \times 10^6$	$4,2 \times 10^6$
21	2	$2,3 \times 10^6$	5×10^6	$2,6 \times 10^6$	$5,9 \times 10^6$
22	1	$1,8 \times 10^6$	$2,8 \times 10^6$	$2,0 \times 10^6$	$3,2 \times 10^6$
23	1	$1,7 \times 10^6$	$9,5 \times 10^6$	$1,8 \times 10^6$	$11,6 \times 10^6$
24	1	$1,7 \times 10^6$	$2,8 \times 10^6$	$2,1 \times 10^6$	$3,6 \times 10^6$
25	2	$3,0 \times 10^6$	$4,3 \times 10^6$	$3,3 \times 10^6$	$5,2 \times 10^6$
26	2	$3,2 \times 10^6$	$1,4 \times 10^6$	$3,8 \times 10^6$	$2,1 \times 10^6$
27	2	$1,6 \times 10^6$	$2,1 \times 10^6$	$1,7 \times 10^6$	$2,5 \times 10^6$
28	2	$6,2 \times 10^6$	$2,1 \times 10^6$	$9,8 \times 10^6$	$4,1 \times 10^6$
29	1	$4,0 \times 10^6$	$7,8 \times 10^6$	$4,1 \times 10^6$	$8,1 \times 10^7$
30	1	$8,3 \times 10^5$	$5,1 \times 10^5$	$2,4 \times 10^6$	$1,4 \times 10^6$
31	2	$2,3 \times 10^6$	$4,1 \times 10^6$	$2,7 \times 10^6$	$4,6 \times 10^6$
32	1	$9,8 \times 10^5$	$4,8 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6$	$8,5 \times 10^6$
33	2	$2,4 \times 10^6$	$1,4 \times 10^6$	$2,9 \times 10^6$	$3,3 \times 10^5$
34	2	$2,6 \times 10^6$	$1,3 \times 10^6$	$3,4 \times 10^6$	$2,4 \times 10^6$
35	1	$8,7 \times 10^5$	$2,1 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$	$2,7 \times 10^6$
36	1	$4,8 \times 10^6$	$5,1 \times 10^6$	$4,9 \times 10^6$	$5,7 \times 10^6$
37	2	$6,8 \times 10^6$	$9,2 \times 10^6$	$8,6 \times 10^6$	$10,2 \times 10^6$
38	1	$3,5 \times 10^6$	$5,1 \times 10^6$	$3,9 \times 10^6$	$5,7 \times 10^6$

Criança	Grupo	Grupo mutans (1)	Grupo mutans (2)	Estreptococos totais (1)	Estreptococos totais (2)
39	2	$7,2 \times 10^6$	$4,8 \times 10^6$	$8,0 \times 10^6$	$8,5 \times 10^6$
40	1	$3,1 \times 10^6$	$1,4 \times 10^7$	$4,4 \times 10^6$	$1,7 \times 10^7$
41	2	$2,2 \times 10^6$	$8,2 \times 10^6$	$2,5 \times 10^6$	$9,2 \times 10^6$
42	1	$2,6 \times 10^6$	$4,3 \times 10^6$	$2,8 \times 10^6$	$4,5 \times 10^6$
43	2	$3,3 \times 10^6$	$2,1 \times 10^7$	$3,7 \times 10^6$	$2,6 \times 10^7$
44	1	$4,6 \times 10^6$	$4,7 \times 10^6$	$5,7 \times 10^6$	$5,7 \times 10^6$
45	2	$2,2 \times 10^6$	1×10^6	$2,6 \times 10^6$	$1,7 \times 10^6$
46	1	$1,0 \times 10^7$	$6,7 \times 10^6$	$1,2 \times 10^7$	$7,3 \times 10^6$
47	2	$2,6 \times 10^6$	1×10^6	$2,8 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6$
48	2	$4,4 \times 10^6$	$1,4 \times 10^6$	$5,0 \times 10^6$	$3,2 \times 10^6$
49	1	$1,8 \times 10^6$	$8,5 \times 10^6$	$2,1 \times 10^6$	$9,7 \times 10^6$
50	1	$3,6 \times 10^5$	$2,9 \times 10^6$	$6,5 \times 10^5$	$3,3 \times 10^6$
51	2	$8,0 \times 10^5$	$7,2 \times 10^5$	$1,3 \times 10^6$	$8,2 \times 10^5$
52	1	$2,0 \times 10^6$	$5,8 \times 10^6$	$2,5 \times 10^6$	$7,1 \times 10^6$
53	2	$1,4 \times 10^6$	$1,3 \times 10^7$	$3,7 \times 10^6$	$1,7 \times 10^7$
54	1	$1,5 \times 10^6$	$1,6 \times 10^6$	$4,6 \times 10^6$	$2,9 \times 10^6$
55	1	$2,1 \times 10^6$	$6,8 \times 10^5$	$2,9 \times 10^6$	$1,3 \times 10^6$
56	2	$4,4 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6$	$5,0 \times 10^6$	$9,2 \times 10^6$
57	2	$4,0 \times 10^6$	$2,6 \times 10^6$	$4,4 \times 10^6$	$3,5 \times 10^6$
58	2	$3,4 \times 10^6$	$7,1 \times 10^6$	$4,4 \times 10^6$	$8,6 \times 10^6$

Criança	Grupo	Grupo mutans (1)	Grupo mutans (2)	Estreptococos totais (1)	Estreptococos totais (2)
59	2	$2,3 \times 10^6$	$3,7 \times 10^6$	$2,5 \times 10^6$	$4,2 \times 10^6$
60	1	$1,2 \times 10^6$	$3,6 \times 10^6$	$1,7 \times 10^6$	$4,3 \times 10^6$
61	2	$1,3 \times 10^6$	$6,5 \times 10^5$	$1,6 \times 10^6$	$8,1 \times 10^5$
62	1	$1,4 \times 10^6$	$8,8 \times 10^5$	$2,1 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6$
63	2	$2,7 \times 10^6$	$3,1 \times 10^6$	$3,1 \times 10^6$	$3,6 \times 10^6$
64	1	$3,1 \times 10^6$	$2,1 \times 10^6$	$3,7 \times 10^6$	$4,0 \times 10^6$
65	2	8×10^6	$2,1 \times 10^6$	$9,1 \times 10^6$	$2,8 \times 10^6$
66	2	$6,5 \times 10^6$	$9,9 \times 10^6$	$7,5 \times 10^6$	$10,7 \times 10^6$
67	2	$6,7 \times 10^7$	$3,8 \times 10^7$	$7,7 \times 10^7$	$4,2 \times 10^7$