

Série Ensino, Aprendizagem e Tecnologias

Tópicos em Bioquímica e Microbiologia Bucais

Sandra Liana Henz
Lina Naomi Hashizume
Rodrigo Alex Arthur

2ª edição





UNIVERSIDADE
FEDERAL DO RIO
GRANDE DO SUL

Reitor

Carlos André Bulhões

Vice-Reitora e Pró-Reitora
de Coordenação Acadêmica

Patricia Helena Lucas Pranke

EDITORA DA UFRGS

Diretora

Luciane Gonçalves Delani

Conselho Editorial

Carlos Eduardo Espindola Baraldi

Clarice Lehnen Wolff

Janette Palma Fett

João Carlos Batista Santana

Luís Frederico Pinheiro Dick

Maria Flávia Marques Ribeiro

Naira Maria Balzaretto

Otávio Bianchi

Sergio Luiz Vieira

Virgínia Pradelina da Silveira Fonseca

Luciane Gonçalves Delani, presidente

Série Ensino, Aprendizagem e Tecnologias

Tópicos em Bioquímica e Microbiologia Bucais

Sandra Liana Henz
Lina Naomi Hashizume
Rodrigo Alex Arthur

2ª edição



© dos autores

1.ª edição: 1995

Direitos reservados desta edição:

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Coordenação da Série:

Cíntia Kulpa, Tanara Forte Furtado e Marcello Ferreira

Coordenação da Editoração: Cíntia Kulpa e Ely Petry

Revisão: Equipe de Revisão da SEAD

Capa: Bruno Assis, Jéssica dos Santos e Tábata Costa

Editoração eletrônica: Jéssica dos Santos e Tábata Costa

A grafia desta obra foi atualizada conforme o Acordo Ortográfico da Língua Portuguesa, de 1990, que entrou em vigor no Brasil em 1º de janeiro de 2009.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.



H528t Henz, Sandra Liana

Tópicos em bioquímica e microbiologia bucais [recurso eletrônico] / Sandra Liana Henz, Lