

ALESSANDRO DIOGO DE CARLI

**CAPACIDADE ANTIBACTERIANA DA PRÓPOLIS DE
Apis mellifera ASSOCIADA AO FLUORETO DE SÓDIO NO
CONTROLE DO BIOFILME DENTAL**

CAMPO GRANDE
2007

ALESSANDRO DIOGO DE CARLI

**CAPACIDADE ANTIBACTERIANA DA PRÓPOLIS DE
Apis mellifera ASSOCIADA AO FLUORETO DE SÓDIO NO
CONTROLE DO BIOFILME DENTAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para a obtenção do Título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Zárate Pereira

CAMPO GRANDE
2007

FOLHA DE APROVAÇÃO

ALESSANDRO DIOGO DE CARLI

CAPACIDADE ANTIBACTERIANA DA PRÓPOLIS DE *Apis mellifera* ASSOCIADA AO FLUORETO DE SÓDIO NO CONTROLE DO BIOFILME DENTAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para a obtenção do Título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Zárate Pereira

Aprovada em _____ de _____ de _____, pela Comissão Examinadora.

Prof. Dr. Paulo Zárate Pereira - UFMS

Prof. Dr. Pedro Antonio González Hernández – ULBRA / RS

Prof. Dr. Pedro Gregol da Silva - UFMS

De Carli, Alessandro Diogo.

Capacidade antibacteriana da própolis de *Apis mellifera* associada ao fluoreto de sódio no controle do biofilme dental / Alessandro Diogo De Carli; – Campo Grande, 2007.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Antibacterial ability of propolis from *Apis mellifera* associated to sodium fluoride on dental's biofilm control.

Descritores: 1. Fluoreto. 2. Própolis. 3. *Streptococcus mutans*

DEDICATÓRIA

A construção dos sonhos vai muito além da pura e simples realização das nossas vontades, pois almejar algo não é o bastante para edificá-lo. É preciso a conjunção de fatores que favoreçam o desenrolar positivo de nossas tomadas de decisão. No dia 21 de fevereiro de 2006, liguei para a casa dos meus pais dando a notícia que havia sido aprovado na seleção para o Mestrado...difícil caminho a escolher...continuar com as certezas já conquistadas, ou se lançar ao novo...as palavras certas vieram do Sul: "...Filho, tu deves fazer o que o teu coração mandar. Nós te apoiaremos seja qual for a tua decisão...".

Assim, meu pai Waldemar e Therezinha e, posteriormente, minha irmã Marisa, me ajudaram a esclarecer a dúvida inicial e criar coragem para apostar em uma nova conquista, um novo objetivo: a docência. Por isso, dedico esse trabalho à vocês três que me ensinaram e ainda me ensinam (como bons professores que são), o verdadeiro valor da honestidade, do respeito e do amor incondicional...pois, lembrando Lya Luft:

"...Ensinaram-me desde cedo que minha liberdade era essencial, que se ligava à minha dignidade, e que eu seria responsável por minhas escolhas. Mais: eu sabia que mesmo se tudo desse errado alguém sempre estaria ali para mim".

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo apoio constante e pela compreensão.

À **Melina**, que me entende, ou se esforça para isso...pela paciência quando estive ansioso, ausente e pouco amistoso...és um ponto de equilíbrio na nossa história.

À minha prima **Prof^a. Ms. Grasiela De Carli**, colega de profissão e de sonhos...pelas opiniões sensatas, críticas e pontuais.

Aos professores **Valéria Rodrigues de Lacerda** e **Edílson José Zafalon**, colegas da disciplina de Odontologia em Saúde Coletiva da FAODO / UFMS, pelos ensinamentos e bate-papos tranquilizadores...vocês são muito especiais.

À **Prof^a. Dr^a. Sônia Maria Fernandes** e aos **Técnicos do Laboratório de Microbiologia / UFMS – Geraldo e Roni**, pela colaboração na fase laboratorial da pesquisa.

À **Prof^a. Ms. Sônia Yara de Mello Francelino**, pelo empréstimo do equipamento odontológico portátil.

À **Andréa Melani** e **Fabiano Regalado**, colegas do Mestrado, pela troca de experiências e divisão de tarefas.

Ao químico **Diego Pavanelli**, pela disponibilidade em me auxiliar na obtenção do extrato de própolis nos Laboratórios do Departamento de Química / UFMS.

Ao **Prof. Ms. Lothar Peters**, do Departamento de Farmácia e Bioquímica / UFMS, pela manipulação dos géis experimentais.

Às **crianças**, que pacientemente participaram do experimento.

À **Direção da Escola Municipal Antônio José Paniago**, que foi muito solícita à realização da pesquisa no ambiente escolar.

À **Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**.

À **Fundect**, pelo fomento à pesquisa.

Para finalizar, faço um agradecimento especial ao meu orientador **Prof. Dr. Paulo Zárate-Pereira**.

Primeiramente por ter acreditado em mim, que não sou de Campo Grande e nem fui seu aluno na Graduação, e mesmo assim se dispôs a guiar os meus primeiros passos em direção à docência, quando permitiu que eu participasse das aulas práticas como colaborador e no dia 10 de novembro de 2005, uma quinta-feira, consentiu que eu ministrasse a minha primeira aula teórica, sobre Vigilância Sanitária, para os alunos do então terceiro ano da FAODO/UFMS. Como orientador, suas observações sempre exatas e pertinentes transmitem aquela tranquilidade que é tão necessária para quem está começando...principalmente quando o “iniciante” é por demais ansioso...Como colega da disciplina de OSC, você se revelou um excelente amigo. Obrigado por tudo que tens feito, *por enquanto!*

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Aspectos Epidemiológicos da Cárie Dentária.....	16
2.1.1 Cárie Dentária: um Problema de Saúde Pública.....	16
2.1.2 Levantamentos epidemiológicos em Saúde bucal no Brasil: a Desigualdade Quantificada.....	18
2.2 Cárie Dentária.....	21
2.2.1 Aspectos Conceituais.....	21
2.2.2 Aspectos Microbianos.....	22
2.2.3 Cariogenicidade de <i>Streptococcus mutans</i>	26
2.2.4 O Processo DES-RE e a Formação da Lesão de Cárie.....	28
2.3 A Placa Bacteriana como um Biofilme.....	30
2.3.1 Formação do Biofilme Dental.....	32
2.3.2 Aspectos Ecológicos.....	34
2.4 Risco e Atividade de Cárie.....	36
2.5 Controle Químico do Biofilme Dental.....	39
2.5.1 Indicações.....	42
2.5.2 Flúor.....	43
2.5.2.1 O Microambiente Bucal e o Flúor.....	44
2.5.2.2 O Esmalte, o Ambiente Bucal e o Flúor.....	50
2.5.3 Própolis.....	56
2.5.3.1 A Própolis como Antimicrobiano.....	56
2.5.3.2 A Utilização da Própolis na Odontologia.....	57
3 PROPOSIÇÃO	64

4 MATERIAL E MÉTODO	65
4.1 Obtenção do Extrato Etanólico De Própolis (EEP).....	65
4.2 Preparação dos Géis.....	65
4.3 Seleção da Amostra.....	66
4.4 Análise Microbiológica.....	67
4.5 Delineamento do Estudo.....	69
4.6 Tratamento Estatístico.....	70
5 RESULTADOS	71
5.1 Análise Microbiológica.....	71
5.2 Manchas Brancas.....	72
5.3 Acúmulo de Biofilme.....	73
6 DISCUSSÃO	75
6.1 Ação dos Géis sobre SM.....	77
6.2 Inativação de Manchas Brancas.....	78
6.3 Biofilme.....	79
7 CONCLUSÕES	82
REFERÊNCIAS	83
ANEXOS	
APÊNDICES	
ABSTRACT	

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1 - UFC de <i>Streptococcus mutans</i>	68
Figura 4.2 - Relação entre as UFC contadas/cm ² , UFC/ mL de saliva e <i>status</i> de risco à cárie	69
Figura 4.3 – Delineamento da fase experimental	70

LISTA DE TABELAS

- Tabela 5.1 - Média (\pm DP) de UFC / mL de saliva de SM dos Grupos I e II, Antes e após as aplicações dos Géis A e B. Campo Grande – MS, 2007 (n=97). 71
- Tabela 5.2 – Diferença entre as médias de UFC/mL de saliva de SM dos Grupo I e II, nos diferentes períodos. Campo Grande – MS, 2007 (n=97)..... 72
- Tabela 5.3 - Distribuição de manchas brancas ativas, antes e após as aplicações dos géis, nos Grupos I e II. Campo Grande – MS, 2007 (n=97).73
- Tabela 5.4 – Média (\pm DP) do IHO-S₁ e IHO-S₂ para os Grupos I e II. Campo Grande – MS,(n=97)..... 74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ca Cálcio

CaCl₂ Cloreto de cálcio

CaF₂ Fluoreto de cálcio

CBM Concentração bactericida mínima

CIM Concentração inibitória mínima

CLAE Cromatografia líquida de alta eficiência

cm² Centímetro quadrado

CPO-D Cariado, perdido, obturado – dente

DES Desmineralização

DP Desvio Padrão

EEP Extrato etanólico de própolis

EGM Estreptococos do grupo mutans

F Flúor

FA Fluorapatita

FDI Federação Dentária Internacional

FFA Flúor fosfato acidulado

FTF Frutosiltransferase

g grama

GTF Glicosiltransferase

HA Hidroxiapatita

HF Ácido fluorídrico

L litro

mg miligrama

mL mililitro

mM Mili mol

mm milímetro

MSB Mitis salivarius bacitracina

Na₂HPO₄ Fosfato disódico

Na₂SiF₆ Flúor silicato de sódio

NaF Fluoreto de sódio

OMS Organização Mundial da Saúde

P Fósforo

PA Película adquirida

PC Placa cariogênica

PEC_s Polissacarídeos extracelulares

pH Potencial hidrogeniônico

PIC_s Polissacarídeos intracelulares

PNC Placa não-cariogênica

ppm Parte por milhão

qsp Quantidade suficiente para

RE Remineralização

Rpm Rotações por minuto

SFT FEP Sistema fosfotransferase – fosfoenolpiruvato dependente

SM *Streptococcus mutans*

UFC Unidades formadoras de colônia

UFMS Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

UI Unidades internacionais

µm Micrômetro

RESUMO

CAPACIDADE ANTIBACTERIANA DA PRÓPOLIS DE *Apis mellifera* ASSOCIADA AO FLUORETO DE SÓDIO NO CONTROLE DO BIOFILME DENTAL

As propriedades antibacterianas da própolis despertaram o interesse da Odontologia em utilizá-la como meio de controle do biofilme dental. O objetivo deste estudo foi avaliar a ação de um gel de própolis 5% associada ao fluoreto de sódio 0,05% sobre as contagens dos níveis salivares de *Streptococcus mutans*, inativação de manchas brancas e acúmulo do biofilme dental em pacientes de alto risco à cárie. Participaram do estudo 97 crianças que possuíam contagens de Unidades Formadoras de Colônia de *Streptococcus mutans* superiores a 10^6 / mL de saliva. A amostra foi dividida aleatoriamente em dois grupos experimentais: Grupo I (n= 49, Gel A) e Grupo II (n=48, Gel B), realizando-se um ensaio clínico duplo-cego randomizado. Após quatro aplicações tópicas consecutivas do gel experimental (uma vez por semana), os níveis salivares de *Streptococcus mutans* foram avaliados pelo método da espátula; as manchas brancas através da observação clínica e o acúmulo do biofilme pelo Índice de Higiene Oral Simplificado. Os resultados revelaram uma redução significativa ($p < 0,0001$) nos níveis salivares de *Streptococcus mutans* em ambos os grupos, com melhor desempenho do Gel A (Própolis 5% + NaF 0,05%) comparado ao Gel B (Própolis 5%); a mesma situação foi observada em relação à inativação de manchas brancas. O acúmulo do biofilme foi reduzido significativamente ($p < 0,0001$) após a aplicação dos géis, em ambos os grupos, porém, sem diferença significativa entre eles ($p > 0,05$). Concluiu-se que a Própolis 5% acrescida de NaF 0,05% atuou significativamente sobre as contagens salivares de *Streptococcus mutans* e é capaz de reequilibrar o processo DES-RE, inativando manchas brancas. Em relação ao acúmulo do biofilme dental, o desempenho de ambos os géis experimentais foi semelhante.

Descritores: Fluoreto. Própolis. *Streptococcus mutans*.

1 INTRODUÇÃO

A cárie dentária caracteriza-se como um problema de Saúde Pública (CHAVES, 1986). Apesar das alterações ocorridas nas últimas décadas no que se refere a sua prevalência e velocidade de progressão, um número expressivo de lesões encontra-se concentrado em uma pequena parcela da população de crianças e adolescentes (distribuição polarizada da doença), fato que ocorre nos países em desenvolvimento como o Brasil (MEDEIROS e WEYNE, 2001).

Embora o levantamento epidemiológico realizado pelo Ministério da Saúde em 2003 – SB Brasil: Condições de Saúde Bucal da População Brasileira - tenha revelado que o país atingiu a meta proposta pela Organização Mundial da Saúde e Federação Dentária Internacional (OMS/FDI) para o Índice CPO-D aos 12 anos de idade ($CPO-D_{12} \leq 3$), esse resultado não correspondeu à uniformidade da prevalência de cárie em nível nacional, considerando as regiões brasileiras separadamente e as outras faixas etárias que participaram da amostra (BRASIL, 2004).

Tal fato pode ser de fácil compreensão, levando-se em consideração as dimensões continentais do país e as desigualdades marcantes fortemente arraigadas na organização da sociedade brasileira. Reforça-se a isso, o entendimento da cárie como uma doença multifatorial, infecciosa, oportunista e que sofre a influência de fatores determinantes (inerentes às particularidades individuais) e confundidores (relativos aos aspectos socioeconômicos, culturais e de estilo de vida), conforme o modelo conceitual proposto por Fejerskov e Thylstrup em 1995.

O acúmulo do biofilme cariogênico é considerado fator crítico imprescindível para o aparecimento e desenvolvimento da cárie (MALTZ, 2000); daí a importância do controle deste como forma de abordagem terapêutica e preventiva dessa doença.

Quando o controle mecânico é falho e os sítios de estagnação da placa bacteriana não são desorganizados, a formação de um biofilme potencialmente cariogênico é favorecida e as espécies microbianas patológicas são ecologicamente selecionadas, passando a dominar o microambiente bucal,

aumentando o nível das contagens salivares desses microrganismos, fato que expõe o indivíduo a uma situação de risco / atividade da doença exacerbados (MARSH, 1991).

Diante disso, fica indicado o controle químico (adjuvante) do biofilme dental, a fim de auxiliar o paciente na realização de uma higienização bucal compatível com níveis clínicos salutareos. Várias substâncias podem ser utilizadas nesse sentido, sendo os fluoretos os mais abordados nos estudos odontológicos. Nota-se também uma tendência que favorece a utilização de produtos naturais como agentes de controle químico do biofilme bacteriano; dentre esses, destaca-se a própolis.

Como o biofilme dental compreende uma comunidade microbiana complexa, a utilização de um único composto como meio de controle químico pode se revelar insuficiente, tornando necessária a combinação de duas ou mais substâncias a fim de se obter um possível efeito sinérgico entre estas e reduzir efeitos adversos oriundos de produtos químicos utilizados prolongadamente (THYLSTRUP E FEJERSKOV, 1995).

Dentre a ampla literatura científica a respeito dos mecanismos de ação dos fluoretos sobre o biofilme dental, destaca-se o estudo de Hamilton e Bowden (1996), o qual elencou variadas vias de ação dos fluoretos e a relação destes com a prevenção das mudanças nas proporções de microrganismos constituintes da comunidade microbiana bucal. Já a própolis é conhecida desde a antigüidade por suas propriedades antibacteriana, anestésica, antiinflamatória, antifúngica e antioxidante, o que despertou o interesse da Odontologia em utilizá-la, principalmente como antimicrobiano (BURDOCK, 1998).

Vários estudos foram realizados relacionando a utilização terapêutica da própolis no controle da cárie dentária, como descrito por Ikeno e Miyazawa (1991), comprovando que a própolis foi capaz de efetuar a inibição do desenvolvimento de lesões de cárie em animais. Em ensaio *in vivo*, Ota *et al.* (1998) demonstraram a ação antibacteriana da própolis sobre *Streptococcus mutans*, microrganismo considerado crítico na etiopatogenia da cárie dentária. Zárate-Pereira (2003), em estudo *in situ*, verificou que a própolis atuou significativamente sobre o biofilme bacteriano supragengival, alterando sobremaneira as contagens de estreptococos totais, *Streptococcus mutans*,

Lactobacilos e total de bactérias viáveis, além de reduzir a perda mineral na lesão de cárie de esmalte.

A utilização da própolis associada ao flúor no controle do biofilme cariogênico foi investigada por Koo *et al.* (2005). A associação dos elementos comportou-se de maneira positiva, aumentando as propriedades anti-cárie do flúor através de sinergismo químico, reduzindo a formação do biofilme e a virulência de *Streptococcus mutans*, sem alterar a microflora residente.

Assim sendo, é importante avaliar a efetividade da combinação da própolis com o flúor como método terapêutico de controle químico do biofilme dental, a fim de verificar resultados que demonstrem o comportamento desse composto frente a pacientes de alto risco à cárie. Desta maneira, este trabalho teve o objetivo de verificar a ação de um gel de própolis associado ao fluoreto de sódio sobre a formação do biofilme dental e nas contagens de *Streptococcus mutans*, bem como sua possível interferência com o processo de des/remineralização do esmalte.

Confirmando-se a hipótese de atuação significativa do gel experimental sobre o biofilme, estar-se-á perante um produto de efetiva capacidade antimicrobiana e remineralizante, e de mínimo risco de intoxicação aguda, tendo em vista a baixa concentração do fluoreto e a comprovada propriedade antimicrobiana da própolis.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Aspectos Epidemiológicos da Cárie Dentária

2.1.1 Cárie Dentária : um Problema de Saúde Pública

Achados arqueológicos em dentes de crânio de *Homo sapiens* que datam do período Paleolítico mostraram que a cárie dentária acompanhou o homem em sua evolução histórica, chegando a doença a se caracterizar pela sua alta freqüência nas populações (ZHANG, 1982).

Apesar disso, a preocupação com a alta prevalência de cárie na população é considerada recente, tendo em vista a publicação do Conselho do Condado de Londres (1910)¹ *apud* Gelbier e Randall (1982, p.402) evidenciando que, à época, as condições de saúde bucal dos escolares era, de maneira geral, insatisfatória, e quanto mais cuidadosamente esses eram examinados, uma maior quantidade de doença e destruição era encontrada, sendo exceção o encontro de dentes saudáveis. O mesmo relatório apontou que condições orais tão precárias durante a infância poderiam afetar a saúde de modo geral e causar problemas durante a vida adulta.

Assim sendo, devido à grande prevalência da doença e do impacto que a mesma produz na população, a cárie dentária passou a ser considerada um problema de interesse da Saúde Pública. Nesse sentido, Sinai (s/d)², *apud* Chaves (1986), considerou três fatores essenciais para a caracterização de um problema como sendo de Saúde Pública: o fato de o mesmo constituir causa comum de morbidade ou mortalidade; a existência de métodos eficazes para sua prevenção e controle e a utilização inadequada de tais métodos pela comunidade. A cárie dentária enquadra-se nesses requisitos, pois sua freqüência é alta, implicando altos índices de morbidade o que reflete diretamente em seu significado social; possui métodos de prevenção/controle exeqüíveis e, via de

¹ LCC. Dental treatment of children at public elementary schools: special maintance vote. Minutes of proceedings 1910; (3): 496.

² Sinai N. Apontamentos de aula tomados pelo autor na Escola de Saúde Pública da Universidade de Michigan

regra, tais métodos não estão sendo utilizados na extensão devida (CHAVES, 1986).

Além de constituir um problema de Saúde Pública, a cárie pode ser considerada uma doença negligenciada, como apontou Welshman (1988):

“...A saúde dental permanece como uma questão negligenciada da história médica, tanto como um componente importante da morbidade no contexto de vida geral da classe trabalhadora, e como um aspecto sub-pesquisado do desenvolvimento do cuidado à saúde...” tendo em vista que a saúde bucal “...é uma área que revela a conjunção de temas importantes como pobreza, saúde e classe social”(p.327).

A cárie dentária atinge a maioria da população, possui caráter multifatorial e oportunista, caracterizando-se por ser uma condição de alta prevalência, que causa impacto significativo sobre o indivíduo no que se refere à morbidade e qualidade de vida; reflete-se como indicador de saúde em relação ao custo do tratamento, absenteísmo na escola e no trabalho (perda da produtividade), porém, sendo sua prevenção exequível (WATT, 2004).

Ainda em 2004, Marthaler verificou que um declínio significativo ocorreu na frequência da doença em muitos países industrializados, considerando a diminuição substancial dos índices de cárie no Oeste Europeu, embora na Europa Central e do Leste, a prevalência da cárie continue alta, não demonstrando sinais de melhoras; em escala global, somente uma minoria de crianças foram beneficiadas pela prevenção da cárie e pelo acesso aos fluoretos, e ainda assim, “...em alguns países os políticos tendem a pensar que a cárie dentária não é um tópico extenso e urgente; eles até mesmo tranquilizam-se com a ilusão de que o problema tenha sido solucionado para sempre” (MARTHALER, 2004; p.180).

A despeito dos avanços tanto no âmbito técnico-científico quanto no que se refere à qualificação dos recursos humanos na área odontológica, a cárie dentária, no parâmetro populacional, ainda é considerada negligenciada, e para Junqueira *et al.* (2005), a mesma constitui um dos principais problemas de saúde em nível mundial, mesmo possuindo método preventivo conhecido, devido à multifatorialidade de sua etiologia e ao contexto social atribuído ao campo da saúde, os quais dificultam seu controle.

2.1.2 Levantamentos Epidemiológicos em Saúde Bucal no Brasil - a Desigualdade Quantificada

As questões epidemiológicas referidas à saúde bucal são abordadas por uma gama de índices que medem principalmente a prevalência de cárie, doença periodontal, oclusopatias, necessidade de prótese e fluorose dentária.

A produção de dados epidemiológicos em saúde pode ocorrer de duas maneiras: a partir de dados secundários obtidos pelos serviços de saúde ou pela geração de dados primários oriundos de estudos epidemiológicos de corte transversal (levantamentos epidemiológicos), cujos resultados serão utilizados para a definição da prevalência de um agravo, bem como das necessidades de tratamento apresentadas por uma população. Tais instrumentos são ainda pouco utilizados como guias nas ações de saúde bucal no Brasil, tendo em vista que o país recentemente teve a sua disposição uma base de dados de caráter nacional, pois se inseriu tardiamente nesse processo. Enquanto os países desenvolvidos já apresentavam séries históricas de dados epidemiológicos desde as primeiras décadas do século XX, o Brasil efetuou seu primeiro levantamento epidemiológico somente na metade da década de 80 (BRASIL, 1988).

O Levantamento Epidemiológico em Saúde Bucal: Brasil - Zona Urbana 1986, realizado pelo Ministério da Saúde em dezesseis capitais estaduais das cinco macrorregiões brasileiras, analisou a prevalência da cárie dentária em crianças de 6 a 12 anos de idade, dentre outros grupos etários. Na ocasião, observou-se para a idade de 12 anos, que é a idade-índice para a análise do CPO-D¹ indicada pela Organização Mundial de Saúde (OMS), um valor de CPO-D = 6,65, sendo considerado como de alta prevalência. Para a região Centro-Oeste, nesse levantamento, verificou-se um CPO-D = 8,5, o mais alto do país (BRASIL, 1988).

Em 1993, o Serviço Social da Indústria (SESI) realizou um novo levantamento epidemiológico enfocando o grupo etário de crianças de 7 a 14 anos de idade que freqüentavam escolas mantidas pelo SESI e de algumas escolas públicas, de 114 municípios de 22 unidades federativas, abrangendo

¹ Média de dentes cariados, perdidos e obturados.

todas as macrorregiões brasileiras. O estudo revelou para os indivíduos de 12 anos, CPO-D = 4,84, considerado ainda uma alta prevalência (SESI, 1996).

Após dez anos decorridos do primeiro levantamento epidemiológico, o Ministério da Saúde realizou nova pesquisa, envolvendo 27 capitais distribuídas nas macrorregiões do país. O valor do CPO-D encontrado para a idade de 12 anos foi de 3,1, sendo considerado de moderada prevalência. Na região Centro-Oeste, o índice CPO-D à época foi de 2,8 (BRASIL, 1996).

De 1986 à 1996, observou-se uma redução, em nível nacional, nos valores do CPO-D aos 12 anos de idade, condição esta reportada à porcentagem de cobertura dos municípios com água fluoretada (embora ainda considerada insuficiente) e aos dentifrícios fluoretados (BRASIL, 1998).

Narvai *et al.* (1999), ao analisarem os dados referidos ao período de 1986 a 1996, relataram que houve um ganho médio considerável na diminuição da experiência de cárie aos 12 anos, porém, tratando-se de uma média populacional, assinalaram que tal ganho não se configura homogeneamente às macrorregiões do país e a todas as classes sociais, visto que tais números refletem a realidade das zonas urbanas, admitindo-se que possam ser maiores em segmentos socialmente favorecidos em relação à renda e escolaridade, e mais modesto (talvez inexpressivo) em grupos de baixa renda e escolaridade.

Em países desenvolvidos observou-se um declínio geral na prevalência e severidade de cárie nas populações infantis e de adolescentes, onde o CPO-D médio entre os indivíduos de 12 anos está abaixo da meta da OMS para o ano 2000 (CPO-D \leq 3,0) e uma alta proporção de lesões se concentra em um número baixo de crianças e adolescentes, fenômeno conhecido como distribuição polarizada. Nos países subdesenvolvidos / emergentes, o declínio é muito pequeno e a população continua a apresentar altos níveis da doença. No caso do Brasil, há uma importante redução no CPO-D de escolares de zonas urbanas, no entanto, esse declínio não é homogêneo nem expressivo o suficiente como procuram afirmar informações amplamente divulgadas. Assim sendo, não parece correto / adequado extrapolar tais achados para a situação do Brasil de modo geral, tendo em vista as desigualdades e iniquidades da verdadeira situação odontológica global dos brasileiros (MEDEIROS e WEYNE, 2001).

Em 2003, o Ministério da Saúde realizou o Projeto SB Brasil: Condições de Saúde Bucal da População Brasileira, englobando 250 municípios, 50 em cada região, incluindo cidades de portes populacionais diversos, além da zona rural. Esse levantamento teve como estratégia a observação do perfil epidemiológico em saúde bucal da população nos seus diversos ciclos de vida, a questão da cobertura dos municípios por água fluoretada e também o acesso do usuário aos serviços odontológicos, as condições socioeconômicas e a auto-percepção em saúde bucal. Nesse estudo, o valor do CPO-D observado aos 12 anos de idade foi de 2,78, porém, esse resultado não foi unânime para as macrorregiões analisadas individualmente, tendo em vista que somente as regiões Sul e Sudeste obtiveram valor do índice menor ou igual a 3; a região Centro-oeste obteve CPO-D = 3,16. Em relação ao abastecimento público com água fluoretada, verificou-se que na região Centro-Oeste, dos 50 municípios participantes, apenas 54% o possuíam, enquanto 46% ainda não faziam uso de água fluoretada (BRASIL, 2004).

Apesar das significativas melhoras ocorridas nas últimas décadas, a saúde bucal dos brasileiros continua sendo considerada precária, em função da alta prevalência de cárie. O levantamento epidemiológico realizado pelo Ministério da Saúde em 2003, baseado nas Metas de Saúde para o Ano 2000 da Organização Mundial de Saúde (OMS) e da Federação Dentária Internacional (FDI), revelou índices expressivos de cárie em crianças de 18 meses a 6 anos de idade; uma tendência à redução da prevalência de cárie aos 12 anos (somente nas regiões Sul e Sudeste), sendo essa a única meta atingida (parcialmente) no país; perda dentária precoce grave e um alto índice de edentulismo em adultos de meia idade e em idosos (BUISCHI, 2005).

Observou-se um declínio no valor do CPO-D ao longo dos anos, sendo a explicação mais aceita para tal fato a elevação do acesso à água e dentifrícios fluoretados e as mudanças nos programas de saúde bucal coletiva. Apesar da melhora, a desigualdade marca a distribuição da cárie no país, sendo que os dentes atingidos por cárie concentram-se em uma minoria de indivíduos. A proporção de dentes cariados não tratados não foi alterada, o que revela dificuldades no acesso ao serviço odontológico e a necessidade de minimização de disparidades socioeconômicas que tornam certas faixas populacionais mais vulneráveis, carentes de medidas eficazes de saúde pública, as quais se tornam

um desafio para quem as formulam e implementam. Assim sendo, “...Espera-se que, com esse movimento, seja possível manter o declínio observado no índice CPO-D e, ainda que convivendo com um certo grau de desigualdade na distribuição da doença, eliminar o caráter iníquo dessa desigualdade” (NARVAI *et al.*, 2006; p.392).

2.2 Cárie Dentária

2.2.1 Aspectos Conceituais

Os modelos explicativos acerca da cárie dentária ainda constituem a tentativa de melhor entendimento desse processo patológico, a fim de se atingir métodos terapêuticos/preventivos eficazes para o seu controle.

O primeiro modelo explicativo para a cárie foi elaborado por Keyes (1962), o qual mencionou que, genericamente, para a ocorrência da lesão de cárie era necessária a interação de três fatores operando de maneira concomitante, vindo a ser conhecidos como a Tríade de Keyes: dente (hospedeiro susceptível), microbiota (microorganismos) e substrato (dieta).

Estudos revelaram que a simples existência desses três fatores atuando de maneira conjunta não resultava em desmineralização imediata do tecido dentário. Desse modo, um quarto fator foi adicionado à Tríade de Keyes: o tempo, considerado fundamental para o desenvolvimento da lesão de cárie, fato que gerou o Modelo de Keyes Modificado (NEWBRUN, 1988).

Esses 4 pré-requisitos ficaram conhecidos como fatores etiológicos primários da cárie dentária, enquanto algumas variantes como saliva, flúor e higiene bucal eram considerados secundários / moduladores da doença. Devido à mudança de paradigma ocorrida durante os anos 80 e 90, que passou a entender a cárie como uma afecção mais ampla sob o ponto de vista da Promoção da Saúde, Fejerskov e Thylstrup (1995) propuseram um modelo conceitual mais abrangente para a etiopatogenia da cárie dentária, o qual não considerava somente os agentes causadores (fatores etiológicos primários), mas os determinantes e confundidores do processo saúde-doença que levariam ao surgimento da doença. Assim sendo, os fatores determinantes seriam aqueles concernentes ao ambiente bucal: saliva (fluxo, composição química e capacidade tampão), dieta (frequência do consumo de carboidratos fermentáveis e a

consistência dos mesmos), microrganismos (acidogênicos e acidúricos) e flúor (ausência e presença). Os confundidores corresponderiam ao impacto desempenhado por fatores externos ao ambiente bucal no comportamento da doença, relacionados às condições socioeconômicas, ambientais, culturais e ao estilo de vida.

2.2.2 Aspectos Microbianos:

A concepção de que a cárie dentária era causada pelos microrganismos presentes na placa bacteriana, a qual vinculou a produção de ácidos microbianos a partir dos substratos da dieta à etiologia da doença, com isso instaurando a Teoria Quimioparasitária da Cárie, foi proposta por Miller (1890)¹ *apud* Loesche (1986, p.361). Esse postulado também ficou conhecido como a Hipótese Inespecífica da Placa, pois até então, não havia sido possível associar uma única espécie bacteriana como responsável pelo desenvolvimento da cárie, sendo que, por esse parâmetro, a cárie foi considerada bacteriologicamente inespecífica, isto é, era causada por quaisquer microrganismos acidogênicos presentes na microbiota oral, desde que esses aumentassem em número e se acumulassem sobre a superfície dentária, frente à limpeza inadequada desses sítios.

Achados bacteriológicos demonstraram inicialmente o papel dos lactobacilos na etiologia da cárie, sugerindo serem esses os microrganismos iniciadores da doença, pensamento que predominou até meados da segunda década do século XX. Em contrapartida, Clarke (1924) isolou *Streptococcus mutans* de lesões iniciais de cárie em humanos com maior frequência, quando comparado aos números de lactobacilos, demonstrando que estes, apesar de possuírem características acidúricas e acidogênicas, não eram capazes de se unirem de maneira adequada ao esmalte, enquanto aqueles produziam ácido rapidamente através da fermentação da glicose, lactose, rafinose, manitol, dentre outros carboidratos, e ainda formavam colônias fortemente aderidas à superfície do esmalte, fato que parecia ser de grande importância.

¹Miller WD. The micro-organisms of the human mouth. The SS Withe Manufacturing Co: Philadelphia; 1890.

Em 1960, Keyes demonstrou a natureza transmissível da cárie em *hamsters*, sugerindo que a principal fonte da flora cariogênica para recém-nascidos seria adquirida no período de amamentação, pelo contato destes com as fezes maternas. O mesmo experimento indicou que a atividade de cárie poderia ser induzida pela inoculação de animais livres da doença pela microflora cariogênica ou pelo contato com animais infectados, e que a presença de antibióticos como a penicilina e eritromicina (em níveis utilizados) na dieta poderia suprimir a atividade de cárie.

Em estudos subseqüentes, Edwardsson (1968) e Guggenheim (1968) demonstraram o potencial cariogênico dos *Streptococcus mutans* em ratos gnotobióticos ou em *hamsters* convencionais, que normalmente não possuíam uma microbiota indutora da cárie.

Em seres humanos, Løe (1969) evidenciou que a presença da placa bacteriana constituía o fator desencadeante do desenvolvimento da cárie, ao passo que Ikeda *et al.* (1973) estabeleceram uma forte associação entre a presença de *Streptococcus mutans* e o desenvolvimento inicial das lesões de cárie.

Ao pesquisarem a associação entre *Streptococcus mutans* e a cárie dentária em humanos, Loesche *et al.* (1975) verificaram uma associação positiva entre os níveis dessas bactérias na placa bacteriana e a ocorrência de cárie. Os autores ainda notaram que microrganismos presentes na flora, como outras espécies de *Streptococcus*, *Actinomyces* e *Veillonella* podiam ser importantes modificadores do comportamento dos *Streptococcus mutans* na placa bacteriana.

Assim sendo, Loesche (1976) formulou a Hipótese da Placa Específica, que admitia a existência de algum(ns) grupo(s) de microrganismos notavelmente específicos, os quais seriam os responsáveis pelo desenvolvimento da doença cárie.

No ano seguinte, Minah e Loesche demonstraram as diferenças ecológicas entre a placa cariogênica (PC) e a não-cariogênica (PNC). Na PC foram encontrados altos níveis de *S. mutans* e baixas contagens de *Actinomyces*, enquanto o contrário foi observado na PNC, caracterizada pela freqüente presença de *Streptococcus sanguis* e *Veillonella*, fato que sugeriu existir uma relação de antagonismo entre certas bactérias da PNC e *Streptococcus*

mutans. Os dados desse estudo sustentaram que os *Streptococcus mutans* dominavam metabolicamente a placa associada com as lesões de cárie.

A colonização de dentes humanos por *Streptococcus mutans* em relação a sua concentração salivar e a idade do hospedeiro foi relatada pelo experimento de Duchin e van Houte (1978a). Uma correlação significativamente positiva foi observada entre a alta concentração salivar de *Streptococcus mutans* e o seu isolamento das superfícies dentárias selecionadas, bem como foi detectado que quanto maior a idade do hospedeiro, maiores são as concentrações salivares e na placa bacteriana desse microorganismo.

Duchin e van Houte (1978b) indicaram que a placa bacteriana associada ao desenvolvimento de lesões de cárie incipientes em superfícies lisas ou cavitadas continham proporções significativamente altas de *Streptococcus mutans*, quando comparada à placa que recobria o esmalte clinicamente saudável imediatamente adjacente à lesão de cárie, sugerindo que o início das lesões poderia ocorrer na ausência de lactobacilos sp.

Loesche e Straffon (1979), ao realizarem estudo prospectivo para detectar mudanças nos níveis e proporções de *Streptococcus mutans* antes e durante o desenvolvimento de cárie em fissuras oclusais, verificaram o papel etiológico crucial destes na maioria das lesões de fissura. A análise longitudinal demonstrou que as proporções de *Streptococcus mutans* aumentaram significativamente ao tempo do diagnóstico da cárie e pela comparação do corte transversal ficou evidente que as proporções de desse microorganismo nas fissuras cariadas foram significativamente maiores que nas fissuras livres de cárie.

A especificidade bacteriana na etiologia da cárie dentária foi evidenciada por van Houte (1980), pela observação do fato de que o início do desenvolvimento das lesões cariosas em indivíduos inicialmente livres da doença é associada com a história de infecção oral por *Streptococcus mutans*, enquanto o número de superfícies dentárias infectadas pelo organismo é paralelo à experiência de cárie. Para o autor, essa evidência indicou um considerável grau de especificidade bacteriana no processo de cárie, pois:

“...organismos pertencentes ao grupo dos *S.mutans* devem ser considerados como importantes agentes etiológicos tendo em vista suas características acidogênicas e acidúricas, sua consistente habilidade em causar cárie em modelos animais, sua positiva correlação com o desenvolvimento de cárie em humanos e a sua presença em quase todas, se não todas as placas associadas com superfícies dentárias cárie-ativas.

Esta significância é mais óbvia no caso das placas associadas à cárie que constituem culturas puras destes organismos.” (van Houte, 1980; p.317-18).

Loesche (1986), ao abordar a bacteriologia da cárie dentária, verificou que os *Streptococcus mutans* estariam relacionados com o processo de iniciação da cárie, enquanto os Lactobacilos seriam associados à progressão da lesão.

Lang *et al.* (1987) observaram que os *Streptococcus mutans* desempenham um envolvimento primordial como agentes iniciadores do processo de cárie dentária em humanos, tendo em vista que as contagens desses microrganismos diminuem quando da paralização/regressão da lesão. Para os autores, o ecossistema presente sobre as superfícies dentárias possui uma natureza dinâmica que é refletida no fato de que sítios colonizados com altas proporções de *Streptococcus mutans* podem ser acometidos por desmineralização, permanecerem desmineralizados por anos, podem ser remineralizados ficando descontaminados por prolongado período de tempo. Ficou evidente que o desenvolvimento da cárie é relacionado a uma multiplicidade de fatores que são capazes de modificar o ecossistema oral, concedendo aos microrganismos odontopatógenos a oportunidade de dominar a microbiota nos sítios que favoreçam tal situação. Por esse parâmetro, a cárie dentária poderia ser entendida não somente como uma doença infecciosa e multifatorial, mas como um evento essencialmente oportunista.

Esse conceito foi reforçado por diversos estudos, como o de Buischi *et al.* (1989) que verificaram uma maior prevalência de cárie (manifesta e incipiente) entre crianças em idade escolar que possuíam altos níveis salivares de *Streptococcus mutans*, quando comparadas às crianças com baixos níveis salivares desses microrganismos, revelando assim a importância da oportunidade da infecção por essas bactérias e a possibilidade da existência de condições que favoreçam, de maneira seletiva, a viabilidade destas em relação às outras espécies microbianas que co-existem na cavidade bucal.

A placa bacteriana é constituída de uma microflora rica que abriga os agentes etiológicos específicos causadores da cárie e várias outras espécies de microrganismos, que em situações fisiológicas encontram-se em homeostasia no ecossistema bucal. Nesse sentido, Marsh (1991), ao observar que o acúmulo de

placa, preferencialmente em sítios retentivos em que a higienização oral é dificultada, causa um aumento na massa da placa, levando a uma menor capacidade de penetração da saliva e uma conseqüente diminuição à proteção do esmalte. Propôs o autor que essa sucessão de eventos poderia causar mudanças ambientais, proporcionando a quebra do homeostasia microbiana (pressão ecológica) e a ocorrência de alterações na composição da microflora (massa crítica), predispondo à predominância de bactérias cariogênicas específicas (acidogênicas e acidúricas), devido ao fato de que somente determinadas espécies são competitivas frente às mudanças ocorridas nas condições ambientais (Hipótese da Placa Ecológica).

Assim sendo, Marsh (1994), a fim de exemplificar a Hipótese da Placa Ecológica, apontou que o excesso de açúcar oriundo da dieta pode levar à produção de ácidos causando uma mudança no ambiente bucal de um pH neutro para um pH ácido, fato que gera uma troca ecológica na microbiota residente dominada por *Streptococcus sanguis* e *Streptococcus oralis*, que são relacionados ao processo de remineralização (RE), por outra em que predominam os Estreptococos do Grupo Mutans (EGM) e Lactobacilos (LB), microrganismos que são potencialmente acidúricos e acidogênicos e, portanto, cariogênicos, os quais favorecem o processo de desmineralização (DES), levando aos estágios iniciais e de desenvolvimento da doença cárie, respectivamente, se não controlados.

2.2.3 Cariogenicidade dos *Streptococcus mutans*

Os *Streptococcus mutans* constituem uma das espécies microbianas que fazem parte da microflora anfibiônica da cavidade oral e desempenham papel preponderante na etiopatogenia da cárie.

Para Hamada e Slade (1980), a cariogenicidade dessa espécie microbiana, tanto em humanos como em modelos animais, é devida a fatores de virulência como a habilidade em aderir às superfícies lisas e as suas propriedades acidúricas e acidogênicas. Para os autores, os *Streptococcus mutans* produzem, a partir da degradação metabólica da sacarose pela ação das enzimas Glicosiltransferase (GTF) e Frutossiltransferase (FTF), polissacarídeos extracelulares (PECs), denominados de glucanas e frutanas, e polissacarídeos

intracelulares (PICs) que funcionam como reserva de energia. Esses polissacarídeos, especialmente as glucanas, são considerados fatores críticos para a formação da placa dentária espessa, tendo em vista que são insolúveis em água e possuem uma alta habilidade em promover a aderência bacteriana em superfícies não-descamativas. Além disso, tais microrganismos são capazes de produzir ácidos (principalmente ácido láctico) quando o pH encontra-se em torno de 5,0, caracterizando sua propriedade acidogênica. Nesses valores de pH, a maioria dos microrganismos bucais tornam-se inativos, o que não ocorre com os *Streptococcus mutans*, pois os mesmos são considerados acidúricos, isto é, sobrevivem e continuam operantes em condições ambientais ácidas.

Loesche (1986) evidenciou que uma dieta rica em sacarose, a qual promove a queda do pH salivar para níveis críticos, foi singular em permitir a expressão de virulência máxima dos *Streptococcus mutans* para todas as superfícies dentárias, o que viabilizaria o estabelecimento desses microrganismos na cavidade bucal, tendo em vista que Kristofferson e Birkhed (1987) demonstraram a elevação nas contagens de *Streptococcus mutans* em função do aumento do consumo de sacarose.

A tolerância aos ambientes ácidos, além de atuar como fator de virulência para os *Streptococcus mutans*, é de suma importância nas questões relativas à ecologia da placa bacteriana e da patogênese da cárie que envolve o processo de desmineralização das superfícies dentárias, quando em desafio cariogênico.

Para Belli e Marquis (1991), a cariogenicidade das bactérias constituintes da microflora da placa bacteriana parece depender da tolerância ácida, visto que o ataque ácido sobre o dente, o qual leva à cárie, é diretamente relacionado à extensão e duração da acidificação da placa dental. Com isso, demonstrou-se que os *Streptococcus mutans* possuem dois tipos de adaptação ao ambiente ácido que afetam sua cariogenicidade, especialmente quando o período de acidificação da placa é prolongado: o primeiro seria a tolerância constitutiva inerente a esse grupo de microrganismos (aciduricidade), e a segunda seria uma tolerância adaptativa presente durante a fase de crescimento em ambientes com baixo pH, que ocorre de maneira fisiológica e parece ser progressiva, tornando-se mais acentuada quanto mais baixo o valor do pH e reversível, ao menos para algumas gerações. Porém, a desadaptação ocorre de

maneira mais lenta. Essa adaptação ocorre rapidamente, em cerca de uma geração, tornando-se uma vantagem para a bactéria, não somente para melhorar a função bacteriana em meio ácido, mas para evitar os efeitos letais da acidificação.

Os mesmos autores evidenciaram que esse mecanismo de adaptação é relevante no que se refere à competitividade ecológica microbiana, pois os *Streptococcus mutans* necessitam de um ambiente acidificado para competirem de maneira eficaz com outros organismos menos ácido-tolerantes que co-existem na placa bacteriana. Por este parâmetro, a acidificação prolongada da placa poderia favorecer o aumento dos danos aos tecidos dentários não somente por promover uma desmineralização mais severa, mas também por servir como fator indutor de mudanças adaptativas na microflora da placa, permitindo que baixos valores de pH sejam atingidos, para além daqueles permitidos a organismos não-adaptados, fazendo com que a viabilidade das contagens totais de *Streptococcus mutans* seja assegurada em detrimento de outras espécies bacterianas que atuam antagonicamente ao processo de desmineralização do esmalte, isto é, aquelas que estão presentes no período da remineralização, causando assim um desequilíbrio no ciclo de desmineralização-remineralização (DES-RE).

2.2.4 O Processo DES-RE e a Formação da Lesão de Cárie

Para Loesche (1986), a cárie dentária é iniciada quando o ciclo normal da DES-RE, que ocorre após a ingestão dos alimentos, na subsuperfície do esmalte, é perturbado por eventos que aumentam o desafio ácido ou diminuem as funções protetoras/reparadoras da saliva. Desse modo, faz-se necessário o entendimento da dinâmica do processo DES-RE para a compreensão de como o desequilíbrio desse binômio pode implicar o aparecimento de uma lesão de cárie.

A apatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), que é o sal constituinte do esmalte dentário, ao sofrer inclusão de radicais carboxila e flúor passa a ser denominada de hidroxiapatita (HA) e fluorapatita (FA), respectivamente. A mesma organiza-se em cristais que são densamente agrupados e dispostos em prismas de maneira transversal, caracterizados pelo padrão superficial irregular e ondulado. No esmalte intacto, a água compõe 4% de seu peso, sendo que uma parte desta configura a camada de hidratação (circundando cada cristal de HA e indicando

que estes estão eletricamente carregados), enquanto as partes restantes fazem o preenchimento dos poros inter e intraprisimáticos (diminutos), que formam a principal via de difusão no interior do esmalte. A integridade do esmalte no meio oral é dependente do comportamento químico dos fluidos circundantes, principalmente no que se refere ao pH e às concentrações de cálcio, fosfato e flúor, os quais atuam significativamente sobre a estabilidade da HA. Em situações fisiológicas, os fluidos orais estão supersaturados em relação à HA e à FA, resultando em precipitação de componentes sólidos sobre a superfície dentária (RE). O pH crítico, no qual os fluidos orais encontram-se em condição de saturação em relação à HA e à FA corresponde, respectivamente a 5,5 e 4,5, o que implica a insaturação/subsaturação dos fluidos circundantes quando valores de pH inferiores aos mencionados são atingidos, ocorrendo então a solubilização da HA e da FA (DES) nesta ordem, visto que a FA é menos solúvel que a HA (LARSEN E BRUUN, 1988).

O efeito protetor da saliva (capacidade tampão) é importante para a manutenção do pH dos fluidos circundantes. Para Cury (2001), quando a fase de retorno ao pH fisiológico, que é promovida pela saliva, se sobrepõe aos períodos em que o pH crítico é atingido, ocorre o restabelecimento do equilíbrio do binômio DES-RE. Porém, quando o inverso é observado, os períodos de perda mineral são favorecidos (DES), causando, paulatinamente, uma lesão de cárie. O autor ainda salientou que o pH crítico é diferente para o esmalte e para a dentina, visto que a saliva protege o esmalte até que o pH não atinja valores inferiores a 5,5, enquanto a proteção conferida à dentina se restringe aos valores de pH superiores a 6,5, demonstrando uma maior sensibilidade da dentina frente ao desafio cariogênico.

Para ten Cate *et al.* (2005), a formação da lesão em seu estágio inicial ocorre pela dissolução parcial dos tecidos mineralizados, observando-se uma camada superficial bem mineralizada, enquanto na camada subsuperficial (corpo da lesão) ocorre uma perda mineral de cerca de 30 a 50% em profundidade. Esse padrão da lesão de cárie é explicado pelo fato de que sendo a HA mais solúvel que a FA, e esta localiza-se na camada superficial do esmalte, enquanto aquela situa-se em sua camada subsuperficial. A DES inicia pela solubilização da HA, isto é, a perda mineral ocorre com maior magnitude na subsuperfície do esmalte. Para que ocorra a RE, faz-se necessária a presença de cristais de apatita

parcialmente solubilizados, os quais podem crescer devido à exposição aos fluidos supersaturados em relação à HA, que podem ser obtidos através do controle de fatores ambientais, dentre os quais destacam-se os hábitos dietéticos, o padrão de higienização e o contato com fluoretos.

2.3 A Placa Bacteriana como um Biofilme

Costerton *et al.* (1978) evidenciaram que a temática referente aos biofilmes vem sendo abordada desde o século XVII, porém, sua base conceitual geral não foi promulgada até 1978. A teoria geral dos biofilmes compreende que a maioria das bactérias cresce em biofilmes envoltos por uma matriz aderente às superfícies em qualquer ecossistema aquático que seja auto-suficiente em termos nutricionais, e que esses microrganismos (sésseis) diferem profundamente de seus homólogos planctônicos (flutuantes).

Até a década de 80, os biofilmes eram entendidos como uma massa homogênea, constituída por populações celulares aderentes que continham um número muito maior de células que a população planctônica, nos quais as células bacterianas eram envolvidas por uma matriz de exopolissacarídeos (polissacarídeos extracelulares – PECs) fibrosa e altamente hidratada. Essa matriz desempenhava um papel preponderante como mediadora dos processos de adesão e agregação bacteriana, garantindo a colonização das superfícies (COSTERTON *et al.*, 1987).

Com a utilização de novas técnicas de microscopia na pesquisa envolvendo os biofilmes, o aspecto homogêneo destes foi ultrapassado. Lawrence *et al.* (1991) e Caldwell *et al.* (1992), ao utilizarem microscopia confocal para o conhecimento da ultraestrutura dos biofilmes, verificaram que o biofilme bacteriano crescia em microcolônias (unidades estruturais dos biofilmes), que podem tomar a forma de “torres” ou “cogumelos” envoltos em uma matriz, entremeados por regiões matriciais menos densas, nas quais, segundo Lawrence *et al.* (1993), encontram-se canais de água altamente permeáveis (abertos), que seriam responsáveis pela difusão de nutrientes para o interior dos agregados celulares, enquanto a matriz atuaria como uma barreira de difusão.

O estudo de Costerton *et al.* (1994) demonstrou que os canais de água exibem uma característica penetrante em relação à matriz de

exopolissacarídeos nos biofilmes metabolicamente ativos, possuindo um fluxo convectivo em relação aos microrganismos aderentes e às microcolônias, sendo responsáveis pela biodisponibilidade de nutrientes essenciais ao metabolismo bacteriano, e por outro lado, agindo como facilitadores da permeabilidade de agentes antimicrobianos. A estrutura heterogênea dos biofilmes implica parâmetros fisiológicos também heterogêneos: em biofilmes aeróbicos, os canais de água parecem transportar oxigênio para o interior destes, mas as limitações da difusão e a concomitante utilização do oxigênio pelas próprias bactérias implicam níveis muito baixos desta substância no centro das microcolônias, o que explica a existência, nestes locais, de organismos anaeróbicos facultativos fisiologicamente ativos em biofilmes mistos e em ambientes aeróbicos.

A placa bacteriana passou a ser denominada como um biofilme recentemente. Marsh (1995) a definiu como um biofilme de cultura mista, correspondendo a uma comunidade microbiana tridimensional formada em uma interface que pode tornar-se espacialmente heterogênea devido aos gradientes físico-químicos que se desenvolvem em seu interior.

Para Kolenbrander (2000), o biofilme dental constitui-se de comunidades bacterianas geneticamente distintas (multiespecíficas) que vivem justapostas às superfícies dentárias. A organização espacial das várias espécies bacterianas que compõem o biofilme dental em cada comunidade é única, e quando este é formado sobre superfícies duras, como é o caso do esmalte dentário, pode se acumular em camadas densas de múltiplos microrganismos, atingindo centenas de micrômetros de espessura se a sua desorganização não for efetuada.

Marsh e Nyvad (2005) evidenciaram que a placa bacteriana, entendida como um biofilme, representa um conjunto de comunidades microbianas aderidas a uma superfície, especialmente organizadas em uma estrutura tridimensional embebida por uma matriz de material extracelular derivado das próprias células e do ambiente. Por esse parâmetro, nota-se que as propriedades da comunidade microbiana são mais evidentes que as das espécies isoladas constituintes do biofilme, pois estando essas populações bacterianas próximas umas das outras, elas interagem, causando alterações microambientais que podem ser benéficas para algumas espécies e maléficas (antagonistas) para outras.

2.3.1 Formação do Biofilme Dental

O biofilme dental tem seu processo de formação iniciado a partir da adesão bacteriana às superfícies bucais. Assim sendo, a capacidade de adesão dos microrganismos é considerada como um determinante ecológico crítico no que se refere à colonização de ambientes cujas superfícies estão expostas a fluidos banhantes, visto que a colonização por um patógeno compreende um pré-requisito óbvio para a patogenicidade. Um alto grau de especificidade foi observado na adesão bacteriana às diferentes células epiteliais bucais, ficando evidente que espécies diferentes pertencentes a um mesmo gênero possuem uma ampla variedade na habilidade em aderir a estas células, aderência esta inicialmente viabilizada por interações sorptivas de um componente superficial da célula bacteriana com algum constituinte da superfície celular epitelial (GIBBONS e VAN HOUTE, 1971).

Ao se observar um corte de placa bacteriana através de micrografia eletrônica de transmissão, nota-se uma fina camada acelular e levemente agranular disposta entre o microrganismo e a superfície do esmalte, denominada Película Adquirida (PA), a qual se forma logo após a exposição da superfície de esmalte limpa à saliva, pela adsorção seletiva de glicoproteínas salivares. À PA são atribuídas funções: proteção da superfície do esmalte (permeabilidade seletiva), influência na adesão-aderência de microrganismos orais, comporta-se como substrato aos organismos adsorvidos, serve de reservatório de íons protetores como o flúor (SÖNJU, 1988).

A presença da PA é a condição essencial para a adesão microbiana e, conseqüentemente, para a progressão da formação do biofilme dental, pois a adesão dos microrganismos aos dentes está intimamente ligada às interações específicas entre as adesinas bacterianas e as macromoléculas que compõem a PA, tornando-se clara a presença de um sistema de reconhecimento altamente desenvolvido presente na célula bacteriana, capaz de identificar e interagir com macromoléculas específicas dos tecidos superficiais (GIBBONS, 1989).

De forma esquemática, van Loosdrecht *et al.* (1990) demonstraram que o processo de formação do biofilme ocorre em quatro estágios: transporte inicial de microrganismos por sedimentação/movimentação para a superfície dentária; adsorção reversível; interações específicas entre a PA e os

microrganismos; e colonização e sucessão microbiana, culminando com a comunidade *clímax*.

Para Thylstrup e Fejerskov (1995), a formação do biofilme dental é incitada a partir da constituição da Camada de Hidratação (Camada de Stern), a qual está presente em qualquer superfície eletricamente carregada quando da sua imersão em água, pela atração de íons de cargas opostas. A superfície dentária é naturalmente caracterizada por sua carga negativa, que na presença de saliva será neutralizada pela atração de íons de oposição (Camada de Hidratação) que compreendem principalmente íons de cálcio (90%) e fosfato (10%), ocorrendo a inversão da energia de superfície dentária, que passa a ser positiva. Desse modo, as proteínas salivares (glico e fosfoproteínas), que são negativamente carregadas, são atraídas à camada de hidratação, originando a PA.

O primeiro contato dos microrganismos com a PA ocorre de maneira inespecífica, através da atração pelas forças de van der Waals e por repulsão eletrostática, seguindo-se a adesão irreversível, conferida pelas pontes de cálcio / hidrogênio e pela hidrofobicidade superficial (LIMA e ALVES, 1998).

A especificidade bacteriana na adesão à superfície dentária é devida às interações do tipo lectina, que se dão entre as proteínas (adesinas) presentes na parede celular bacteriana e receptores presentes na PA. Posteriormente, ocorre a ligação de bactérias que inicialmente não conseguiram aderir à PA àquelas que já estão aderidas à superfície dentária (co-adesão), às expensas dos polissacarídeos extracelulares, como ocorre com os *Streptococcus mutans* (MARSH e MARTIN, 1999).

O processo de formação do biofilme dental é altamente dinâmico, cujos estágios podem ocorrer concomitantemente e que, para Marsh e Nyvad (2005) compreendem: (a) a formação da película adquirida, (b) a adesão de células bacterianas simples (0-4h), (c) crescimento de bactérias aderidas com a formação de microcolônias distintas (4-24h), (d) sucessão / coagregação bacterianas implicando alta diversidade de espécies paralelamente ao crescimento contínuo das microcolônias (1-14 dias), (e) formação da comunidade *clímax* / placa madura (2 semanas ou mais).

2.3.2 Aspectos Ecológicos

A cavidade bucal é semelhante a outras seções do trato digestivo, abrigando naturalmente uma microbiota residente. Os colonizadores (pioneiros) das superfícies dentais compreendem gêneros de *Streptococcus* (*S. sanguis*, *S. mitis* e *S. oralis*), *Actinomyces*, *Haemophilus*, *Neisseria* e *Veillonella* (NYVAD e KILLIAN, 1987).

Uma vez estabelecida, esta microflora torna-se relativamente estável (homeostasia microbiana), comportando-se de maneira benéfica em relação ao hospedeiro, devido a sua habilidade em prevenir sua colonização por microrganismos exógenos e via de regra patogênicos, a despeito das alterações que regularmente ocorrem no ambiente bucal. No entanto, este equilíbrio pode ser rompido frente às pressões ambientais impostas pelos hábitos dietéticos (MARSH, 1989), situação que leva à transição da microbiota caracteristicamente comensal para um padrão de comportamento potencialmente patogênico em relação ao hospedeiro.

O consumo freqüente de carboidratos fermentáveis é um dos hábitos dietéticos comumente vinculados ao desequilíbrio da homeostasia da microbiota bacteriana constituinte do biofilme. Assim sendo, Rateitschak - Plüss e Guggenheim (1982), em estudo quantitativo, evidenciaram que o acúmulo do biofilme (considerando sua extensão, peso e número de bactérias) é mais exuberante quando da complementação da dieta com elementos ricos em açúcar em relação a uma dieta controlada, pobre em sacarose.

A associação entre o desenvolvimento de lesões de cárie e o aumento da freqüência de consumo de carboidratos fermentáveis na dieta foi relatada por Loesche (1986), que frente a essa situação, ressaltou o aumento das proporções salivares de bactérias acidúricas e acidogênicas como *Streptococcus mutans* e *Lactobacilli*.

A análise qualitativa *in vitro* das alterações ocorridas na microflora bucal decorrentes do contato com carboidrato foi averiguada por Bradshaw *et al.* (1989). Um sistema de cultura mista quimiostática (sem interações químicas) foi utilizado para verificar se as alterações ocorridas na comunidade microbiana foram devidas à disponibilidade do carboidrato *per se*, ou ao baixo valor de pH gerado pelo metabolismo deste. Nove bactérias cresceram em um meio com

pH=7 e foram inoculadas com glicose por 10 dias consecutivos, sendo que em um dos sistemas, esse valor de pH fora mantido constante (controlado) durante todo o período experimental, enquanto no outro, até 6h após o pulso de glicose, o controle do pH não fora efetuado. O estudo demonstrou que em pH neutro, a glicose exibiu pouco efeito na composição da microbiota, observando-se aumento somente nas contagens de *Veillonella dispar* e *Actinomyces viscosus*, enquanto os níveis de *Lactobacillus casei* e *Streptococcus mutans* permaneceram baixos. No sistema em que o pH diminuiu após cada pulso de glicose, atingindo um valor igual a 5,0 (pH crítico), a composição da microflora fora dramaticamente alterada, caracterizando-se por um aumento nas contagens de *Lactobacillus casei*, *Streptococcus mutans* e *Veillonella disspar*, ao passo que as quantidades de *Bacteroides intermedius*, *Fusobacterium nucleatum*, *Neisseria subflava* e *Streptococcus sanguis* foram diminuídas. Os autores concluíram que essa seleção microbiana ocorreu às expensas das espécies bacterianas ácido-sensíveis, as quais são correlacionadas ao estado de saúde bucal, sugerindo, portanto, que o pH gerado a partir do metabolismo do carboidrato, mais que a disponibilidade do carboidrato *per se*, é o responsável pelas mudanças qualitativas na microflora bucal *in vivo*.

Em 1992, Marsh evidenciou que frente à desorganização mecânica regular do biofilme, as bactérias que se encontram presentes na saliva e que se acumulam sobre os dentes formam um biofilme mínimo, o qual estaria relacionado ao estado de saúde, cuja microbiota predominante seria de *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sanguis*, *Actinomyces* spp, *Neisseria* spp e *Haemophilus* spp, que co-habitariam a cavidade bucal em estado de homeostasia.

Esses dados reforçaram o pressuposto de que há uma relação direta entre o ambiente e a manutenção da homeostasia da microbiota residente presente na placa bacteriana, visto que as mudanças ambientais (pressões ambientais) decorridas podem levar a uma seleção ou favorecimento de componentes primários minoritários do biofilme dental (trocas ecológicas), incitando mudanças clínicas que atingirão sobremaneira os tecidos do hospedeiro (MARSH, 1994).

Marsh e Bradshaw (1997) destacaram que, para efeitos clínicos, atenção especial deve ser dispensada ao controle das pressões ambientais que

levam à seleção de espécies cariogênicas (acidogênicas e acidúricas), mas também à prevenção da inibição de espécies microbianas predominantes em estado de saúde (ácido-sensíveis). Para isso, há que se fazer uso de estratégias que contemplem a prevenção na queda do pH, como a inibição da produção de ácidos, o uso de substitutos do açúcar e a geração de bases no biofilme dental.

O efeito da ausência ou deficiência de meios mecânicos que desorganizassem o biofilme dental frente a uma dieta rica em sacarose foi apontado por Cury (2003) como facilitador do acúmulo de bactérias acidogênicas e acidúricas, as quais originariam o biofilme cariogênico, rico em *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Lactobacillus spp* e *Actinomyces viscosus*, que incitaria o processo de desmineralização dos tecidos dentários (esmalte, dentina e cimento) e cuja persistência culminaria com a formação da lesão de cárie.

Ao identificarem as bactérias associadas à cárie dental e à saúde dental em 204 gêmeos entre 1,5 e 7,0 anos de idade, Corby *et al.* (2005) verificaram que no grupo de sujeitos cárie-ativos houve a predominância de uma microbiota cariogênica rica em *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus sp* e *Actinomyces sp.*, havendo uma relação inversa no que se referiu aos microrganismos associados à saúde dental. Os sujeitos livres de cárie apresentaram contagens significativas de espécies bacterianas consideradas benéficas ao ambiente bucal em detrimento dos níveis da flora cariogênica. Para os autores, as espécies associadas à saúde desempenham papel essencial, tanto na proteção contra patógenos prejudiciais como na prevenção do início e desenvolvimento da cárie dentária.

Assim sendo, a seleção da estratégia mais adequada para o controle ambiental bucal deve ser feita pela avaliação dos pontos críticos presentes em cada caso, isto é, em cada paciente individualmente, pois deste modo “...o clínico não só trata o resultado final do processo da doença, mas também tenta identificar e interferir nos fatores que, se permanecerem inalterados, inevitavelmente levarão a mais doença” (MARSH e NYVAD, 2005; p.47).

2.4 Risco e Atividade de Cárie

O pressuposto que considerou a cárie uma afecção de natureza multifatorial fomentou a pesquisa odontológica no que tange à influência dos

fatores de risco para o desenvolvimento dos padrões de atividade da doença, fato que veio a corroborar uma concepção mais particularizada do processo saúde-doença, principalmente no que se refere à decisão terapêutica / preventiva a ser tomada.

Ao analisarem diferentes métodos de predição de atividade de cárie como a contagem dos níveis salivares de *Streptococcus mutans* e de Lactobacilos, a análise da capacidade tampão, padrão de secreção e pH salivares, a quantidade de placa e a freqüência de cárie, Klock e Krasse (1979) compararam o incremento de cárie no período de um e dois anos com os fatores anteriormente citados em 300 crianças com idade entre 9 e 12 anos. Os autores evidenciaram que houve uma correlação significativa entre a freqüência de cárie e os níveis salivares de *Streptococcus mutans* com a atividade da doença, sugerindo que as crianças com alto risco podem ser, desse modo, selecionadas, e se participarem de programas preventivos podem ter sua atividade de cárie reduzida.

Para Zickert *et al.* (1983), pacientes que possuem mais de 10^6 UFC (unidades formadoras de colônia) de *Streptococcus mutans* /mL de saliva possuem alta atividade de cárie quando comparados aos que possuem baixas contagens de UFC desse microrganismo, o que evidentemente lhes confere um alto risco ao desenvolvimento de novas lesões de cárie, pois o nível e a duração da infecção por *Streptococcus mutans* aumentam o risco, a atividade e a incidência da doença.

A abordagem tradicional da doença cárie fora embasada somente no reparo das lesões (cavitações), através de procedimentos restauradores, sem uma maior preocupação com a promoção da saúde. No entanto, os procedimentos preventivos tomaram importância significativa e a identificação de indivíduos com alto risco de desenvolvimento de cárie tornou-se determinante do sucesso do plano de tratamento (BUISCHI *et al.*, 1989).

Em estudo realizado com pré-escolares brasileiros, Bretz *et al.* (1992) relacionaram os parâmetros microbianos e salivares destes com a experiência de cárie, demonstrando que a presença de altos níveis salivares de *Streptococcus mutans* e Lactobacilos foi associada à cárie dentária nesta população.

Koroluk *et al.* (1995) verificaram o efeito dos sistemas de índice de cárie sobre a associação entre cárie dentária e *Streptococcus mutans* e

concluíram que as contagens dessa bactéria foram significativamente associadas à prevalência de cárie; ao serem eliminadas dos índices de cárie as superfícies restauradas, essas contagens tornaram-se altamente associadas ao índice de cárie, assim, o nível de significância também aumentou; a severidade da cárie foi diretamente proporcional às contagens de *Streptococcus mutans*.

Evidências científicas associam a prevalência de cárie com fatores de risco clínicos, microbiológicos e dietéticos. A análise da associação destas variáveis com a distribuição da cárie em 142 crianças brasileiras de 1 a 2,5 anos de idade foi executada por Mattos-Graner *et al.* (1998). Uma significativa diferença na prevalência de cárie entre as crianças com e sem placa visível foi observada, visto que aquelas que a possuíam nos incisivos centrais superiores apresentaram um maior número de superfícies cariadas. Os *Streptococcus mutans* foram detectados em 114 crianças (80,3%) e uma alta prevalência de cárie foi evidenciada nas crianças que apresentaram altos níveis salivares dessa bactéria.

A percepção atual da cárie dentária deve ser centrada na compreensão dos fatores de risco, os quais, segundo Beck (1998), constituem características ambientais, biológicas ou comportamentais, que geralmente são confirmadas por estudos epidemiológicos longitudinais, cuja presença implica o aumento da ocorrência da patologia, observando-se o contrário quando da sua supressão, não levando a sua simples remoção à cura.

Bratthall e Hänsel-Petersson (2000) evidenciaram que a análise desses fatores de risco era essencial para a abordagem adequada dos pacientes com vistas à promoção de saúde, sendo que tal avaliação devia ser realizada de maneira corriqueira, embora não existissem métodos exímios para tal fim. Deste modo, a presença de bactérias cariogênicas, a quantidade do biofilme e a presença de fluoretos compreendem importantes fatores relacionados ao equilíbrio do processo saúde-doença que envolve a cárie.

Sendo a cárie uma afecção de caráter multifatorial que necessita da confluência desses fatores críticos para o seu desenvolvimento, os métodos de predição da doença tornam-se limitados. Porém, o diagnóstico de lesões não cavitadas clinicamente visíveis viabiliza a avaliação da atividade de cárie, indicando os parâmetros que devem ser levados em consideração para o controle da doença, o que possivelmente levaria ao controle das lesões subclínicas (MALTZ, 2000). A autora apontou que:

“ A atividade cariogênica, ou seja, a capacidade que o indivíduo está tendo, neste determinado momento, de desenvolver novas lesões de cárie, deve ser analisada como condição para que se estabeleça o tratamento adequado. Para isso, existem diversos aspectos que devem ser considerados. Alguns fatores são mais importantes que outros, mas complementam-se na definição do potencial cariogênico do paciente”(MALTZ, 2000; p.336).

A avaliação do risco/atividade de cárie constitui um dos pilares do paradigma da Promoção da Saúde em Odontologia. Ao abordarem a importância das informações relativas a esse quesito, Kidd e Nyvad (2005) evidenciaram que em nível individual, os procedimentos preventivos não-invasivos devem ser centrados na clientela que mais os necessitam (populações de alto risco), levando-se em consideração que o *status* de risco apresenta caráter dinâmico. Em relação à avaliação da atividade de cárie, as autoras sugeriram que a presença de lesões de cárie ativas (cavitadas / não-cavitadas) no momento do exame representam a evidência mais forte para uma alta atividade de cárie, e que embora essa avaliação seja um julgamento relativo, o incremento anual de duas ou mais lesões (clínica / radiograficamente detectadas) e a presença de múltiplas lesões ativas em regiões bucais onde o fluxo salivar é relativamente rápido (região de incisivos inferiores e vestibular de molares superiores), colocam o paciente em um *status* de alto risco.

Para as autoras, o estágio de desenvolvimento da dentição também deve ser considerado no *status* de atividade de cárie, sendo que em crianças, as superfícies oclusais dos molares permanentes representam um local de risco potencial para o surgimento de lesões; os adolescentes estariam mais propensos a desenvolver lesões proximais, principalmente nas faces distal dos segundos pré-molares e mesial dos segundos molares; em adultos e idosos, as superfícies radiculares de difícil acesso estariam predominantemente em situação de risco.

2.5 Controle Químico do Biofilme Dental

Tendo conhecimento do papel fundamental dos *Streptococcus mutans* na etiologia da cárie dentária, van Houte e Green (1974) destacaram que a interferência nas concentrações salivares desses microrganismos poderia evitar a difusão intra-oral e a transmissão dos mesmos de sujeitos infectados para os não-

infectados, através de variadas maneiras, dentre essas, a utilização de agentes antimicrobianos.

O efeito de medidas preventivas à cárie em 101 crianças (53 pertencentes ao grupo controle e 48 ao grupo teste) entre 13 e 14 anos de idade, altamente infectadas por *Streptococcus mutans*, durante 3 anos, foi analisado por Zickert *et al.* (1982). As crianças pertencentes ao grupo controle exibiram um incremento de cárie no valor de 9,6, enquanto aquelas que constituíram o grupo teste foram submetidas a um agente químico (clorexidina) e apresentaram incremento da doença correspondente a 4,2. Para as crianças com 10^6 UFC de *Streptococcus mutans* / mL de saliva no início do estudo, o valor do incremento da doença foi de 20,8 (grupo controle) e 3,9 (grupo teste). Tais achados demonstraram a redução da atividade de cárie obtida pela utilização do controle antimicrobiano.

No ano seguinte, Zickert *et al.* ressaltaram que a diminuição dos níveis salivares de *Streptococcus mutans* causada pelo uso de antimicrobianos em crianças altamente infectadas levou os valores de incidência de cárie a patamares praticamente idênticos àqueles das crianças naturalmente infectadas no mesmo período de duração da infecção, configurando-se assim o valor positivo do controle antimicrobiano como meio preventivo à cárie.

Em relação ao início do período de infecção por *Streptococcus mutans* e ao local de estabelecimento dessas bactérias em molares recém erupcionados, o estudo delineado por Loesche *et al.* (1984) demonstrou que esses dentes são infectados por essas bactérias logo após a sua erupção e que essas se implantam preferencialmente na entrada da fissura e não em sua profundidade, o que indicou a necessidade/factibilidade do controle desses microorganismos já na dentição decídua, para que a mesma não sirva de fonte de infecção para os dentes permanentes.

Para Röllä (1988), sendo a presença do biofilme bacteriano sobre os dentes e a acidogênese *in situ* um pré-requisito para a formação das lesões de cárie de esmalte, as intervenções químicas que visam o controle dessas bactérias nesses locais e a conseqüente redução da produção de ácidos seriam um passo lógico no que tange à prevenção da doença.

A utilização de métodos de desorganização do processo normal de acúmulo de biofilme obtendo-se a diminuição da formação deste, ou a alteração

de sua composição, interferiria no número e no comportamento de suas espécies constituintes, sem eliminá-las completamente (RUSSELL, 1994).

Desse modo, as pesquisas dispensaram grande atenção aos meios de controle químico como potenciais inibidores da formação do biofilme dental. Tendo em vista que a adesão às superfícies dentárias é a condição essencial para que ocorra a formação do biofilme e o potencial de adesividade dos microrganismos é considerado como um determinante ecológico e patogênico importante para o início da lesão de cárie, esforços devem ser dirigidos à possibilidade de interferências na adesão microbiana (SCHEIE, 1994), as quais podem ser estabelecidas pelo uso de substâncias químicas.

Como o biofilme dental é constituído por uma comunidade microbiana heterogeneamente organizada, constituindo um microambiente complexo, Thylstrup e Fejerskov (1995) mencionaram que a eficácia de um único agente pode ser limitada, tornando-se necessária a combinação de dois ou mais agentes com papéis complementares na inibição do biofilme, obtendo-se assim o aumento da eficácia e a redução dos efeitos adversos dos agentes químicos utilizados.

Levando-se em consideração a Hipótese da Placa Ecológica, Marsh e Bradshaw (1997) propuseram a prevenção da doença não somente pela inibição das bactérias causadoras, mas também pela manipulação e controle de fatores ecológicos/fisiológicos que norteiam a transição da microflora bucal comensal para patogênica. Para os autores, a manipulação de fatores fisiológicos essenciais levaria ao controle da composição da comunidade microbiana do biofilme, implicando a identificação de estratégias fisiológicas que manteriam as propriedades benéficas do biofilme.

Nesse sentido, Torres *et al.* (2000) elencaram as características que devem ser observadas para a seleção de antimicrobianos, os quais devem apresentar baixa toxicidade, baixa permeabilidade aos tecidos, seletividade (não deve provocar desequilíbrios na microbiota residente) e substantividade ou retentividade (capacidade de retenção às superfícies e de liberação lenta). O fármaco selecionado deve apresentar o maior número possível das características citadas e possuir efetividade comprovada por estudos clínicos e laboratoriais.

Scheie (2005) mencionou que os agentes antimicrobianos atuam sobre a redução dos níveis de biofilme por um, ou pela combinação de alguns princípios, como a inibição da colonização microbiana, inibição do

crescimento/metabolismo bacteriano, desorganização do biofilme maduro e pela modificação bioquímica ecológica do biofilme.

2.5.1 Indicações

O controle químico do biofilme dental constitui uma questão polêmica que gera muita discussão em relação à ação específica dos antimicrobianos sobre as bactérias bucais potencialmente patogênicas, visto que estas fazem parte da microbiota residente, havendo assim a possibilidade de geração de desequilíbrios ecológicos no biofilme dental, pelo uso inadvertido de fármacos que além de atuarem de maneira efetiva contra a viabilidade de bactérias relacionadas à doença, podem, da mesma forma, atingir os microorganismos relacionados à saúde bucal.

Addy (1986) evidenciou a baixa evidência da efetividade do controle mecânico do biofilme, particularmente pela escovação, caso este fosse o único meio utilizado para este fim em indivíduos susceptíveis à cárie. Desse modo, sem anular o valor da escovação como método preventivo às afecções dentárias e gengivais, o autor indicou a utilização de agentes químicos para o controle do biofilme como uma alternativa nas estratégias preventivas, pois, à época, algumas substâncias demonstraram adequada capacidade na redução do acúmulo do biofilme, bem como promoveram alterações bioquímicas neste, capazes de prevenir a cárie. Assim sendo, a justificativa para a utilização de meios de controle químico do biofilme deve ser bem fundamentada, a fim de excluir a possibilidade de sobretratamento ou de tratamentos inócuos.

Tendo em vista a natureza bacteriana tanto da cárie como da doença periodontal e a dificuldade de obtenção de um controle mecânico satisfatório por parte dos pacientes, fatos que levariam a um desequilíbrio na microbiota residente tornando-a cariogênica e periodontopatogênica, os antibacterianos seriam indicados na abordagem clínica dessas doenças, sendo utilizados de maneira profilática com o intuito de evitar o acúmulo do biofilme, evitando-se assim o desequilíbrio que incitaria as trocas ecológicas no microambiente bucal ou como alternativa terapêutica, restabelecendo o equilíbrio da microbiota, conforme a situação clínica requerida. No entanto, a existência de fármacos eficientes que podem ser utilizados neste sentido não justifica a substituição dos meios de

controle mecânico pelos químicos, desempenhando estes um papel essencialmente adjuvante àqueles (CURY, 1997).

A condição imprescindível para que a cárie se estabeleça e progrida é a presença do biofilme bacteriano cariogênico, visto que a mesma não ocorre na ausência de microorganismos. Assim sendo, nota-se que apesar de a doença cárie configurar um processo dinâmico que varia desde perdas minerais submicroscópicas à presença de cavidades e à destruição total do dente, a mesma não implica um padrão de acometimento linear, que inevitavelmente culminaria com a presença de cavidades e a perda dos elementos dentais. Ao contrário, a interrupção desse processo, mesmo na presença de cavidades, é exeqüível, embora o controle da doença somente por meios mecânicos seja um objetivo difícil de ser atingido (MALTZ, 2000), fazendo-se necessário, nesses casos, a utilização do controle químico do biofilme dental.

Para Scheie (2005), em oposição às demais doenças infecciosas que têm como agente etiológico um microrganismo patogênico, a cárie é causada pela microbiota residente que desempenha um papel benéfico ao hospedeiro, devendo-se então, através do controle químico desta, não visar a sua eliminação, mas o seu controle em níveis compatíveis com a saúde bucal, com efeitos adversos mínimos.

Vários compostos podem ser utilizados para o controle químico do biofilme dental, sendo que os mais mencionados na literatura científica odontológica são os fármacos à base de clorexidina e os fluoretos. Além das substâncias químicas sintéticas, há uma tendência à inclusão de substâncias naturais sendo utilizadas para tal fim. A própolis tem merecido especial atenção nesse sentido, obtendo resultados satisfatórios devido a sua ampla ação como antimicrobiano.

2.5.3 Flúor

Flúor é "...um termo genérico para definir as formas químicas iônica (fluoreto ou íon flúor), ionizável (mineralizada, na forma de MFP) e não-ionizável (ligado covalentemente) do elemento flúor"(CURY, 2001; p.33).

Para o mesmo autor, partindo-se do pressuposto de que a cárie dentária é causada pelo acúmulo do biofilme sobre os dentes e pelo consumo

freqüente de sacarose, medidas primárias para o seu controle implicariam a desorganização periódica desse biofilme e a utilização racional de carboidratos fermentáveis na dieta. Contudo, um maior impacto no controle da doença foi obtido com o uso do flúor e, embora seu uso isolado não impeça o desenvolvimento da doença, a sua contribuição para a redução da progressão desta é de relevância, visto que o declínio mundial da manifestação da cárie tem sido atribuído à ampla utilização das mais variadas formas dessa substância. Em contrapartida, concomitantemente a esse efeito benéfico, a exposição inadvertida à dosagens não-controladas desse elemento ocasionou o aumento da prevalência de fluorose dental.

Ellwood e Fejerskov (2005) evidenciaram que o flúor pode ter efeitos benéficos e deletérios sobre a dentição. Nesse sentido, o benefício deste ocorreria por seu efeito tópico após a erupção dos dentes na cavidade bucal, enquanto seus efeitos deletérios seriam devidos à absorção sistêmica no decorrer do desenvolvimento da dentição, causando a fluorose dental. O uso racional do flúor compreenderia a maximização da exposição tópica durante a vida e a minimização de sua absorção sistêmica no período da odontogênese, obtendo-se assim um maior benefício anticárie ao passo que o risco da fluorose seria diminuído.

2.5.3.1 A Microambiente Bucal e o Flúor

O efeito do flúor no ambiente bucal e sobre as bactérias que o compõe foi e continua sendo motivo de grandes discussões na área acadêmica, o que, através dos anos, gerou algumas hipóteses a respeito de seu mecanismo de ação.

Devido à importância do flúor como agente cariostático, Bowen e Hewitt (1974) analisaram o seu efeito sobre a produção de PECs por *Streptococcus mutans*. Em quatro das cinco cepas que foram submetidas ao experimento, observou-se a perda do peso seco dos microrganismos em cujo meio de cultura fora incluído fluoreto (70 ppm), ficando clara a influência deste composto na formação de polímeros, tendo em vista as alterações presentes tanto no padrão de crescimento dos *Streptococcus mutans* quanto na composição dos polissacarídeos.

Sugerindo que o flúor penetraria os espaços intracelulares bacterianos e que sua ação não se restringiria à estruturas bacterianas externas, Whitford *et al.* (1977) investigaram o mecanismo de absorção do flúor por *Streptococcus mutans*, com ênfase para a influência do gradiente de pH intra/extracelular nesse processo. Inferiu-se que quanto menor o pH inicial, maior foi a perda fracional de flúor do meio, sendo que essa perda fora observada com magnitude nos primeiros minutos, declinando com passar do tempo. Isso sugeriu que há uma dependência do pH dos espaços intra-extracelular para que a translocação do ácido fluorídrico (HF) ocorra para o meio intracelular. Assim sendo, a inibição do metabolismo bacteriano poderia alterar a absorção do flúor somente se houvesse uma mudança concomitante no gradiente de pH intra-extracelular (por exemplo, uma grande disponibilidade de carboidrato fermentável). O estudo indicou que a variável mais crítica para a determinação da absorção do flúor a curto prazo seria a magnitude do gradiente do pH ambiental e intracelular e que a distribuição do flúor foi primariamente determinada pelo equilíbrio de difusão do HF.

Ao analisarem a ação bacteriolítica do flúor, Leshner *et al.* (1977) evidenciaram que este íon pode ser bactericida para certos organismos nos quais ele induz a reação de lise celular e, além disso, promove a inibição do crescimento bacteriano pelo desarranjo dos peptidoglicanos da parede celular. Para os autores, o flúor incitaria a lise bacteriana pelo aumento da atividade autolítica das células em cultura, não afetando diretamente a atividade das autolisinas, mas causando alguma mudança durante a fase de crescimento que levaria à exacerbação desta atividade e à conseqüente perda dos peptidoglicanos, tornando as bactérias mais susceptíveis a outros agentes químicos. Assim, o regime anticárie mais efetivo envolveria a combinação do flúor com algum outro agente capaz de agir sobre as estruturas bacterianas superficiais.

Tendo em vista o papel fundamental da película adquirida do esmalte (principalmente constituída de proteínas salivares) no processo de adesão bacteriana, que é o evento essencial para a formação do biofilme, Rølla (1977) relatou os efeitos do flúor nos estágios iniciais desse processo, destacando que o flúor e outros ânions com alta afinidade pelo cálcio agiriam como inibidores da adsorção de proteínas salivares pela hidroxiapatita. Desse modo, através de

inibição competitiva da adsorção dos grupos laterais ácidos das proteínas aos sítios de cálcio localizados na superfície dos cristais as pontes de cálcio não seriam formadas, inviabilizando a integridade estrutural do biofilme. Além de inibir a formação do biofilme, o flúor também reduziria relativamente os números de *Streptococcus mutans* neste.

Em 1977, o estudo de Hamilton demonstrou o efeito do flúor sobre a regulação enzimática no metabolismo bacteriano dos carboidratos, enfatizando que em estreptococos orais, incluindo-se os *Streptococcus mutans*, o flúor interferiria no transporte intracelular da glicose via sistema fosfotransferase fosfoenolpiruvato dependente (SFT-FEP). O FEP é formado pela ação da enolase, que é sensível ao flúor. Desse modo, em nível intracelular, o flúor reduziria a quantidade de FEP disponível para viabilizar o SFT, diminuindo a quantidade de ácido produzido pela via glicolítica.

No ano seguinte, a ação do flúor no metabolismo de carboidratos (sacarose, glicose e frutose) fermentados por *Streptococcus mutans* crescendo em diferentes valores de pH, foi avaliada por Hamilton e Ellwood, os quais destacaram que com a queda do pH de 7,0 para 5,5, em função da fonte exógena de açúcares, a acidogenicidade dos microrganismos e o efeito inibitório do flúor aumentaram substancialmente, ficando clara a efetividade desse composto em baixas concentrações no que se refere à inibição da queda do pH.

De acordo com Fejerskov *et al.* (1981), o flúor pode interferir na colonização/composição do biofilme dental e/ou na atividade metabólica dos depósitos bacterianos, podendo ser utilizado para o tratamento da doença cárie em níveis clínicos/subclínicos. Em baixas concentrações, o flúor agiria sobre a fase líquida da dissolução do esmalte, sendo este comportamento cariostático máximo devido à manutenção regular dos íons F^- nos fluidos orais.

Maltz e Emilson (1982) averigüaram a susceptibilidade de streptococcus, lactobacillus e actinomyces a vários sais de flúor. Notou-se que o efeito bactericida do fluoreto de sódio (NaF) foi aumentado pelo decréscimo no pH da solução, com exceção da cepa de actinomyces. Apesar disso, um maior efeito da queda do pH foi observado sobre a concentração de flúor requerida para a inibição da acidogênese do que aquela necessária para sua ação bactericida, visto que a concentração inibitória mínima (CIM) de NaF para os *Streptococcus mutans* foi de 100 ppm para todas as cepas testadas.

O efeito do flúor sobre a viabilidade ecológica de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus mitis* foi avaliado *in vitro* por Hamilton e Bowden (1982). Nesse experimento, foi demonstrada uma característica ecológica importante: o flúor reduziu o crescimento e o metabolismo de *Streptococcus mutans* ao passo que demonstrou ser responsável pela sobrevivência de *Streptococcus mitis* (altamente acidogênicos, porém pouco acidúricos). Nos últimos, a inibição da glicólise pelo flúor implicou a diminuição da formação de ácidos no ambiente, estabilizando esse microrganismo na comunidade bacteriana.

Em estudo *in vivo* realizado por Bowden *et al.* (1982), o crescimento de populações bacterianas na presença de flúor, sob baixos valores de pH da placa dental, em crianças que viviam em área com água fluoretada foi examinado. Os autores destacaram que o flúor presente na placa reduziria as vantagens ecológicas apresentadas por cepas acidúricas como os *Streptococcus mutans*, que seriam dominantes frente à exposição aos carboidratos, restabelecendo os valores de pH e diminuindo a acidogênese, permitindo a competição entre *Streptococcus mitis* e *Streptococcus mutans* no ecossistema da placa.

Os valores do pH na inibição da absorção de glicose, ocasionada pela presença de fluoreto em *Streptococcus mutans*, foram examinados por Germaine e Tellefson (1986). Demonstrou-se que a sensibilidade pH-dependente ao flúor nesses microrganismos é relacionada à permeabilidade da membrana celular ao HF e à impermeabilidade desta ao ânion flúor durante as variações de pH encontradas no biofilme dental. Quando o pH diminuiu, a sensibilidade celular ao flúor e a sua capacidade em inibir a absorção/fermentação da glicose foram aumentadas. Esses dados sugeriram que a membrana celular é impermeável ao ânion flúor, e que o acúmulo intracelular de flúor depende da translocação do HF através da membrana.

Para Zero *et al.* (1988), a ação cariostática do flúor estaria relacionada às baixas concentrações desse íon na cavidade bucal e à sua capacidade de retenção nesse ambiente.

Nesse sentido, Bradshaw *et al.* (1990), ao analisarem o efeito de baixas concentrações de fluoreto de sódio sobre a estabilidade e metabolismo de bactérias componentes da comunidade microbiana bucal expostas à glicose, com e sem controle do pH, revelaram que no pH=7,0 e na presença contínua de NaF (1 mmol/L=19ppm), houve uma discreta diminuição do total de bactérias viáveis

da microflora analisada. Durante a inoculação de glicose sem controle do pH e na ausência de fluoreto, observou-se a inibição marcante do crescimento de algumas espécies, predominando na cultura *Lactobacillus casei*, *Veillonella dispar* e *Streptococcus mutans*. A presença contínua de fluoreto em baixos níveis (doses sub-CIM) frente à glicose reduziu tanto o padrão da mudança quanto o grau de queda do pH, inibindo o aumento das contagens de *Streptococcus mutans*. Na sua ausência, a produção de ácidos aumentou a cada exposição à glicose. Concluiu-se que concentrações sub-CIM de fluoreto no biofilme suprimiriam a seleção de *Streptococcus mutans* por interferir no metabolismo bacteriano, reduzindo as trocas ecológicas na comunidade microbiana bucal incitadas pela produção de ácidos oriundos da degradação dos carboidratos fermentáveis, representando, desse modo, uma significativa contribuição à prevenção da cárie dentária.

No mesmo ano, Marsh e Bradshaw verificaram o efeito da combinação de fluoreto, carboidratos fermentáveis e do pH na estabilidade da comunidade bacteriana bucal *in vitro*. Provou-se que o pH gerado pelo metabolismo dos carboidratos, mais que a disponibilidade do substrato, foi responsável pelo crescimento/seleção de bactérias cariogênicas como os *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus casei*, bactérias reconhecidamente acidogênicas e acidúricas. Os padrões de formação de ácido e da queda do pH apresentados após os pulsos de glicose foram reduzidos pela adição de níveis sub-CIM de fluoreto (1mmol/L), garantindo a homeostasia da comunidade bacteriana relacionada ao esmalte sadio.

Marquis (1990) evidenciou que o flúor reduziria a tolerância ácida das bactérias do biofilme por ser capaz de perturbar o curso normal das correntes protônicas através da membrana celular. Em *Streptococcus mutans*, o flúor inibe diretamente o sistema ATPase de translocação de prótons, o que causaria uma diminuição do seu potencial cariogênico.

As aplicações tópicas de flúor em baixas concentrações de maneira constante na cavidade bucal e em combinação com outros antimicrobianos foi sugerida por Ögaard *et al.* (1994), com vistas a um melhor desempenho clínico no combate ao desafio cariogênico.

Ao abordar as ações antimicrobianas do flúor para as bactérias orais, Marquis (1995) destacou sua efetividade no controle do processo DES-RE, além

dos efeitos do mesmo sobre as bactérias do biofilme dental, alterando seu metabolismo. O flúor agiria de diferentes maneiras: como inibidor da enolase (via glicolítica), pela formação de complexos metálicos que interfeririam na translocação de prótons e principalmente, aumentando a permeabilidade da membrana aos prótons e comprometendo o funcionamento das F-ATPases em expelir prótons, induzindo a acidificação do citoplasma e a inibição ácida de enzimas glicolíticas, levando à redução da tolerância ácida bacteriana. Em condições ambientais ácidas como na presença do biofilme cariogênico, níveis de flúor abaixo de 0,1 mM poderiam causar a supressão completa da glicólise em *Streptococcus mutans*.

Para Hamilton e Bowden (1996), evidências indicavam a multiplicidade de efeitos diretos e indiretos do flúor sobre a célula bacteriana. Desses, alguns poderiam influenciar de maneira relevante a acidogênese dos microrganismos presentes no biofilme dental, o crescimento (metabolismo energético), a colonização (aderência ao dente), a síntese de macromoléculas (ácido lipoteicóico e peptidioglicanos que são constituintes da membrana celular e glicogênio), a glicólise (enolase e sistema fosfotransferase), o gradiente transmembrana e a ação de outras enzimas (catalase, peroxidase).

Os mesmos autores sugeriram que o controle do pH do biofilme por doses sub-CIM de flúor:

“...estaria diretamente relacionado à prevenção de mudanças nas proporções de organismos na comunidade bacteriana. Coletivamente, o efeito sobre o crescimento celular e a produção de ácidos mantém a homeostasia da placa na presença de carboidrato, negando a vantagem ecológica das bactérias acidogênicas e acidúricas” (HAMILTON e BOWDEN, 1996; p. 249).

Maltz *et al.* (2003) descreveram os resultados de dois anos de um programa de tratamento não-operatório delineado com o objetivo de controlar cáries oclusais de primeiros molares permanentes em fase de erupção, em 145 crianças entre 5 e 6 anos com alta prevalência de cárie. As crianças foram divididas em grupo controle (n=71) e grupo teste (n=74), ao qual foi fora dispensado um programa preventivo básico bianual (3 sessões em março e 2 sessões em agosto) e consultas marcadas conforme o *status* de atividade da doença e as necessidades individuais dos participantes. Em cada sessão do programa básico foram realizadas orientações sobre higiene bucal e escovação com gel fluoretado. Observou-se uma redução significativa na atividade de cárie

do grupo teste. Ao início do estudo, o grupo controle possuía 70 lesões ativas; decorridos dois anos, 68 destas permaneciam ativas. No grupo teste, havia no princípio 80 superfícies com lesões ativas e ao final do estudo, somente 3 destas permaneceram com atividade. Concluiu-se que o controle da doença cárie é factível através de procedimentos não-invasivos e individualizados, incluindo lesões cavitadas e não-cavitadas.

2.5.3.2 O Esmalte, o Ambiente Bucal e o Flúor

As mudanças pós-eruptivas do esmalte dental foram revisadas por Backer-Dirks (1966), que as classificou em alterações que ocorrem antes da cárie iniciar, o próprio processo de cárie e eventos posteriores ao aparecimento da lesão. O padrão das alterações em relação à velocidade de progressão variou conforme a superfície dentária estudada: em superfícies de fissuras observou-se uma rápida progressão das lesões para cavidade, enquanto em superfícies lisas, essa foi mais vagarosa, ao passo que nas superfícies proximais mais de 50% das lesões radiograficamente diagnosticadas como restritas ao esmalte foram paralisadas, resultado de uma alteração ambiental e de uma resistência adquirida pelo esmalte.

O mesmo autor dispensou especial atenção ao aparecimento de manchas brancas, anunciando que o aparecimento dessas ocorreu logo após a erupção dentária e que o seu desaparecimento deu lugar à áreas remineralizadas, as quais seriam advindas principalmente de um pH ambiental favorável, mais que da disponibilidade de íons cálcio. O efeito de condições ambientais durante e após a erupção dentária foi demonstrado em crianças cujos primeiros molares erupcionaram durante ou após o período de fluoretação das águas, e em superfícies lisas, as manchas brancas localizadas na região cervical, que eram opacas, recuperaram seu brilho superficial, não progredindo para cavidades ou desapareceram completamente. “Parece mais provável que a remineralização ou um processo de recristalização, ou ambos, ocorreram.” (BACKER-DIRKS, 1966;p.511).

Em 1970, Wei estudou a remineralização do esmalte através da utilização de uma microsonda eletrônica, analisando de maneira sistemática, desde a superfície do esmalte até camadas mais profundas, as concentrações de

cálcio e fósforo do esmalte sadio, desmineralizado e remineralizado. Seis blocos de esmalte foram utilizados: 2 serviram como controle, 2 foram submetidos à DES por 5h em pH=5,5 e os últimos dois blocos foram similarmente desmineralizados e colocados em solução calcificante em pH=7,2. Todos os blocos foram seccionados transversalmente a fim de se expor as camadas mais profundas. No esmalte sadio, observou-se que a concentração de cálcio foi ligeiramente maior na camada superficial (36,11%) do que nas camadas mais profundas (35,19%). Na superfície desmineralizada, a 3µm da superfície, houve uma redução significativa nas concentrações de cálcio (25,3%) e fósforo (8,25%), ao passo que entre 9 e 12 µm, a concentração desses aproximou-se dos limites normais observados em esmalte não exposto ao ataque ácido. No esmalte desmineralizado e subseqüentemente remineralizado, não houve notável perda mineral, confirmando que o mineral removido pelo condicionamento ácido fora recuperado com sucesso pelo processo de remineralização.

Wei e Koulourides (1972), através de microsonda eletrônica, analisaram as mudanças ocorridas no esmalte decorrentes do processo de DES-RE. O esmalte desmineralizado foi quase completamente remineralizado, visto que a DES-RE ocorreu somente nos primeiros 10µm da superfície do esmalte. A microdureza fora parcialmente reestabelecida, devido às condições de DES mais severas e prolongadas utilizadas nesse trabalho, quando comparadas aos trabalhos anteriores. Esse fato sugeriu que a hidroxiapatita não foi o único produto formado, podendo ter havido a dissolução parcial e a reprecipitação de algum composto com razão cálcio/fósforo similar à hidroxiapatita.

A remineralização do esmalte cariado foi abordada por Silverstone (1972), pela exposição desse tecido patológico a fluidos calcificantes (fluido oral humano e fluido calcificante sintético), *in vitro*, a fim de paralisar o processo de cárie. A composição do fluido sintético foi de 1-3 mM de cálcio, 2,5 mM fosfato, 0,05 mM de fluoreto e 200,0 mM de cloreto de sódio. As lesões de cárie foram expostas aos calcificantes por um período superior a 30 dias, verificando-se uma significativa redução na birefringência observada, conferida pelo decréscimo no volume total da porosidade do esmalte. Esse resultado indicou que, independentemente do fluido calcificante utilizado, similar redução na porosidade fora obtida. Quando da utilização do fluido oral, nenhum aumento foi observado na birefringência intrínseca, indicando que a redução do volume dos poros

provavelmente originou-se da deposição de materiais orgânicos ou da distribuição aleatória de cristais. Como o calcificante sintético não continha material orgânico, a redução na porosidade pode ter sido advinda da deposição orientada de cristais, de modo a produzir um certo aumento na birefringência intrínseca do tecido.

Porém, no mesmo experimento, quando somente a superfície que recobria a lesão fora exposta aos fluidos calcificantes, a penetração desses foi severamente restrita e mudanças foram observadas somente nas camadas superficiais da lesão e o calcificante sintético pareceu ser capaz de reduzir a porosidade da lesão pela precipitação de íons minerais no interior do tecido parcialmente desmineralizado. A presença de baixas concentrações de flúor neste calcificante pareceu ser essencial para o favorecimento da precipitação de estruturas de apatita muito mais que o cálcio e o fosfato.

A contribuição da deposição de minerais nas mudanças ópticas previamente observadas nas lesões fora novamente abordadas por Silverstone em 1980. O aumento da birrefringência negativa ocorreria pela deposição de cristais de hidroxiapatita e outros minerais ou pela deposição mineral amorfa resultando na redução relevante da birrefringência positiva pela oclusão dos poros. Tal evento poderia ser incitado pelo flúor e outros minerais presentes no interior da lesão ou nos líquidos circundantes.

Assim sendo, vários pesquisadores direcionaram o foco de seus experimentos para o mecanismo de ação do flúor no processo DES-RE. Inicialmente, pensava-se que a fluorapatita (flúor fortemente ligado ao esmalte) seria a protagonista do equilíbrio do binômio DES-RE, mas alguns estudos demonstraram ser a formação de fluoreto de cálcio (CaF_2 – flúor fracamente ligado ao esmalte) a condição essencial para que tal equilíbrio ocorresse, pois esse composto apresentava um interessante efeito antimicrobiano observado durante a sua dissolução: uma ampla quantidade de flúor era liberada nesse processo (de PAOLA *et al.*, 1980).

Nelson *et al.* (1983), através de microscopia eletrônica de varredura, avaliaram a morfologia das superfícies de esmalte submetidas a três agentes fluorados tópicos (verniz fluorado acidulado, verniz de fluoreto de sódio neutro e flúor fosfato acidulado-FFA). Cada substância reagiu de maneira distinta com o esmalte, produzindo seu próprio padrão de condicionamento. Uma maior

espessura da camada superficial foi obtida com o verniz fluorado acidulado e o condicionamento das superfícies de esmalte foi mais severa frente aos dois compostos acidulados, ao passo que com o agente neutro, esta se mostrou mais discreta. Esse padrão condicionante diferenciado implicou diferenças morfológicas superficiais, que poderiam explicar a efetividade do FFA, apesar da formação de um baixo nível de fluoreto fortemente ligado e de uma delgada camada de CaF_2 , pela obstrução dos prismas dos sulcos condicionados pela deposição de pequenos e reativos glóbulos esféricos de CaF_2 .

Frente à diminuição do pH do veículo do fluoreto, a área reativa da superfície do esmalte é aumentada, levando à remoção do fosfato e cálcio solúveis do dente e a reação é acelerada para o aumento da formação de CaF_2 . Nessa situação, a saliva encontra-se subsaturada em relação ao CaF_2 , o qual será dissolvido da superfície dentária formando uma pequena proporção de fluorhidroxiapatita. Em áreas retentivas como a lesão cariosa, ocorre uma rápida formação de CaF_2 cuja retenção será favorecida (LUOMA *et al.*, 1988).

O estudo de Margolis e Moreno (1990) abordou as perspectivas físicoquímicas do mecanismo de ação dos fluoretos, destacando o notório papel destes como possíveis indutores de um efeito cariostático obtido pela redução da solubilidade do esmalte frente à incorporação do flúor à estrutura mineral, pela promoção da remineralização de lesões incipientes de esmalte e deposição de fases fluoradas no interior do biofilme dental que serviriam como fonte de íons minerais em condições ácidas, e através da redução de perdas minerais na superfície do esmalte durante o desafio cariogênico, conferida pela reprecipitação de hidroxiapatita fluoretada no interior do esmalte. Sugeriu-se que para a obtenção de resultados clínicos satisfatórios com o uso de fluoretos, estes deveriam ser estabelecidos e mantidos em baixos níveis no fluido do biofilme, através de freqüentes exposições tópicas.

Ögaard *et al.* (1994) evidenciaram que pouca quantidade de flúor fortemente ligado é formado durante as aplicações tópicas de fluoretos, e que seu efeito clínico seria de menor importância. Por outro lado, o CaF_2 formado serviria como fonte de flúor durante os ciclos de pH no biofilme dental quando frente a baixos valores de pH e à insaturação da saliva frente à fluorapatita e à hidroxiapatita, ocorreriam as perdas minerais (DES), as quais seriam repostas pelo flúor advindo da dissolução do CaF_2 reservado. Assim, altas concentrações

de flúor não seriam necessárias para o controle da progressão das lesões, visto que estudos apontaram como desejável a presença de baixos níveis e em frequência constante desse elemento na cavidade oral. Além disso, a combinação de fluoretos e agentes antibacterianos demonstrou maior efetividade durante o desafio cariogênico mais severo.

Ao abordarem as interações entre o flúor e o esmalte, ten Cate e Featherstone (1996) destacaram que o esmalte é altamente poroso, constituído de cristais minerais semelhantes à apatita, envoltos por água e componentes orgânicos. Carbonato e outras impurezas também estão presentes, tornando-o mais reativo aos ácidos do que a hidroxiapatita pura ou a fluorapatita. O flúor está presente no biofilme, na saliva e no fluido intercrystalino, incorporado aos cristais minerais do esmalte, tendo efeito cariostático primário pela ocorrência de reações na fase aquosa (sobre o dente) e entre os cristais no interior do dente, sendo a sua incorporação a este no período pós-eruptivo e na fase aquosa durante o desafio cariogênico de importância fundamental na paralisação do processo de cárie. A precipitação de CaF_2 e sua redissolução lenta fornecem uma fonte de íons F^- que agem na inibição da DES e no favorecimento da RE. A utilização de baixas concentrações diárias de fluoretos revelou-se como o regime mais efetivo na prevenção da cárie.

Cruz (1997) destacou que a deposição de CaF_2 seria a fase essencial no mecanismo preventivo à cárie, visto que o fluoreto fortemente ligado à superfície dentária se formaria como produto final do processo DES-RE, em que os íons de flúor seriam advindos do material depositado no esmalte. Tanto *in vitro* quanto *in vivo*, os agentes fluorados tópicos induzem a deposição desse produto reacional.

O efeito tópico do flúor foi considerado primário como controlador da cárie tanto para crianças como para adultos, pela inibição da DES / aumento da RE nas superfícies dos cristais e pelo controle da atividade bacteriana. Os benefícios sistêmicos (flúor ingerido) são considerados mínimos, enquanto níveis terapêuticos mínimos de fluoreto podem ser disponibilizados pela água e por produtos fluoretados tópicos, mantendo os níveis salivares de flúor em excesso de 0,03ppm promovendo uma marcada proteção contra a cárie (FEATHERSTONE, 1999).

Para Chow e Vogel (2001), a manutenção da quantidade de flúor na cavidade bucal através da formação de reservatórios/depósitos deste íon favoreceria a remineralização. O desenvolvimento de novos enxaguatórios e dentifrícios que possam favorecer a formação destes depósitos está centrado no surgimento de formulações que sejam altamente efetivas e possuam baixos teores de flúor.

Em 2002, Chow *et al.* demonstraram o efeito de baixas concentrações de flúor em enxaguatórios bucais na remineralização, através da utilização de dupla solução. Como controle positivo e negativo foram utilizados, respectivamente: solução NaF (12 mmol F/L) e um placebo (sem flúor); o agente teste constitui-se de uma dupla solução NaF (6 mmol F/L). Os resultados demonstraram que a solução teste produziu maior remineralização e aumento do conteúdo mineral das lesões, reduzindo a profundidade das mesmas. A efetividade do procedimento dependeria menos da dose de flúor e mais da habilidade do tratamento em utilizar o flúor eficientemente para a remineralização, provavelmente por incitar uma maior deposição de flúor sobre os dentes e no biofilme. Baixos níveis de flúor podem ser vantajosos na minimização da ingestão sistêmica excessiva deste elemento por crianças.

O efeito do flúor em concentração semelhante àquela encontrada no fluido do biofilme sobre o processo DES-RE em baixos valores de pH foi verificado por Lynch *et al.* (2006). Lesões artificiais em esmalte humano foram radiografadas a fim de se quantificar a perda mineral e colocadas em dois sistemas de géis-ácidos contendo altos e baixos teores de cálcio e fósforo (pH: 4,8, 5,0 e 5,2). Em cada pH, uma combinação de cálcio, fósforo e flúor foram adicionados aos géis, obtendo-se valores semelhantes àqueles do biofilme, com um grupo controle sem flúor. Após 10 dias as mudanças minerais foram novamente quantificadas, observando-se uma abundante desmineralização nas amostras que foram submetidas ao grupo controle (sem flúor). As lesões de cárie foram remineralizadas subsuperficialmente a um baixo pH, em concentrações de flúor encontradas no fluido do biofilme durante o desafio cariogênico, isto é, em baixos níveis deste elemento.

2.5.4 Própolis

O termo própolis deriva do grego “pro” (defesa) e “polis” (cidade), sendo empregada no sentido de defesa da colméia, cidade das abelhas. Sua composição química é complexa e varia de acordo com a origem e a idade do produto, sendo seus principais componentes os esteróides, óleos essenciais, ésteres de ácidos graxos, pigmentos vegetais, vitamina B1, vitamina B2 e aminoácidos (MOREIRA, 1986).

As abelhas utilizam a própolis para obstruir fendas na colméia e para prevenir a decomposição de criaturas que ao tentarem invadi-la, foram mortas pelas próprias (BRUMFITT, 1990).

A própolis constitui uma mistura complexa de material resinoso e balsâmico, elaborada pelas abelhas da espécie *Apis mellifera*, a partir de exsudatos dos ramos, flores e caules das árvores (MARCUCCI, 1995), sendo encontrada nas colméias como meio de impermeabilização, isolante térmico, vedante e como forma de antisséptico.

Historicamente, a própolis vem sendo utilizada desde a civilização egípcia e quase todos os povos da antigüidade eram conhecedores de seus efeitos medicinais. Na Bíblia encontra-se menção à própolis (Bálsamo de Giliade), uma especiaria de valor mercantil utilizada no tratamento de feridas (FACCHINI, 1996).

No livro “A vida dos animais”, Aristóteles indicou a própolis para o tratamento de doenças dermatológicas, feridas e supurações. O poeta romano Virgílio mencionara a própolis em suas obras. Os povos incas (1600 a.C.) utilizavam-na no combate à febre e como antiflogístico. Na França (séculos XVIII e XIX) e na África do Sul (1899 a 1902, durante a Guerra dos Boerns), a própolis fora amplamente útil no cuidado de feridas (PAMPLONA, 1997).

2.5.4.1 A Própolis como Antimicrobiano

Em 1990, Brumfitt *et al.* avaliaram a atividade antibacteriana da própolis *in vitro* e *in vivo*. Na fase *in vitro* foram utilizados isolados clínicos de *Streptococcus saprophyticus*, *Streptococcus epidermidis*, Estreptococos do grupo A, B e C, *Candida albicans*, *Corynebacterium* sp, *Echirichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium* e *Bacteróides fragilis*; e cepas laboratoriais de

Staphylococcus aureus e *Bacillus subtilis*. A atividade antimicrobiana mostrou-se restrita aos organismos Gram-positivos. *In vivo*, os voluntários ingeriram cápsulas de 250 mg de própolis três vezes ao dia e a análise da urina não demonstrou nenhum traço de atividade antibacteriana.

A ação antibacteriana de extratos alcoólicos de própolis em concentrações variadas foi abordada por Fuentes e Hernández (1990) em relação às cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis* e *Streptococcus* sp. Concluiu-se que todos os extratos apresentaram ação antibacteriana, independentemente de sua concentração, com certa predileção por bactérias Gram-positivas.

Em estudo *in vitro*, Woisky *et al.* (1994) avaliaram uma formulação preparada a partir da própolis no que se refere à sua atividade antibacteriana. Observou-se ação inibitória sobre bactérias Gram-positivas, visto que as Gram-negativas mostraram-se resistentes.

Koo e Park (1996) atribuíram as atividades farmacológicas da própolis à presença de flavonóides em sua composição química, verificando que a concentração desse componente pode variar dentre as diversas amostras da própolis brasileira, embora apenas a análise quantitativa do teor desse componente não seja suficiente para a determinação da qualidade dos extratos.

Ao analisar a composição química e a capacidade antibacteriana de 46 amostras de própolis obtidas de três regiões brasileiras (Sudeste, Centro-Oeste e Sul), o estudo de Park *et al.* (1997) revelou que todos os extratos etanólicos de própolis (EEP) da amostra possuíam altas concentrações de flavonóides em teores que diferiram entre si, conforme o Estado de origem, sendo que a concentração total de flavonóides da própolis oriunda do Mato Grosso do Sul (Campo Grande e Jaraguari) foi, em média, de 12,5mg/g de própolis. Todas as amostras demonstraram propriedade de inibição para *Staphylococcus aureus* coagulase positivos, enquanto *Esceirichia coli* não fora inibida.

2.5.4.2 A Utilização da Própolis na Odontologia

O uso terapêutico de substâncias naturais acabou despertando o interesse da Odontologia pela própolis, levando à realização de experimentos em várias áreas, como a Periodontia, Cirurgia Oral, Patologia Oral e Cariologia.

No campo da Periodontia, Martinez Silveira *et al.* (1988) compararam os efeitos do propolan (50% de própolis, propilenoglicol em álcool 95%) e álcool 95% (solução placebo) em gengivites crônicas e em úlceras bucais recorrentes e inespecíficas em humanos. O estudo demonstrou que as áreas tratadas com propolan apresentaram recuperação mais rápida do que as tratadas com o placebo, devido aos efeitos antimicrobianos (especialmente sobre bactérias Gram positivas), cicatrizantes, anestésicos e de incremento de resposta imune local do propolan.

Magro Filho e Perri de Carvalho (1990) avaliaram a utilização da própolis em Cirurgia Oral, examinando histologicamente os efeitos da mesma em feridas cirúrgicas pós exodontias (alvéolos) e feridas de pele (uso local) em ratos, concluindo que a aplicação da solução hidroalcoólica de própolis promoveu uma aceleração da epitelização das feridas de pele, mas não acelerou a cicatrização das feridas cirúrgicas pós exodontias.

O estudo de Ikeno e Miyazawa (1991) realizado em ratos demonstrou a eficácia da própolis no processo inibitório do crescimento da microbiota cariogênica e da atividade das enzimas glicosiltransferase (GTF), especificamente nos estreptococos do grupo mutans, os quais são fortemente associados ao início do processo da doença cárie, sugerindo a atividade anticariogênica da própolis.

Em um segundo estudo, Magro Filho e Perri de Carvalho (1994) observaram os efeitos tópicos do enxaguatório de própolis no reparo de sulcoplastias pela técnica de Kazanjian modificada, concluindo que o mesmo auxiliou na reparação das feridas cirúrgicas intrabucais, proporcionando efeito antiinflamatório e analgésico.

Em estudos de Patologia Oral, Cabarocas e Gomez (1994) observaram a efetividade da própolis em relação à estomatite aftosa em 60 pacientes, concluindo que em mais de 90% das lesões tratadas com própolis observou-se efeito analgésico e epitelização clínica, quando comparadas ao grupo controle.

Gebara *et al.* (1996), em estudo realizado *in vitro*, avaliaram a ação antimicrobiana de substâncias naturais sobre *Streptococos mutans* e *Streptococos sobrinus*, dentre elas a tintura de própolis, comprovando sua ação antibacteriana, e também a capacidade de inibir a adesão bacteriana desses

microorganismos, o que sugeriu a possibilidade do uso desta substância no controle do biofilme bacteriano bucal.

Os efeitos antibacterianos da própolis e do mel foram investigados por Steinberg *et al.* (1996) que verificaram, em estudo *in vitro*, na presença de concentrações baixas de mel houve o aumento do crescimento bacteriano, e em concentrações acima de 4,16%, observou-se a redução deste; em concentrações baixas de própolis não houve alterações significativas no crescimento bacteriano, mas ao passo em que a concentração foi aumentando, o padrão de crescimento foi alterado, obtendo-se a inibição completa na concentração de 0,4% de própolis. No estudo *in vivo*, os voluntários bochecharam 5 mL de mel durante 4 minutos, quando observou-se uma redução de 60% e 40% na contagem de bactérias totais viáveis, e de 58% e 54% na contagem de *Streptococcus mutans*, respectivamente, dez minutos e uma hora após os bochechos. Em relação à própolis, a solução bochechada pelos voluntários foi de 0,2%, durante 1,5 minutos, observando-se redução de 38% na contagem de totais viáveis e 42% na contagem de *Streptococcus mutans*, após 10 minutos da realização do bochecho.

A enzima glicosiltransferase (GTF) é a responsável pela síntese de glucanos a partir da sacarose, os quais são essenciais ao metabolismo das bactérias componentes do biofilme cariogênico. Em um estudo que comparou amostras de própolis de vários Estados brasileiros em relação a sua capacidade antibacteriana e de inibir a enzima GTF, Park *et al.* (1998a) concluíram que todas as amostras de própolis testadas inibiram a produção de GTF por *Streptococcus mutans*, merecendo destaque as amostras do Rio Grande do Sul (inibição= 30,5%) e do Mato Grosso do Sul (inibição= 19,4%), cujos halos de inibição para *Streptococcus mutans* foram de 3,0mm e 1,5mm, respectivamente.

No mesmo ano, Ota *et al.* estudaram a atividade antimicrobiana da própolis sobre bactérias recém-isoladas da cavidade bucal. Observou-se evidente atividade antibacteriana dessa substância sobre todas as cepas testadas, na seguinte ordem de sensibilidade: *Streptococcus mutans* > *Lactobacillus* sp. > *Staphylococcus aureus* > *Staphylococcus epidermidis*, indicando a possibilidade de utilizá-la frente a infecções oportunistas causadas por esses microrganismos e também na prática clínica odontológica, com a finalidade de controlar a atividade de cárie.

Koo *et al.* (1999) avaliaram o efeito de duas amostras de própolis coletadas no Rio Grande do Sul e em Minas Gerais no desenvolvimento de cáries em ratos desalivados, concluindo que a amostra advinda do Rio Grande do Sul apresentou efeito cariostático mais significativo que a de Minas Gerais, em função de diferenças qualitativas e quantitativas em suas composições químicas.

Zárate-Pereira (1999) comparou a ação de uma solução de própolis 5% acrescida de fluoreto de sódio 0,05% e do fluoreto de sódio 0,05% isolado na redução de estreptococos do grupo mutans em pacientes com atividade de cárie. Foram realizados bochechos durante 15 dias, observando-se que a solução de própolis acrescida ao fluoreto reduziu a quantidade de microorganismos salivares em cerca de 66,93%, o que não foi observado no grupo de voluntários que bochecharam apenas o fluoreto de sódio 0,05% (controle). Decorridos 15 dias após a realização do último bochecho, as contagens salivares de estreptococos mutans tenderam aos valores iniciais.

Os EEP advindos dos Estados de Minas Gerais e Rio Grande do Sul foram averigüados quanto a sua capacidade de inibir a GTF-B (responsável pela síntese de glucanos insolúveis); GTF-C (sintetiza glucanos solúveis e insolúveis) e a GTF-D (que sintetiza glucanos solúveis) obtidas em duas versões: GTF purificada em solução e GTF adsorvida à superfície de blocos de esmalte dentário coberta por saliva. Os EEP das duas regiões apresentaram atividade inibitória a todas as GTFs em solução (75-95%) e adsorvidas ao esmalte (45-95%), quando concentradas entre 0,75% e 3,0 mg/mL (KOO *et al.*, 2000a).

Comparando o efeito de uma nova variedade de própolis oriunda da Bahia em relação à própolis de Minas Gerais sobre os estreptococos do grupo mutans (EGM), Koo *et al.* (2000b) concluíram que ambas demonstraram atividade biológica contra EGM, mas a amostra baiana apresentou melhores resultados no que se referiu ao crescimento dessas bactérias, aderência celular e síntese de glucanas insolúveis.

A comparação *in vitro* da atividade antimicrobiana da própolis e da *Arnica montana* contra patógenos orais foi realizada por Koo *et al.* (2000c). De acordo com os resultados, a própolis teve capacidade inibitória significativa para todos os microorganismos testados, demonstrando ação similar em relação à aderência bacteriana e à síntese de glucanos insolúveis, comportamento não observado nas amostras de arnica.

Koo *et al.* (2002a) avaliaram o efeito de um colutório à base de própolis no acúmulo de placa e na formação de polissacarídeos insolúveis. Os voluntários que fizeram o uso do colutório obtiveram menor índice de placa e uma concentração menor de polissacarídeos insolúveis presentes na placa dental quando comparados ao grupo placebo.

Koo *et al.* (2002b) avaliaram os efeitos dos componentes encontrados na própolis sobre o crescimento de *Streptococcus mutans* e na atividade da GTF. Vários componentes foram aferidos, dentre eles os flavonóides, que se comportaram como potentes inibidores da GTF e também inibiram o crescimento bacteriano.

Para Swertz *et al.* (2002), a atividade antibacteriana *in vitro* da própolis contra bactérias cariogênicas e periodontopatogênicas é relevante, principalmente em relação à inibição das glicosiltransferases.

Ao analisar a ação de dois componentes naturais da própolis, o apigenin e o *tt*-farnesol, sobre o desenvolvimento de cáries em ratos, Koo *et al.* (2003) concluíram que a associação desses componentes obteve efeito cariostático em baixas concentrações. O apigenim demonstrou ser o primeiro agente cariostático natural, devido a sua habilidade em inibir a enzima glicosiltransferase, diminuindo a síntese de glucanas em níveis nunca antes observados. Esses compostos agem nos fatores de virulência das bactérias e/ou em seu metabolismo cariogênico, e quando associados ao uso de fluoretos, podem aumentar o efeito destes no equilíbrio do processo de desmineralização/remineralização do esmalte dental.

Em um estudo *in situ* que avaliou a ação da própolis de *Apis mellifera* no desenvolvimento da cárie dentária e na formação do biofilme dental, Zárate-Pereira (2003) observou a atuação da própolis sobre a placa bacteriana supragengival, agindo de maneira significativa na população de estreptococos totais, estreptococos do grupo mutans, lactobacilos e total de bactérias viáveis, bem como a redução da perda mineral na lesão de cárie de esmalte dental, na presença de desafio cariogênico.

A influência da associação de apigenin e *tt*- farnesol (flavonóides encontrados na própolis) ao flúor no controle do biofilme cariogênico foi novamente investigada por Koo *et al.* (2005). O estudo demonstrou que tal associação aumentou as propriedades anti-cárie do flúor pela ação sinérgica

destes componentes. Em geral, os biofilmes expostos a essa combinação desenvolveram uma menor biomassa, menor quantidade de glucanos insolúveis e polissacarídeos intracelulares em relação aos biofilmes tratados com estas substâncias isoladamente. Para os autores, a combinação destes agentes com o flúor pode representar uma utilidade potencial e um enfoque alternativo para as atuais estratégias quimioterápicas com vistas à prevenção da doença cárie, pela redução da expressão de virulência dos *Streptococcus mutans*, sem necessariamente suprimir a flora bacteriana oral residente.

Uzel *et al.* (2005) destacaram que, por ter sido eficaz na inibição do crescimento de patógenos orais como os *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*, a própolis parece ser uma fonte promissora de novos agentes preventivos à cárie dentária e a outras doenças bucais.

O apigenin é considerado um potente inibidor da atividade das GTF, afeta o acúmulo de *Streptococcus mutans* pela redução da formação de glucanas insolúveis e pelo aumento do conteúdo de glucanas solúveis da matriz de polissacarídeos nos biofilmes *in vitro*. Koo *et al.* (2006) evidenciaram a influência do apigenin na expressão dos genes *gtf B*, *C* e *D* de *Streptococcus mutans*, a qual pode ser induzida pela sacarose, revelando que na presença desse composto, a expressão de *gtf B* e *C* diminuiu mais que 50% e quando houve a adição de sacarose, nenhum efeito foi observado no perfil de expressão desses genes; em contraste, a expressão do *gtf D* foi aumentada. Nesse estudo, ficou claro o efeito do apigenin na expressão dos genes envolvidos na síntese de PECs, indicando que esse flavonóide possui características terapêuticas únicas, pois afeta a atividade e a expressão das enzimas GTF sem desencadear efeitos antibacterianos, característica que pode ser responsável pelas suas propriedades anti-cárie.

No mesmo ano, o estudo de Duarte *et al.* averiguou a influência do EEP a 5% sobre biofilmes de *Streptococcus mutans* e desenvolvimento de cárie em ratos. Observou-se a capacidade significativa desse EEP em reduzir o desenvolvimento de cárie dentária em roedores expostos a um alto desafio cariogênico por outros mecanismos que não a inviabilização dos microrganismos. Os dados do estudo indicaram hipóteses pelas quais o EEP utilizado possa ter exercido efeito cariostático: a redução da acidogênese pelo biofilme

estreptocócico; a inativação do sistema F-ATPase de translocação de prótons e a inibição da síntese de glucanas insolúveis pelas enzimas GTF. A perturbação desses fatores de virulência, que são críticos aos *Streptococcus mutans*, particularizou a utilização da própolis na concentração empregada a fim da obtenção de efeito cariostático, sem que a viabilidade da microflora residente fosse afetada.

Com o objetivo de avaliarem a ação de uma solução anti-séptica do EEP a 6,25% e da clorexidina 0,12% (controle positivo) sobre o Índice de Higiene Oral Simplificado (IHO-S), Índice de Sangramento Gengival (ISG) e na contagem de *Streptococcus mutans*, Almeida *et al.* (2006) verificaram que 24 horas após o término dos bochechos ocorreu uma redução de 72,3% e 75,3% nos níveis salivares de *Streptococcus mutans*, utilizando-se o EEP e o controle positivo, respectivamente. Após 21 dias, as contagens de *Streptococcus mutans* se mostraram próximas aos valores iniciais para ambas as soluções. Em todas as contagens bacterianas realizadas não foram observadas diferenças estatisticamente significantes na atuação da própolis e da clorexidina. A análise do ISG revelou uma redução significativa no incremento da doença pela utilização do EEP; comparando-se os valores do IHO-S prévio e posterior aos bochechos, notou-se que a solução de própolis não promoveu redução significativa nesse índice, quando comparada com a solução de clorexidina. Concluiu-se que a solução empregada reduziu significativamente os níveis salivares de *Streptococcus mutans*, atuou sobre as condições gengivais e acúmulo de biofilme, podendo ser indicada como agente de controle químico terapêutico do biofilme dental.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi verificar a ação de um gel experimental composto de própolis associada ao fluoreto, sobre o acúmulo do biofilme dental, as contagens salivares de *Streptococcus mutans*, e a capacidade de inativação de manchas brancas, em crianças de alto *status* de risco à cárie.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção do Extrato Etanólico de Própolis (EEP)

A amostra bruta de própolis de *Apis mellifera* oriunda da cidade de Ivinhema (MS) foi armazenada em dessecador com sílica à temperatura ambiente, sendo posteriormente triturada e homogeneizada a fim de se obter a extração inicial, conforme indicado por Park *et al.* (1998b).

A relação volumétrica do extrato inicial foi de 30/70 (massa/volume). Assim sendo, utilizou-se 300g de própolis para 700 mL de etanol. A extração foi realizada durante duas horas, a 70°C, em chapa de aquecimento sob agitação constante. A amostra fora então centrifugada a 4500 rotações por minuto (rpm) durante 5 minutos, sendo o sobrenadante separado e o extrato obtido filtrado. Subseqüentemente, o EEP foi acondicionado em vidro âmbar a 5°C.

Realizou-se a análise química do EEP, através da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em coluna de fase reversa (VARIAN ProStar[®], com detector de UV-VISÍVEL). O teor de flavonóides observado na amostra analisada foi de 37,5 mg/g de própolis, sendo considerado de boa qualidade, atendendo aos requisitos do Ministério da Agricultura e Abastecimento e corroborando/superando as amostras utilizadas em experimentos realizados na área odontológica. O cromatograma (Figura 1, Anexo A) demonstra que a própolis estudada possui altos teores de ácidos fenólicos (caféico e gálico), além do teor de flavonóides adequado (PAVANELLI, 2006).

O EEP foi filtrado e diluído com água destilada, atingindo-se então a concentração de 5% (95% de água + 5% de EEP), estabelecida como a Concentração Inibitória Mínima (CIM) da própolis sobre *Streptococcus mutans* (ZÁRATE-PEREIRA, 2003).

4.2 Preparação dos Géis:

A elaboração dos géis foi realizada na Farmácia Escola da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, sob a responsabilidade do professor Lothar Peters. A partir do EEP a 5% e através da adição de carboximetilcelulose, dois géis (A/B) foram obtidos, um contendo Própolis 5% e outro contendo Própolis 5% + NaF 0,05%, ambos semelhantes quanto a aparência física, odor e sabor. O conteúdo de cada gel fora mantido sob a

custódia do professor responsável até a finalização do experimento, sendo revelado somente na oportunidade da análise dos resultados. Os géis foram acondicionados em tubos plásticos âmbar e mantidos refrigerados a 5°C a fim de se evitar alterações químicas em seu conteúdo.

4.3 Seleção da Amostra:

A amostra foi composta previamente por 113 crianças, de ambos os gêneros, com idade de 6 a 12 anos. Após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos / UFMS (Anexo B) e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Figura 1 do Apêndice) pelos responsáveis, foram realizados a contagem prévia de UFC de SM, um levantamento epidemiológico a fim de se obter o índice CPO-D (OMS, 1999) e a quantificação da presença de manchas brancas ativas. Aplicou-se como critério de exclusão o uso de antimicrobianos nos seis meses anteriores à fase experimental e UFC SM/mL de saliva $\leq 10^6$, fato que reduziu a amostra para 97 voluntários. As crianças foram examinadas por um único examinador, previamente calibrado ($Kappa=0,97$), onde verificou-se $CPO-D=3,10$.

Em relação às manchas brancas, estas foram consideradas ativas quando ao exame físico, frente à secagem dos dentes, as mesmas apresentavam-se opacas e com presença de rugosidade superficial, conforme indicado por Thylstrup e Fejerskov (1995). Desse modo, foram consideradas inativas as manchas brancas que clinicamente apresentassem a recuperação do brilho e da lisura superficiais, podendo estas permanecer esbranquiçadas, pigmentadas ou até mesmo desaparecerem (BACKER DIRKS, 1966).

A estimativa do IHO-S, proposta por Greene e Vermillion (1964), fora realizada previamente à aplicação dos géis (IHO-S₁) e 48 horas após a última aplicação (IHO-S₂), a fim de se obter a quantificação do acúmulo de biofilme dos grupos. Foram examinadas as superfícies vestibulares dos elementos 16, 11, 26 e 31, e as superfícies linguais do 36 e 46, obtendo-se o Índice de Resíduos (IR) e o Índice de Cálculo (IC), os quais representaram o somatório do valor dos escores observados para cada dente dividido pelo número de dentes examinados. O IHO-S é a soma dos valores do IR e do IC. Os escores utilizados para avaliação do IR,

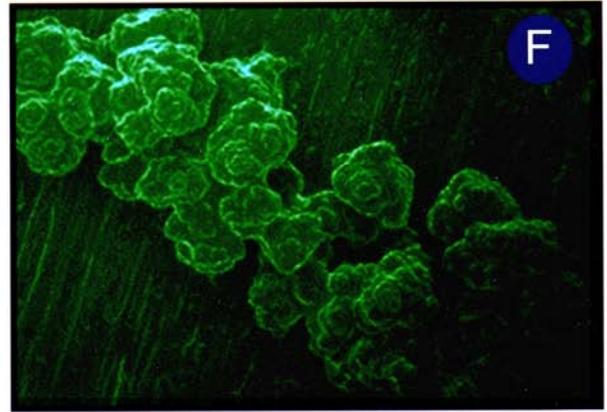
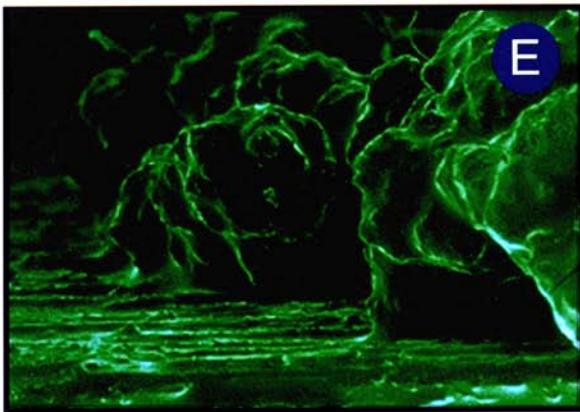
IC e a interpretação clínica do IHO-S são apresentados nas Figuras 2, 3 e 4, respectivamente (Anexo C).

4.4 Análise Microbiológica

Essa fase do estudo foi realizada no Laboratório de Microbiologia da UFMS.

Para a análise quantitativa dos níveis salivares de *Streptococcus mutans* foi utilizado o ágar mitis salivarius (Laboratório Difco, Detroit), enriquecido com sacarose (Laboratório Difco, Detroit) e bacitracina (Sigma), configurando-se dessa forma o ágar mitis salivarius bacitracina (ágar MSB) seletivo para *Streptococcus mutans*: 90g de ágar mitis salivarius, 150 g de sacarose e água destilada (q.s.p. 1000 mL). O meio foi homogenizado e autoclavado a 115°C, durante 15 minutos, sendo em seguida resfriado à temperatura de 50°C, adicionando-se 5mL da solução de bacitracina (2 UI/mL) e 1 mL de telurito de potássio 1% (GOLD *et al.*, 1973). Imediatamente após, o meio foi vertido nas placas de Petri tipo Rodac (Krall), em capela de fluxo laminar sob luz ultra-violeta (Labconco Corporation®, Kansas City, Missouri) e colocadas na estufa por 24 horas, a 37°C, para verificação de ausência de contaminação.

A estimativa dos níveis salivares de *Streptococcus mutans* foi realizada pela utilização da técnica da espátula, proposta por Köhler e Brathall (1979). As crianças mastigaram um chiclete de parafina por um minuto; mergulhou-se no assoalho da boca uma espátula de madeira estéril, girando-a dez vezes; com os lábios cerrados, removeu-se a espátula; fez-se a impressão de cada lado da espátula no ágar MSB (Figura 4.1 A); as placas contendo o ágar com a impressão da espátula foram acondicionadas em sacolas plásticas contendo ar expirado, seladas e encubadas por 48 horas à 37° C (Figuras 4.1 B e C); após esse período, realizou-se as contagens das unidades formadoras de colônias – UFC – (Figura 4.1 D) através de estereomicroscópio (INALH®, México). A união dos *Streptococcus mutans* à espátula está representada nas Figuras 4.1 E e F.



Desse modo, realizou-se a classificação dos indivíduos em relação ao risco de cárie, conforme demonstrado na Figura 4.2.

UFC /cm ²	UFC / mL saliva	Risco à cárie
0-20	0 -10 ⁵	Baixo
21-100	10 ⁵ - 10 ⁶	Moderado
> 100	> 10 ⁶	Alto

Figura 4.2 - Relação entre as UFC contadas/cm², UFC/ mL de saliva e *status* de risco à cárie.

Fonte : adaptado de Köhler e Brathall (1979).

4.5 Delineamento do Estudo

A amostra (n=97) foi aleatoriamente distribuída em dois grupos: Grupo I (n=49), cujo controle de placa bacteriana foi realizado com o Gel A, e Grupo II (n=48), no qual foi utilizado o Gel B. Ambos os grupos frequentaram a clínica da disciplina de Clínica Integrada I da Faculdade de Odontologia Prof. Albino Coimbra Filho da UFMS, recebendo orientações acerca dos cuidados necessários em relação à higiene bucal e quando necessário, foram encaminhados para realizarem adequação do meio bucal com cimento de óxido de zinco e eugenol, sem a utilização de fluoroterapia.

Em *baseline* (T₀), foram realizadas as estimativas do CPO-D, de SM, IHO-S₁ e das MB; durante 4 semanas consecutivas, efetuou-se a aplicação dos géis. Em T₁ (24 h após a última aplicação tópica), nova estimativa de SM foi realizada e 24 h após, quantificou-se o IHO-S₂. Decorridos 15 dias da última aplicação (T₁₅), as estimativas finais de SM e das MB foram mensuradas. O delineamento experimental é mostrado na Figura 4.3.

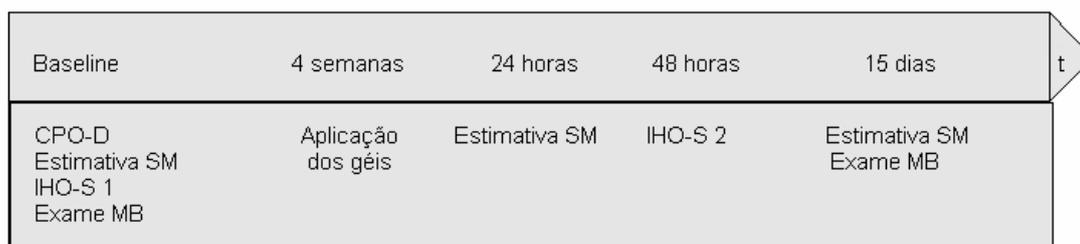


Figura 4.3 – Delineamento da fase experimental.

Foram realizadas 4 aplicações consecutivas dos géis (uma vez por semana, durante quatro semanas), pois conforme Jardim (2003), somente a partir de 3 a 4 aplicações tópicas de flúor verificou-se um maior reservatório desse elemento disponível para a inibição do processo de desmineralização do esmalte dentário. Durante o período de utilização dos géis, tanto o profissional como as crianças não tinham conhecimento da composição dos mesmos (estudo duplo cego). Dessa forma, com o isolamento relativo das arcadas dentárias, os géis foram aplicados com a utilização de hastes flexíveis (Cotonetes®, Johnson e Johnson), durante 1 minuto. Na próxima etapa, foram desenvolvidas as ações conforme demonstrado no delineamento do estudo, os dados tabulados e comparados aos obtidos previamente.

4.6. Tratamento Estatístico

Para a análise estatística dos valores médios das variáveis UFC/mL de saliva e IHO-S foi aplicado o teste de Wilcoxon e t de Student, respectivamente, no nível de significância de 5%. O teste de Wilcoxon / t de Student foi utilizado para a análise dos grupos nos diferentes períodos (*baseline*, 24 horas, 48 horas e 15 dias) e o teste de Mann-Whitney para a comparação entre os grupos nos mesmos períodos.

5 RESULTADOS

5.1 Análise Microbiológica

Finalizada a fase de aplicação dos géis, foi revelado que o Gel A era constituído de Própolis 5% + NaF 0,05% (Grupo I), e o Gel B de Própolis 5% (Grupo II).

As médias referentes aos níveis salivares de SM da amostra antes (T_0), 24 horas (T_1) e 15 dias (T_{15}) após o término das aplicações dos géis A e B são mostrados na Tabela 5.1 e Figura 2 do Apêndice.

Tabela 5.1 – Média (\pm DP) de UFC / mL de saliva de SM dos Grupos I e II, antes e após as aplicações dos Géis A e B (n = 97). Campo Grande – MS, 2007.

Períodos Grupos	T_0	T_1	T_{15}
Grupo I (Própolis 5% + NaF 0,05%) (n = 49)	97,85 (\pm 5,29)	9,32 (\pm 5,48)	63,67 (\pm 22,25)
Grupo II (Própolis 5%) (n = 48)	98,67 (\pm 4,44)	32,42 (\pm 6,34)	87,21 (\pm 17,18)

$p < 0,0001$; nível descritivo para o teste de Wilcoxon

A Tabela 5.2 apresenta as diferenças das médias observadas dos níveis salivares de *Streptococcus mutans* (SM) após a aplicação dos géis experimentais.

Tabela 5.2 – Diferença entre as médias de UFC/mL de saliva de SM dos Grupos I e II, nos diferentes períodos (n = 97). Campo Grande – MS, 2007.

Períodos	T₀-T₁	T₀-T₁₅	T₁-T₁₅
Grupos			
Grupo I (Própolis 5% + NaF 0,05%) (n = 49)	88,53 ^{ab}	32,25 ^{ab}	56,33 ^{ab}
Grupo II (Própolis 5%) (n = 48)	66,28 ^{ab}	11,49 ^{ab}	54,79 ^{ab}
GRUPO I x GRUPO II	65,48 ^{ab}	10,69 ^{ab}	77,89 ^{ab}

^{ab} Letras distintas – estatisticamente significantes ($p \leq 0,05$)

^{aa,bb} Letras iguais – diferenças não significantes ($p > 0,05$)

Wilcoxon: diferenças entre tempos no mesmo grupo.

Mann-Whitney: diferenças entre grupos no mesmo intervalo de tempo

5.2 Manchas Brancas

No *baseline* foi verificada a presença de 71 manchas brancas ativas ao exame clínico. A distribuição dessas lesões nos diferentes grupos antes e após a aplicação dos géis é mostrada na Tabela 5.3. A realização do teste do qui-quadrado revelou que há relação entre o gel aplicado e a inativação das manchas brancas ($p < 0,0001$).

Tabela 5.3 – Distribuição de manchas brancas ativas, antes e após as aplicações dos géis, nos Grupos I e II (n = 97). Campo Grande – MS, 2007.

Períodos	T ₀	T ₁₅
Grupos		
Grupo I (Própolis 5% + NaF 0,05%)	43,60% (n=31)	7,80% (n=03)
Grupo II (Própolis 5%)	56,40% (n=40)	92,2% (n=35)
TOTAL	100,00% (n=71)	100,00% (n=38)

5.3. Acúmulo do Biofilme

A Tabela 5.4 apresenta a quantificação do acúmulo do biofilme dental, expressa pelas médias do IHO-S₁ e IHO-S₂ para o total da amostra, e conforme o grupo experimental ao qual pertenciam os participantes.

Tabela 5.4 – Média (\pm DP) do IHO-S₁ e IHO-S₂ para os Grupos I e II (n = 97). Campo Grande – MS, 2007.

Índices	IHO-S ₁	IHO-S ₂	Significância
Grupos			
Grupo I (Própolis 5% + NaF 0,05%)	1,80 (\pm 0,51)	1,13 (\pm 0,41)	1%
Grupo II (Própolis 5%)	1,66 (\pm 0,40)	1,06 (\pm 0,27)	1%

$p = 0,01$; nível descritivo para o teste t de Student

Comparando-se as médias do IHO-S₁ e IHO-S₂ entre os Grupos I e II, o teste t de Student revelou não haver diferença estatisticamente significativa entre as mesmas ($p = 0,173$ ou $p > 0,05$).

O Boxplot das médias e desvios e da mediana e quartis do IHO-S estão apresentados nas Figuras 3 e 4 do Apêndice.

6 DISCUSSÃO

A utilização de produtos naturais na prevenção e tratamento de doenças data de longos períodos na história da humanidade. Na Odontologia, essa possibilidade mostra-se ainda discreta, visto o curto período de desenvolvimento dos estudos a respeito desses recursos. Entretanto, as investigações intensificaram-se nas últimas décadas, embasadas nos resultados promissores que alguns produtos têm apresentado, principalmente quando se trata das doenças de significativa prevalência como a cárie dentária.

Esse conceito é reforçado pelas mudanças de paradigmas ocorridas na Odontologia, as quais promoveram alterações na abordagem do processo saúde-doença cárie que outrora fora centrado no modelo cirúrgico-restaurador, e atualmente é embasado nos preceitos da Promoção da Saúde, caracterizada por valorizar, dentre outros aspectos, a necessidade da avaliação de risco e atividade da doença (BUISCHI *et al.*, 1989; BRATTHALL e HÄNSEL-PETERSSON, 2000; MALTZ, 2000; KIDD e NYVAD, 2005). Nesse sentido, tornou-se relevante o entendimento de que indivíduos com altas contagens salivares de *Streptococcus mutans* possuem risco e atividade de cárie exacerbados (KLOCK e KRASSE, 1979; ZICKERT *et al.*, 1983).

Apesar do entendimento de fatores etiológicos secundários na ocorrência da doença, o foco sobre o monitoramento do biofilme como método de controle e prevenção à cárie justifica o desenvolvimento de estudos semelhantes a este. É fato que em indivíduos de alto risco / atividade de cárie é necessário conjugar ao controle mecânico do biofilme a utilização de substâncias químicas (van HOUTE e GREEN, 1974; ZICKERT *et al.*, 1982; RÖLLA, 1988; RUSSELL, 1994; SCHEIE, 1994; MALTZ, 2000; SCHEIE, 2005).

Entre essas substâncias, o fluoreto apresenta indicação consagrada no controle e tratamento da cárie, tendo em vista sua comprovada ação reguladora do equilíbrio do processo DES-RE (BOWEN e HEWITT, 1974; WITTFORD *et al.*, 1977; LESHER *et al.*, 1977; RÖLLA, 1977; HAMILTON, 1977; HAMILTON e ELLWOOD, 1978; FEJERSKOV *et al.*, 1981; MALTZ e EMILSON, 1982; HAMILTON e BOWDEN, 1982; BOWDEN *et al.*, 1982; GERMAINE e TELLEFSON, 1986; MARQUIS 1990; MALTZ *et al.*, 2003).

Sobre o fluoreto, há que se atuar com parcimônia sobre o aspecto de concentração da solução. Frente aos efeitos adversos que a exposição inadvertida às altas concentrações de flúor poderiam causar, o efeito positivo das baixas concentrações de flúor sobre a comunidade microbiana bucal e sobre o binômio DES-RE fora comprovado (SILVERSTONE, 1972; ZERO *et al.*, 1988; BRADSHAW *et al.*, 1990; MARSH e BRADSHAW, 1990; MARGOLIS e MORENO, 1990; ÖGAARD *et al.*, 1994; MARQUIS, 1995; HAMILTON e BOWDEN, 1996; ten CATE e FEATHERSTONE, 1996; FEATHERSTONE, 1999; CHOW e VOGEL, 2001; CHOW, 2002; LYNCH *et al.*, 2006), o que justifica o emprego da solução de NaF 0,05% no presente estudo.

Ainda assim, a utilização de agentes naturais no controle químico do biofilme dental tem merecido especial atenção. Dentre estes, a própolis de *Apis mellifera* tem se destacado, principalmente no que se refere a sua capacidade antimicrobiana (BRUMFITT *et al.*, 1990; FUENTEZ e HERNÁNDEZ, 1990; WOISKY *et al.*, 1994; PARK *et al.*, 1997). Entretanto, escassos são os estudos que associam a própolis ao fluoreto de sódio. Essa proposta, iniciada por Zárate-Pereira em 1999, e posteriormente avaliada por Koo *et al.* em 2003 e 2005, busca uma solução composta por um constituinte que comprovadamente

atue na remineralização do esmalte (equilíbrio do processo DES x RE) sob alto desafio cariogênico, aliado a uma substância natural com capacidade antimicrobiana. A baixa concentração do fluoreto na solução e a ausência de contra-indicação da própolis tornam a proposta promissora no controle e prevenção da cárie, minimizando a possibilidade da intoxicação aguda e otimizando a ação inibitória sobre o biofilme. Essa prerrogativa ainda é reforçada pela consistência da solução na forma de gel, possibilitando maior controle sobre a deglutição devido ao menor escoamento.

6.1 Ação dos Géis sobre SM

A fim de que a ação dos géis A e B fosse claramente avaliada, todas as crianças selecionadas para o estudo possuíam 10^6 UFC/mL de saliva de SM. Após o período de aplicação, verificou-se redução significativa ($p < 0,0001$) da média de UFC de SM, em ambos os grupos, ou seja, tanto nos indivíduos que fizeram uso do gel de Própolis 5% + NaF 0,05%, como aqueles que utilizaram apenas o gel de Própolis 5%. Estes resultados nos permite inferir ser efetiva a ação da própolis, na concentração utilizada, sobre os níveis salivares de SM, microrganismo responsável pelo início da lesão de cárie, fato que vai ao encontro dos resultados obtidos nos estudos desenvolvidos, *in vivo*, por Steinberg *et al.*, 1996; Ota *et al.*, 1998; Zárate-Pereira, 2003; Almeida *et al.*, 2006; Duarte *et al.*, 2006. Porém, essa redução foi mais acentuada durante as aplicações, visto que 15 dias após a última aplicação, observou-se uma tendência de retomada aos valores iniciais de UFC/mL de saliva de SM, o que concorda com os achados de Zárate-Pereira (1999).

Sabido que ambas as soluções reduziram os níveis salivares de SM, verificou-se se essa ação foi significativa em T_1 e T_{15} , ao se comparar quantitativamente às UFC SM / mL de saliva de T_0 . Observou-se também sob essa ótica, diferenças significantes entre as médias de UFC de SM / mL de saliva, independente das comparações entre períodos e entre as duas soluções (Tabela 5.2). A associação da própolis ao fluoreto em baixas concentrações comportou-se de maneira semelhante nos estudos de Zárate-Pereira, 1999 e Koo *et al.* em 2003 e 2005. Esses resultados permitem concluir que a Própolis 5% associada ao fluoreto na concentração de 0,05%, atuou reduzindo os níveis de bactérias cariogênicas. Essa ação, de acordo com a literatura, não se observa com o uso de NaF 0,05% isoladamente, o que justifica nosso controle composto de Própolis 5%, e não de NaF 0,05%.

6.2 Inativação de Manchas Brancas

A presença de manchas brancas desmineralizadas na superfície do esmalte, as quais são passíveis de remineralização, indica um alto risco/atividade de cárie e é considerada como o primeiro sinal clínico visível do desenvolvimento da doença (BACKER-DIRKS, 1966; MALTZ *et al.*, 2003). Em nosso estudo, foi verificada a presença de 71 manchas brancas ativas à época da seleção da amostra, estando 43,6% (n=31) nos indivíduos do Grupo I e 56,4% (n=40) nos indivíduos do Grupo II.

Observou-se que concluídas as aplicações dos géis, houve uma redução do total de lesões brancas ativas (n=38), com melhor desempenho do gel composto por Própolis 5% + NaF 0,05%. A redução marcante da quantidade de lesões brancas nos indivíduos que foram submetidos a este gel (Grupo I) nos

permitiu inferir que essa ação deveu-se a presença do fluoreto, visto sua comprovada capacidade de atuar na remineralização do esmalte dentário, propriedade não atribuída à própolis. Embora observada a redução dessas lesões no grupo que utilizou o gel de Própolis 5%, esta não foi semelhante no grupo do gel experimental. Tal fato nos levou à inferência de que a redução ocorrida no Grupo II deu-se graças à inibição do biofilme cariogênico, que quando reduzido leva à diminuição da perda mineral. Resultado semelhante fora observado também por Koo *et al.* em 2003. Em relação aos nossos resultados, o acompanhamento longitudinal desses casos fica indicado, para a obtenção de dados mais consistentes.

6.3 Biofilme

O efeito do controle do biofilme dental no equilíbrio do processo saúde-doença cárie e na prevenção da mesma pode ser considerado uma evidência científica na Odontologia. Partindo-se do princípio de que o biofilme dental constitui uma comunidade bacteriana complexa, heterogeneamente organizada e que abriga microcolônias inseridas em micronichos ecológicos variados, via de regra mais resistentes do que células homólogas planctônicas, a utilização de uma única substância para o controle químico do biofilme dental seria de ação limitada, fazendo-se necessária a associação de dois ou mais agentes para que tal inconveniente fosse suprimido (ÖGAARD *et al.*, 1994; THYLSTRUP e FEJERSKOV, 1995).

Esse conceito reforça também nossa proposta de associação da própolis com o fluoreto. O acúmulo de biofilme cariogênico é considerado fator crítico para o desenvolvimento das lesões de cárie (LÖE, 1969; MALTZ, 2000),

tornando-se necessária a comprovação dos efeitos da própolis como agente facilitador da diminuição desse, o que foi demonstrado nos experimentos de Koo *et al.* (2002a), Koo *et al.* (2005) e Almeida *et al.* (2006).

Neste estudo, para verificação das conseqüências das aplicações sobre o acúmulo do biofilme, foi eleito o Índice de Higiene Oral Simplificado, pela sua praticidade e por ser objetivo em sua metodologia.

De forma geral, independente do gel aplicado, observou-se redução do acúmulo do biofilme para ambos os grupos, com diferença significativa entre IHO-S₂ e IHO-S₁ no nível de 1% ($p=0,01$). Estes valores mostraram que tanto o gel de Própolis 5% + NaF 0,05%, quanto o gel de Própolis 5%, atuaram positivamente sobre o acúmulo do biofilme dental, no sentido de suprimi-lo. Isso nos permite inferir que a significativa redução pode ser atribuída à própolis, visto sua eficaz propriedade antimicrobiana, superior ao fluoreto na concentração de 0,05%. Esses resultados são semelhantes aos mencionados por Koo *et al.*, 2002a; Zárate-Pereira, 2003; Koo *et al.*, 2005 e Almeida *et al.*, 2006.

Os resultados observados em nosso estudo corresponderam às expectativas iniciais, sustentadas pelos relatos de estudos anteriores. A associação da Própolis 5% + NaF 0,05% foi eficaz na redução dos níveis salivares de SM; o mesmo gel foi eficiente na remineralização de lesões de manchas brancas e reduziu significativamente o acúmulo do biofilme. Esse perfil terapêutico da associação proposta corrobora para que em um futuro próximo, essa associação de própolis e fluoreto seja uma possibilidade a mais para a prevenção, controle e tratamento da cárie dentária.

Reforça também esses resultados, a possibilidade de ampliar os horizontes científicos em direção à pesquisa de produtos naturais como forma de expandir as

possibilidades terapêuticas no tratamento das doenças mais prevalentes. O Brasil, com sua flora diversificada, torna-se importante fonte dessas possibilidades, que aplicadas de forma coerente e baseadas em estudos científicos, trazem benefícios que extrapolam o campo da saúde, inclusive com reflexos socioeconômicos e culturais sobre a população brasileira.

7 CONCLUSÕES

Através dos resultados apresentados e respeitando as condições metodológicas deste estudo, concluiu-se que o gel composto de Própolis 5% + NaF 0,05%:

- Reduziu o acúmulo do biofilme dental de forma similar ao gel composto somente de própolis 5%.
- Reduziu significativamente os níveis salivares de *Streptococcus mutans*;
- Foi capaz de reequilibrar o processo DES-RE, inativando manchas brancas.

REFERÊNCIAS¹

Addy M. Plaque control as a scientific basis for the prevention of dental caries. J R Soc Med Suppl 1986; 79(14): 6-10.

Almeida RVD, Castro RD, Pereira MSV, Paulo MQ, Santos JP, Padilha WWN. Efeito clínico de solução anti-séptica a base de própolis em crianças cárie ativas. Pesq Bras Odontoped Clin Integr 2006; 6(1):87-92.

Backer-Dirks O. Post-eruptive changes in dental enamel. J Dent Res 1966; 3(Suppl):503-11.

Beck JD. Risk revisited. Community Dent Oral Epidemiol 1998; 26(4):220-5.

Belli WA, Marquis RE. Adaptation of *Streptococcus mutans* and *Enterococcus hirae* to acid stress in continuous culture. Appl Environ Microbiol 1991; 57(4): 1134-8.

Bowden GHW, Odlum O, Nolette N, Hamilton IR. Microbial populations growing in the presence of fluoride at low pH isolated from dental plaque of children living in area with fluoridated water. Infect Immun 1982; 36 (1): 247-54.

Bowen WH, Hewitt MJ. Effect of fluoride on extracellular polysaccharide production by *Streptococcus mutans*. J Dent Res 1974; 53(2): 627-9.

¹ De acordo com o International Committee of Medical Journal Editors, 1979 (Estilo Vancouver). Abreviaturas de periódicos de acordo com Base de Dados MEDLINE.

Bradshaw DJ, McKee AS, Marsh PD. Effects of carbohydrate pulses and pH on population shifts with in oral microbial communities *in vitro*. J Dent Res 1989; 68(9): 1298-302.

Bradshaw DJ, McKee AS, Marsh PD. Prevention of populations shifts in oral communities *in vitro* by low fluoride concentration. J Dent Res 1990; 69(2): 436-41.

Brasil. Ministério da Saúde. Divisão Nacional de Saúde Bucal. Levantamento epidemiológico em saúde bucal: Brasil, zona urbana 1986. Brasília: 1988.

Brasil. Ministério da Saúde. Mais saúde no sorriso das crianças. Saúde Informe 1998; 72.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica, Coordenação Nacional de Saúde Bucal. Projeto SB Brasil: condições de saúde bucal da população brasileira. Resultados principais. Brasília: 2004.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde, Área Técnica de Saúde Bucal. Levantamento epidemiológico de cárie dentária. Brasília: 1996.

Bratthall D, Hänsel-Peterson G. Avaliação do risco de cárie – uma abordagem atual. In: Buischi YP. Promoção de saúde bucal na clínica odontológica. São Paulo: Artes Médicas; 2000. cap. 7, 149-68.

Bretz WA, Djahjah C, Almeida RS, Hujuel PP, Loesche WJ. Relationship of microbial and salivary parameters with dental caries in Brazilian pré-school children. *Community Dent Oral Epidemiol* 1992; 20:261-4.

Brumfitt W, Hamilton-Miller JMT, Franklin I. Antibiotic activity of natural products: 1. Propolis. *Microbios* 1990; 62:19-22.

Buischi Y, Axelsson P, Barbosa MFZ, Mayer MPA, Prado MCQB, Oliveira LB. Salivary *Streptococcus mutans* and caries prevalence in Brazilian schoolchildren. *Community Dent Oral Epidemiol* 1989; 17: 28-30.

Buischi Y. Situação passada e atual da cárie dentária no Brasil. In: Rode SM, Gentil SN. *Atualização clínica em Odontologia: prevenção e pacientes especiais*. São Paulo: Artes Médicas; 2005. cap. 27, 562-72.

Burdock GA. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (Propolis). *Food Chem toxicol* 1998; 36(4): 347-63.

Cabarrocas FV, Gomez ER. Efectividad del propoleos en el tratamiento de la estomatitis aftosa. *Medicentro* 1994; 10(1):49-58.

Caldwell D, Korber D, Lawrence JR. Confocal laser microscopy and computer image analysis. *Adv Microbiol Ecol* 1992; 12:1-67.

Chaves MM. *Odontologia social*. 3^a ed. São Paulo: Artes Médicas; 1986.

Chow LC, Takagi S, Frukhtbeyn S, Sieck BA, Parry EE, Liao NS, Schumacher GE, Markovic M. Remineralization effect of a low-concentration fluoride rinse in an intraoral model. *Caries Res* 2002; 36(2):136-41.

Chow LC, Vogel GL. Enhancing remineralization. *Operative Dentistry* 2001; Suppl 6: 27-38.

Clarke JK. On the bacterial factor in the etiology of dental caries. *Brit J Exp Pathol* 1924; 5: 141-7.

Corby PM, Lyons-Weiler J, Bretz WA, Hart TC, Aas JA, Boumenna T, *et al.* Microbial risk indicators of early childhood caries. *J Clin Microbiol* 2005; 43 (11): 5753-9.

Costerton JW, Geesey GG, Cheng KG. How bacteria stick. *Sci Am* 1978; 238: 86-95.

Costerton JW, Cheng KG, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M, *et al.* Bacterial biofilm in nature and disease. *Annu Rev Microbiol* 1987; 41: 435-64.

Costerton JW, Lewandovski Z, DeBeer D, Caldwell D, Korber D, James G. Biofilms, the customized microniche. *J Bacteriol* 1994; 176(8): 2137-42.

Cruz RA. Considerações clínicas e laboratoriais sobre a reatividade de compostos fluoretados aplicados topicamente no esmalte dental humano. In: Kriger L. (Coord). ABOPREV: Promoção de saúde bucal. São Paulo: Santos, 1997. cap. 9, 167-99.

Cury JA. Controle químico da placa dental. In: Kriger L. (Coord). ABOPREV: Promoção de saúde bucal. São Paulo: Santos, 1997. cap. 7, 129-40.

Cury JA. Controle químico da placa dental. In: Kriger L. (Coord). ABOPREV: Promoção de saúde bucal. São Paulo: Santos, 2003. cap.8, 141-51.

Cury JA. Uso do flúor e controle da cárie como doença. In: Baratieri LN. Odontologia restauradora – fundamentos e possibilidades. São Paulo: Santos; 2001. cap. 02, 33-68.

de Paola PF, Soparkar PM, van Leeuwen M, Velis R. The anti-caries effect of single and combined topical fluoride systems in school children. Arch Oral Biol 1980; 25: 649-53.

Duarte S, Rosalen PL, Hayacibara MF, Cury JA, Bowen WH, Marquis RE, *et al.* The influence of a novel propolis on mutans streptococci biofilms and caries development in rats. Arch Oral Biol 2006; 51: 15-22.

Duchin S, van Houte J. Colonization of teeth in humans by *Streptococcus mutans* as related to its concentration in saliva and host age. *Infect Immun* 1978a; 20 (1):120-5.

Duchin S, van Houte J. Relationship of *Streptococcus mutans* and lactobacilli to incipient smooth surface dental caries in man. *Arch Oral Biol* 1978b; 23 (9): 779-86.

Ellwood R, Fejerskov O. Uso clínico de flúor. In: Fejerskov O, Kidd E. Cárie dentária: a doença e seu tratamento clínico. Trad. Fábio Luis Mialhe. São Paulo: Santos; 2005. cap. 13, 245-50.

Edwardsson S. Characteristics of caries inducing streptococci resembling *Strep. mutans*. *Arch Oral Biol* 1968; 13: 637-46.

Facchini O. Apiterapia e apiprofilaxia. *Rev Bras Apicultura* 1996; 6(6): 23-4.

Featherstone JDB. Prevention and reversal of dental caries: role of low level fluoride. *Community Dent Oral Epidemiol* 1999; 27:31-40.

Fejerskov O, Thylstrup A, Larsen MJ. Rational use of fluorides in caries prevention: a concept based on possible cariostatic mechanisms. *Acta Odontol Scand* 1981; 39: 241-9.

Fejerskov O, Thylstrup A. Diferentes conceitos sobre a cárie dentária e suas implicações. In: Thylstrup A, Fejerskov O. Cariologia clínica. Trad. Sônia Regina de Lima Maike. São Paulo: Santos; 1995. Cap. 9, 209-17.

Fuentes AMO, Hernández NR. Accion antimicrobiana de los extractos alcoholicos de propóleo. Rev Cub Farm 1990; 24(1): 34-44.

Gebara ECE, Zardetto CGDC, Mayer MPA. Estudo *in vitro* da ação antimicrobiana de substâncias naturais sobre S.MUTANS e S.SOBRINUS. Rev Odontol Univ São Paulo 1996; 10(4):251-6.

Gelbier S, Randall S. Charles Edward Wallis and the rise of London's school dental service. Medical History 1982; 26: 395-404.

Germaine GR, Tellefson LM. Role of the cell membrane in pH-dependent fluoride inhibition of glucose uptake by *Streptococcus mutans*. Antimicrob Agents Chemother 1986; 29(1): 58-61.

Gibbons RJ, van Houte J. Selective bacterial adherence to oral epithelial surfaces and its role as an ecological determinant. Infect Immun 1971; 3 (4): 567-73.

Gibbons RJ. Bacterial adhesion to oral tissues: a model for infectious diseases. J Dent Res 1989; 68(5): 750-60.

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

Greene JC, Vermillion JR. The oral hygiene index: a method for classifying oral hygiene status. J Am Dent Assoc 1960; 61: 29-35.

Greene JC, Vermillion JR. The simplified oral hygiene index. J Am Dent Assoc 1964; 68: 7-13.

Guggenheim B. Streptococci of dental plaques. Caries Res 1968; 2:147-63.

Hamada S, Slade HD. Biology, immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. Microbial Rev 1980; 44(2): 331-84.

Hamilton IR, Bowden GH. Fluoride effects on oral bacteria. In: Fejerskov O, Ekstrand J, Burt BA. Fluoride in Dentistry. Munksgaard; 1996.

Hamilton IR, Bowden GH. Response of freshly isolated strains of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus mitior* to change in pH in the presence and absence of fluoride during growth in continuous culture. Infect Immun 1982; 36 (1): 255-62.

Hamilton IR, Ellwood DC. Effects of fluoride on carbohydrate metabolism by washed cells of *Streptococcus mutans* grown at various pH values in a chemostat. Infect Immun 1978; 19 (2): 434-42.

Hamilton IR. Effects of fluoride on enzymatic regulation of bacterial carbohydrate metabolism. *Caries Res* 1977; 11 (suppl.): 262-91.

Ikeda T, Sandham HJ, Bradley EL. Changes in *Streptococcus mutans* and lactobacilli in plaque in relation to the initiation of dental caries in Negro children. *Arch Oral Biol* 1973; 18: 555-66.

Ikeno K, Miyazawa C. Effects of propolis on dental caries in rats. *Caries Res* 1991; 25:347-51.

Jardim JJ. Lesões de cárie em esmalte submetidas a diferentes tratamentos com flúor tópico *in situ* [Dissertação]. Porto Alegre:Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2003.

Junqueira SR, Frias AC, Zilbovicius C. Saúde bucal coletiva: quadros social, epidemiológico e político. In: Rode SM, Gentil SN. Atualização clínica em odontologia: prevenção e pacientes especiais. São Paulo: Artes Médicas; 2005. cap 29, 591-604.

Keyes PH. Recent advances in dental research. *Bacteriol Int Dent J* 1962; 12(4): 443-64.

Keyes PH. The infectious and transmissible nature of experimental dental caries. Findings and implications. *Arch Oral Biol* 1960; 1(4): 304-20.

Kidd EAM, Nyvad B. Controle da cárie dentária para cada paciente. In: Fejerskov O, Kidd E. Cárie dentária: a doença e seu tratamento clínico. Trad. Fábio Luis Mialhe. São Paulo:Santos; 2005. cap 20, 303-12.

Klock B, Krasse B. A comparison between different methods for prediction of caries activity. Scand J Dent Res 1979; 87: 129-39.

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

Kolenbrander PE. Oral microbial communities: biofilms, interactions and genetic systems. Annu Rev Microbiol 2000; 54: 413-37.

Koo H, Cury JA, Rosalen PL, Ambrosano GMB, Ikegaki M, Park YK. Effect of a mouthrinse containing selected propolis on 3-day dental plaque accumulation and polysaccharide formation. Caries Res 2002a; 36:445-8.

Koo H, Gomes BPF, Rosalen PL, Ambrosano GMB, Park YK, Cury JA . In vitro antimicrobial activity of propolis and *Arnica montana* against oral pathogens. Arch Oral Biol 2000c;45:141-8.

Koo H, Park YK. Investigaçãõ do teor de flavonóides nas própolis comerciais. Rev Bras Apicultura 1996; 6(6): 6-7.

Koo H, Pearson SK, Scott-Anne K, Abranches J, Cury JA, Rosalen PL, Park YK, Marquis RE, Bowen WH. Effects of apigenin and *tt*-farnesol on glucosyltransferase activity, biofilm viability and caries development in rats. *Oral Microbiol Immunol* 2003; 17:337-43.

Koo H, Rosalen PL, Cury JA, Ambrosano GMB, Murata RM, Yatsuda R, *et al.* Effect of a new variety of *Apis mellifera* propolis on Mutans Streptococci. *Curr Microbiol* 2000b;41:192-3.

Koo H, Rosalen PL, Cury JA, Park YK, Bowen WH. Effects of compounds found in propolis on *Streptococcus mutans* growth and on glucosyltransferase activity. *Antimicrob Agents Chemother* 2002b; 46(5): 1302-9.

Koo H, Rosalen PL, Cury JA, Park YK, Ikegaki M, Sattler A. Effect of *Apis mellifera* propolis from two Brazilian regions on caries development in desalivated rats. *Caries Res* 1999; 33:393-400.

Koo H, Schobel B, Scott-Anne K, Watson G, Bowen WH, Cury JA, Rosalen PL, Park YK. Apigenin and *tt*-farnesol with fluoride on *S. mutans* biofilm and dental caries. *J Dent Res* 2005; 84 (11): 1016-1020.

Koo H, Seils J, Abranches J, Burne RA, Bowen WH, Quivey Jr RG. Influence of apigenin on *gtf* gene expression in *Streptococcus mutans* UA159. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50(2): 542-6.

Koo H, Smith AMV, Bowen W, Rosalen PL, Cury JA, Park YK. Effects of *Apis mellifera* propolis on the activities of streptococcal glucosyltransferases in solution and adsorbed onto saliva-coated hydroxyapatite. *Caries Res* 2000a;34:418-26.

Koroluk LD, Hoover JN, Komiyama K. The effect of caries scoring systems on the association between dental caries and *Streptococcus mutans*. *J Dent Child* 1995; 187-91.

Kristoffersson K, Birkhed D. Effects of partial sugar restriction for 6 weeks on number of *Streptococcus mutans* in saliva and interdental plaque in man. *Caries Res* 1987; 21: 79-86.

Lang NP, Hotz PR, Gusberti FA, Joss A. Longitudinal clinical and microbiological study on the relationship between infection with *Streptococcus mutans* and the development of caries in humans. *Oral Microbiol Immunol* 1987;2:39-47.

Larsen MJ, Bruun C. Esmalte / saliva – reações químicas inorgânicas. In: Thylstrup A, Fejerskov O. *Tratado de Cariologia*. Trad. Sérgio Weyne. Rio de Janeiro: Cultura Médica; 1988. cap 10, 169-93.

Lawrence J, Korber D, Hoyle B, Costerton JW, Caldwell D. Optical sectioning of microbial biofilms. *J Bacteriol* 1991; 173: 6558-67.

Lawrence J, Wolfaart G, Korber D. Diffusion of size fractionated dextrans in biofilm matrices by confocal laser microscopy. Can Soc Microbiol Annu Meet, Toronto 1993; Abstract.

Leshner RJ, Bender GR, Marquis RE. Bacteriolytic action of fluoride ions. Antimicrob Agents Chemother 1977; 12 (3): 339-45.

Lima KC, Alves MSCF. Placa Bacteriana: composição, mecanismo de ação e metabolismo. In: Curso de Mestrado em Odontologia Social/UFRN. Odontologia Preventiva e Social: textos selecionados. Natal: Editora UFRN, 1998.

Löe H. A review of the prevention and control of plaque. In: McHugh W D. Dental plaque. Edinburgh: Livingstone; 1969.

Loesche WJ, Eklund S, Earnest R, Burt B. Longitudinal investigation of bacteriology of human fissure decay: epidemiological studies in molars shortly after eruption. Infect Immun 1984; 46(3): 765-72.

Loesche WJ, Rowan J, Straffon LH, Loos PJ. Association of *Streptococcus mutans* with human dental decay. Infect Immun 1975; 11(6): 1252-60.

Loesche WJ, Straffon LH. Longitudinal investigation of the role of *Streptococcus mutans* in human fissure decay. Infect Immun 1979; 26(2): 498-507.

Loesche WJ. Chemoterapy of dental plaque infections. Oral Sci Res 1976; 9: 65-107.

Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. Microb Rev 1986; 50 (4): 353-80.

Luoma H, Fejerskov O, Thylstrup A. O efeito do flúor na placa, na estrutura do dente e na cárie. In: : Thylstrup A, Fejerskov O. Tratado de Cariologia. Trad. Sergio Weyne. Rio de Janeiro: Cultura Médica; 1988. cap 16, 293-332.

Lynch RJM, Mony U, ten Cate JM. The effect of fluoride at plaque fluid concentrations on enamel De-and Remineralization at low pH. Caries Res 2006; 40:522-29.

Magro Filho O, Perri de Carvalho AC. Application of propolis to dental sockets and skin wounds. J Nihon Univ Sch Dent 1990;32:4-13.

Magro Filho O, Perri de Carvalho AC. Topical effects of propolis in the repair of sulcoplasties by the modified Kazanjian technic. J Nihon Sch Dent 1994;36(2):102-11.

Maltz M, Barbachan e Silva B, Carvalho DQ, Volkweis A. Results after two years of non-operative treatment of occlusal surface in children with high caries prevalence. Braz Dent J 2003; 14(1): 48-54.

Maltz M, Emilson CG. Susceptibility of oral bacteria to various fluoride salts. J Dent Res 1982; 61 (6): 786-90.

Maltz M. Cárie dental: fatores relacionados. In: Pinto VG. Saúde Bucal Coletiva. 2 ed. São Paulo: Santos; 2000. cap 11, 319-39.

Marcucci MC. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. Apidologie 1995; 26:83-9.

Margolis HC, Moreno EC. Physicochemical perspectives on the cariostatic mechanisms of systemic and topical fluorides. J Dent Res 1990; 69 (Spec Iss): 606-13.

Marquis RE. Antimicrobial actions of fluoride for oral bacteria. Can J Microbiol 1995; 41: 955-64.

Marquis RE. Diminished acid tolerance of plaque bacteria caused by fluoride. J Dent Res 1990; 69 (Spec Iss): 672-5.

Marsh PD, Bradshaw DJ. Physiological approaches to the control of oral biofilms. Adv Dent Res 1997; 11(1): 176-85.

Marsh PD, Bradshaw DJ. The effect of fluoride on the stability of oral bacterial communities *in vitro*. J Dent Res 1990; 69 (Spec Iss): 668-71.

Marsh PD, Martin MV. Oral Microbiology. Oxford : Wright, 1999.

Marsh PD, Nyvad B. A microbiota oral e biofilmes formados sobre os dentes. In: Fejerskov O, Kidd E. Cárie dentária: a doença e seu tratamento clínico. Trad. Fábio Luis Mialhe. São Paulo:Santos; 2005. cap 3, 29-48.

Marsh PD. Host defenses and microbial homeostasis: role of microbial interactions. J Dent Res 1989; 68: 1567-75.

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

Marsh PD. Microbiological aspects of the chemical control of plaque and gingivitis. J Dent Res 1992; 71(7): 1431-8.

Marsh PD. Sugar, fluoride, pH and microbial homeostasis in dental plaque. Proc Finn Dent Soc 1991; 87: 515-25.

Marsh PD. The role of microbiology in models of dental caries. Adv Dent Res 1995; 9 (3): 244-54.

Marthaler TM. Changes in dental caries 1953-2003. Caries Res 2004; 38: 173-81.

Martinez Silveira G, Godoy AG, Torriente RO, Ortiz MCP, Cuellar MAF .Estudio preliminar sobre los efectos del propolan en el tratamiento de la gingivitis cronica y de las ulceras bucales. Rev Cubana Estomatol 1988; 25:36-44.

Mattos-Graner RO, Zelante F, Line RCSR, Mayer MPA. Association between caries prevalence and clinical, microbiological and dietary variables in 1.0 to 2.5 – year-old brazilian children. Caries Res 1998; 32:319-23.

Medeiros UV, Weyne SC. A doença cárie dentária no Brasil e no mundo. UFES Rev Odontol 2001; 3 (1): 88-95.

Minah GE, Loesche WJ. Sucrose metabolism in resting-cell suspensions of caries-associated and non-associated dental plaque. Infect Immun 1977; 17 (1): 43-54.

Moreira TF. Composição química da própolis: vitaminas e aminoácidos. Rev Bras Farmacogn 1986; 1(1): 12-9.

Narvai PC, Frazão P, Castellanos RA. Declínio na experiência de cárie em dentes permanentes de escolares brasileiros no final do século XX. Odontol e Sociedade 1999; 1(1/2): 25-9.

Narvai PC, Frazão P, Roncalli AG, Antunes JLF. Cárie dentária no Brasil: declínio, polarização, iniquidade e exclusão social. Rev Panam Salud Publica 2006; 19(6):385-93.

Nelson DGA, Jongebloed WL, Arends J. Morphology of enamel surfaces treated with topical fluoride agents: SEM considerations. *J Dent Res* 1983; 62(12):1201-8.

Newbrun E. *Cariologia*. Trad. José Luis Freire de Andrade. São Paulo: Santos;1988. 326p.

Nyvad B, Kilian M. Microbiology of the early colonization of human enamel and root surfaces *in vivo*. *Scand J Dent Res* 1987; 95: 369-80.

Øgaard B, Seppa L, Rolla G. Professional topical fluoride applications- clinical efficacy and mechanism of action. *Adv Dent Res* 1994; 8(2):190-201.

Ota C, Valente PHM, Unterkircher CS, Shimizu MT. Atividade da própolis sobre bactérias isoladas da cavidade bucal. *Lecta* 1998; 16(1): 73-7.

Pamplona B. Própolis: composição e atividades terapêuticas. *Rev Racine* 1997; 37:49-53.

Park YK, Ikegaki M, Contado JL. Comparison of the flavonoid aglycone contents of *Apis mellifera* propolis from various regions of Brazil. *Arq Biol Technol* 1997;40(1):97-106.

Park YK, Koo H, Abreu JAS, Ikegaki M, Cury JA, Rosalen PL. Antimicrobial activity of propolis on oral microorganisms. *Curr Microbiol* 1998a;36:24-8.

Park YK, Ikegaki M, Abreu JAS, Alcici NMF. Estudo da preparação dos extratos de própolis e sua aplicação. *Ciênc Tecnol Aliment* 1998b; 18(3).

Pavanelli DM. Avaliação qualitativa de extratos de própolis do cerrado sul-matogrosense [Monografia]. Campo Grande: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul; 2006.

Rateitschak-Plüss EM, Guggenheim B. Effects of a carbohydrate - free diet and sugar substitutes on dental plaque accumulation. *J Clin Periodontol* 1982; 9: 239-51.

Rölla G. Effects of fluoride on initiation of plaque formation. *Caries Res* 1977; 11 (Suppl 1): 243-61.

Rölla G. Outros agentes químicos e antimicrobianos e a cárie. In: Thylstrup A, Fejerskov O. *Tratado de Cariologia*. Trad. Sergio Weyne. Rio de Janeiro: Cultura Médica; 1988. cap17, 333-41.

Russell RRB. Control of specific plaque bacteria. *Adv Dent Res* 1994; 8(2): 285-90.

SESI. Serviço Social da Indústria. Estudo epidemiológico sobre prevalência da cárie dental em crianças de 3 a 14 anos: Brasil, 1993. Brasília: 1996.

Scheie AA. Mechanisms of dental plaque formation. *Adv Dent Res* 1994; 8(2): 246-53.

Scheie AA. O papel os antimicrobianos. In: Fejerskov O, Kidd E. Cárie dentária: a doença e seu tratamento clínico. Trad Fábio Luis Mialhe. São Paulo:Santos; 2005. cap 12, 179-88.

Silverstone LM. Laboratory studies on the demineralization and remineralization of human enamel in relation to caries mechanism. *Australian Dent J* 1980; 25(3):163-8.

Silverstone LM. Remineralization of human enamel *in vitro*. *Proc Roy Soc Med* 1972; 65: 32-4.

Sönju T. Película- formação, composição e possível função. In: Thylstrup A, Fejerskov O. Tratado de Cariologia. Trad. Sergio Weyne. Rio de Janeiro: Cultura Médica; 1988. cap 4, 33-42

Steinberg D, Kaine G, Gedalia I. Antibacterial effect of propolis and honey on oral bacteria. *Am J Dent* 1996; 9(6):236-9.

Swertz MSO, Freitas e Silva DS, Maldonado DV, Totti da Costa JM, de Medeiros UV. Atividade antimicrobiana da própolis sobre bactérias bucais. *J Bras Endo/Perio* 2002; 3(10): 256-61.

ten Cate JM, Featherstone JDB. Physicochemical aspects of fluoride-enamel interactions. In: Fejerskov O, Ekstrand J, Burt BA. Fluoride in Dentistry. Munksgaard; 1996.

ten Cate JM, Larsen MJ, Pearce EIF, Fejerskov O. Interações químicas entre os dentes e os fluidos orais. In: Fejerskov O, Kidd E. Cárie dentária: a doença e seu tratamento clínico. Trad. Fábio Luis Mialhe. São Paulo: Santos; 2005. cap 4, 49-69.

Thylstrup A, Fejerskov O. Cariologia clínica. São Paulo: Santos; 1995.

Torres CRG, Kubo CH, Anido A, Rodrigues JR. Agentes antimicrobianos e seu potencial uso na Odontologia. Pós Grad Rev Fac Odontol São José dos Campos 2000; 3(2): 43-52.

Uzel A, Sorkun K, Onçag Ö, Çogulu D, Gençay Ö, Salih B. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. Microbiol Res 2005; 160: 189-95.

van Houte J, Green DB. Relationship between the concentration of bacteria in saliva and the colonization of the teeth in humans. Infect Immun 1974; 9(4):624-30.

van Houte J. Bacterial specificity in the etiology of dental caries. Int Dent J 1980; 30(4): 305-26.

van Loosdrecht MCM, Lytlema J, Norde W, Zehnder AJB. Influence of interfaces on microbial activity. *Microbiol Rev* 1990; 54: 75-87.

Watt RG. Introdução. In: Bönecker M, Sheiham A. Promovendo saúde bucal na infância e adolescência: conhecimentos e práticas. São Paulo: Santos; 2004. Introdução, 1-12.

Wei SHY, Koulourides T. Electron microprobe and microhardness studies of enamel remineralization. *J Dent Res* 1972; 51(2): 648-51.

Wei SHY. Electron microprobe analyses of the remineralization of enamel. *J Dent Res* 1970; 49 (3): 621-5.

Welshman J. Dental health as a neglected issue in medical history: the school dental service in England and Wales, 1900-40. *Medical History* 1988; 42:306-27.

Whitford GM, Schuster GS, Pashley DH, Venkateswarlu P. Fluoride uptake by *Streptococcus mutans* 6715. *Infect Immun* 1977; 18(3): 680-7.

Woisky RG, Giesbrecht AM, Salatino A. Atividade antibacteriana de uma formulação preparada a partir de própolis de *Apis mellifera*. *Rev Farm bioquím Univ S Paulo* 1994; 30(1):19-21.

Zárate-Pereira P. Análise da atividade de bochechos contendo fluoreto de sódio 0,05%; fluoreto de sódio 0,2% e própolis 5% acrescida de fluoreto de sódio 0,05%, sobre níveis salivares de estreptococos do grupo mutans em pacientes cárie-ativos [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP;1999.

Zárate-Pereira P. Estudo *in situ* sobre a ação da própolis de *Apis mellifera* no desenvolvimento da cárie dentária e na formação do biofilme dental [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP;2003.

Zero DT, Fu J, Espeland MA, Featherstone JDB. Comparison of fluoride concentrations in unstimulated whole saliva following the use of a fluoride dentifrice and a fluoride rinse. J Dent Res 1988; 67(10): 1257-62.

Zhang YZ. Dental disease of Neolithic age skulls excavated in Shaanxi Province. Chin Med J 1982; 95: 391-6.

Zickert I, Emilson CG, Krasse B. Correlation of level and duration of *Streptococcus mutans* infection with incidence of dental caries. Infect Immun 1983; 39(2): 982-5.

Zickert I, Emilson CG, Krasse B. Effect of caries preventive measures in children highly infected with the bacterium *Streptococcus mutans*. Archs Oral Biol 1982; 27:861-8.

ANEXO A

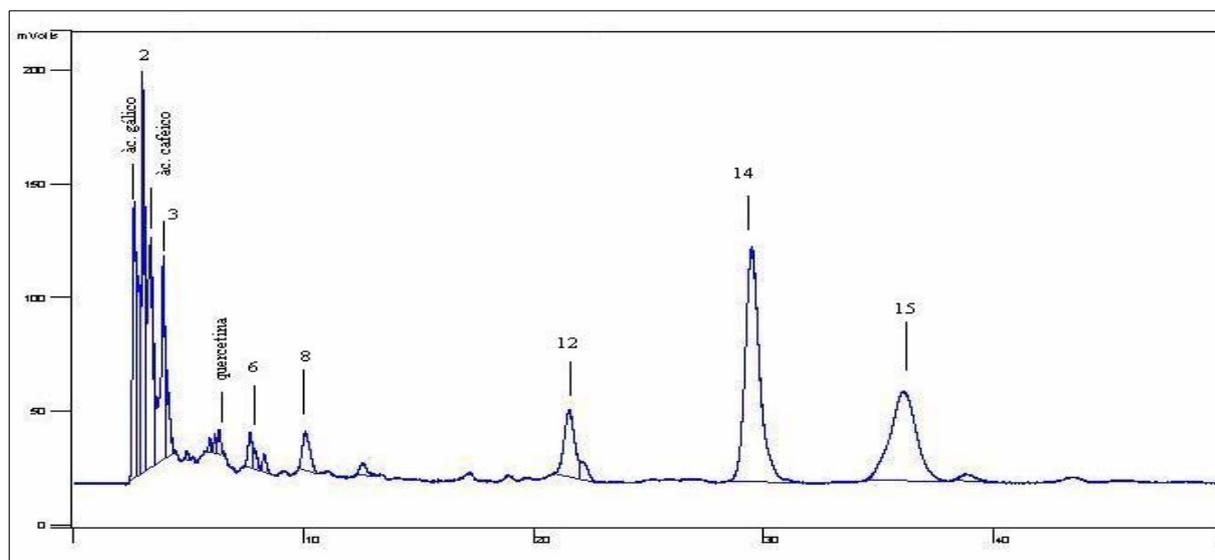


Figura 1 - Cromatograma / CLAE - EEP – Ivinhema/MS
Fonte: Pavanelli, 2006.

ANEXO B



Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Comitê de Ética em Pesquisa / CEP/UFMS



Carta de Aprovação

A minha assinatura neste documento atesta que o protocolo nº 731 do Pesquisador Alessandro Diogo De Carli intitulado "Avaliação da Ação antibacteriana de um gel de própolis a 5% oriunda do Estado de Mato Grosso do Sul associada ao Fluoreto de Sódio a 0,05% no Controle do Biofilme Dental em pacientes de alto risco à Cárie", e o seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, foram revisados por este comitê e aprovados em reunião Ordinária no dia 29 de maio de 2006, encontrando-se de acordo com as resoluções normativas do Ministério da Saúde.

Prof. Odair Pimentel Martins

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMS

Campo Grande, 30 de maio de 2006.

Comitê de Ética da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
<http://www.propp.ufms.br/bioetica/cep/>
bioetica@propp.ufms.br
fone 0XX67 345-7187

ANEXO C

Escores	Critérios
0	Nenhum resíduo ou manchas presentes.
1	Resíduos cobrindo não mais que 1/3 da superfície do dente ou presença de pigmentação.
2	Resíduos cobrindo mais do que 1/3, mas não mais que 2/3 da superfície do dente.
3	Resíduos cobrindo mais do que 2/3 da superfície do dente.

Figura 2 – Escores e critérios utilizados para a obtenção do IR.

Fonte: adaptado de Greene e Vermillion, 1960.

Escores	Critérios
0	Nenhum cálculo presente.
1	Cálculo supragengival cobrindo não mais que 1/3 da superfície do dente.
2	Cálculo supragengival cobrindo mais de 1/3, mas não mais que 2/3 da superfície dentária ou presença de pontos de partículas de cálculo subgengival no terço cervical do dente, ou ambos.
3	Cálculo supragengival cobrindo mais do que 2/3 da superfície dentária ou presença de faixa estreita e contínua de cálculo subgengival na porção cervical dos dentes, ou ambos.

Figura 3 – Escores e critérios utilizados para a obtenção do IC.

Fonte: adaptado de Greene e Vermillion, 1960.

Parâmetro Clínico	Escores
Bom	0,0 – 1,2
Médio	1,3 – 3,0
Fraco	3,1 – 6,0

Figura 4 – Interpretação clínica do IHO-S.

Fonte: adaptado de Greene e Vermillion, 1960.

APÊNDICE

Figura 1

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MATO GROSSO DO SUL
MESTRADO EM SAÚDE E DESENVOLVIMENTO DA REGIÃO
CENTRO-OESTE

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

1. TÍTULO DA PESQUISA:

- **CAPACIDADE ANTIBACTERIANA DA PRÓPOLIS DE *Apis mellifera* ASSOCIADA AO FLUORETO DE SÓDIO NO CONTROLE DO BIOFILME DENTAL**

2. RESPONSÁVEL:

- O presente trabalho de pesquisa constitui a dissertação de mestrado do aluno do curso de pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento da Região Centro-Oeste/UFMS, Alessandro Diogo De Carli, Cirurgião – Dentista responsável por todas as fases do estudo.

3. OBJETIVOS:

- Verificar a ação antibacteriana de um gel de própolis 5% associada ao fluoreto de sódio 0,05% no controle do biofilme dental e sua efetividade como meio de prevenção/controle da cárie dentária em pacientes de alto risco.

4. PROCEDIMENTOS A SEREM REALIZADOS:

- O voluntário será submetido a uma anamnese e um exame clínico.

- O estudo compreende duas fases: experimental e clínica. A fase experimental será realizada nos laboratórios de química e microbiologia da UFMS. Na fase clínica, que terá duração de 30 dias, os voluntários mastigarão um chiclete de parafina por um minuto, após será coletada amostra da saliva pela técnica da espátula, para posterior contagem das Unidades Formadoras de Colônia de *Streptococcus mutans* (UFC-SM); os voluntários passarão pelo controle de placa com o gel de própolis 5%+fluoreto de sódio 0,05% (uma aplicação semanal, durante 4 semanas), quando será realizado novo exame microbiológico para recontagem das UFC-SM.

5. RECOMENDAÇÕES:

- Nenhum tipo de colutório ou medicamento antimicrobiano poderá ser utilizado durante o experimento.

6. RISCOS:

- Nenhum efeito colateral indesejável é relatado pela literatura, por ocasião do uso na forma e quantidade recomendada. Caso o voluntário perceba ou suspeite de algum sinal ou sintoma, deverá comunicar o responsável pela pesquisa imediatamente.

7. PRINCÍPIO DA AUTONOMIA:

- Fica o voluntário livre para desistir de participar do trabalho de pesquisa, em qualquer fase de seu desenvolvimento;

- Compromete-se o responsável pela pesquisa de que a participação do voluntário seja inteiramente espontânea, livre de qualquer tipo de coação, comércio ou instrumentos semelhantes.

8. BENEFÍCIOS:

- Os voluntários terão seu risco de cárie diagnosticado e segundo o qual receberão orientações para o seu controle (informações sobre dieta e higienização) e preservação.

AUTORIZAÇÃO

Eu, _____,
documento RG nº _____, responsável
pelo menor _____, residente à
rua _____, bairro _____
_____, no município de _____ Estado _____,
DECLARO estar ciente das condições do trabalho de pesquisa,
**“Capacidade Antibacteriana da Própolis de *Apis mellifera* associada ao
Fluoreto de Sódio no controle do Biofilme Dental”**, de responsabilidade
do Cirurgião-dentista Alessandro Diogo De Carli, no qual permito a
participação espontânea do menor supracitado, na condição de
voluntário, assumindo as responsabilidades previstas e
comprometendo a seguir todas as recomendações.

_____, _____ de _____ de 2007.

Assinatura do Responsável

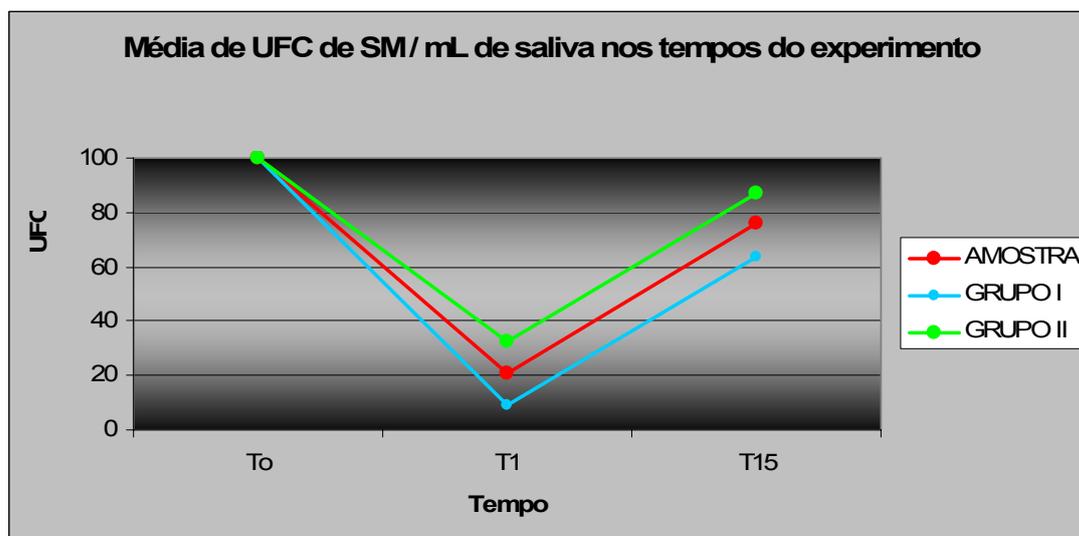


Figura 2 – Médias de UFC de SM / mL de saliva nos Grupos I e II antes e após as aplicações dos Géis A e B

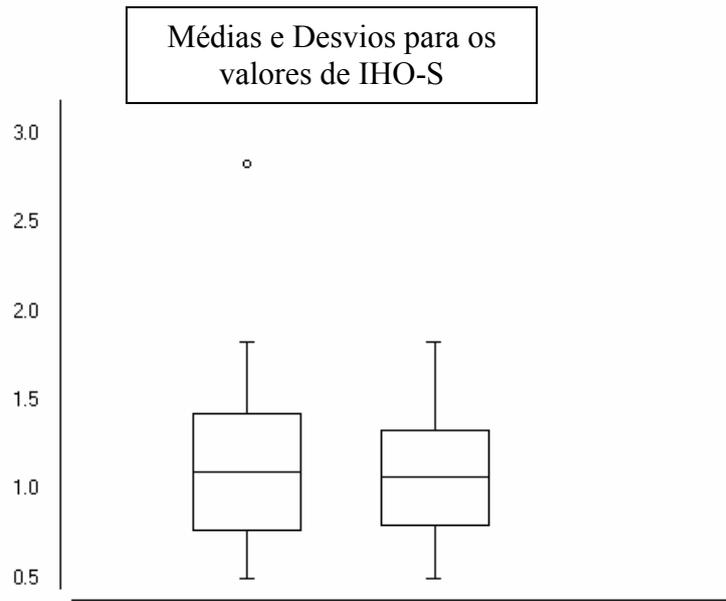


Figura 3 – Boxplot das médias e desvios nos valores do IHO-S entre os Grupos I (esquerda) e II (direita).

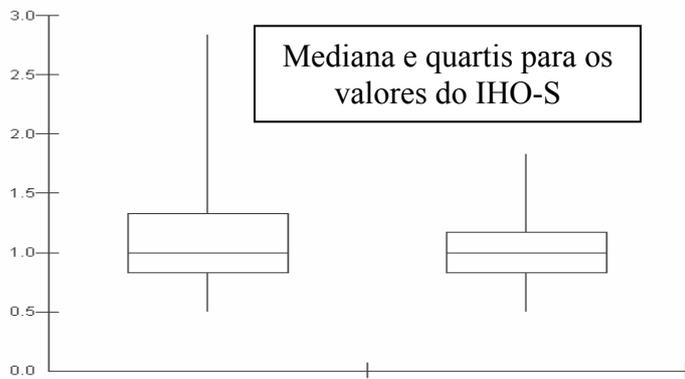


Figura 4 – Boxplot dos valores de mediana e quartis para o IHO-S, entre os Grupos I (esquerda) e II (direita).

ABSTRACT

ANTIBACTERIAL ABILITY OF PROPOLIS FROM *Apis mellifera* ASSOCIATED TO SODIUM FLUORIDE IN THE CONTROL ON THE DENTAL BIOFILM

Antibacterial properties from propolis has become a subject of increasing interest in Dentistry to use it as a chemical control for the dental biofilm. The aim of this study was to evaluate the action of a 5% propolis gel associated to 0,05% sodium fluoride over the assesment of salivary levels of *Streptococcus mutans*, inhibition of white spots, and dental biofilm increasing, at high caries risk patients. This study was previously submitted and aproved by Survey Ethical Comitte at UFMS. Voluntaries' permission allowed by 97 children whose rates were over 10^6 / mL of saliva assesment of *Streptococcus mutans* colony – forming units were used in this research. The sample was randomly divided in two groups: Group 1 ((n= 49, Gel A) and Group 2 (n=48, Gel B), trough a randomized double-blind trial. Four topics applications were done with the experimental gel once a week, during a month. The salivary levels of *Streptococcus mutans* were analised by the spatula method as the white spots by clinical observation and biofilm accumulation by the IHO-S index. Data revealed a significative reduction of *Streptococcus mutans* in salivary levels with the best performance of the Gel A (Propolis 5% + NaF 0,05%) - ($p < 0,0001$) when compared to Gel B (Propolis 5%). The same results were observed in inhibition of white spots. Biofilm accumulation was significantly reduced ($p < 0,0001$) after the gel aplication in both groups, but they didn't show statistical difference ($p > 0,05$). It was concluded that 5% propolis added to 0,05% sodium fluoride acted over the salivary levels of *Streptococcus mutans* and showed the ability to balance DES-RE process, inactivating white spots. Regarding dental biofilm accumulation, the performance of both gel were the same.

Key – words: Fluoride. Propolis. *Streptococcus mutans*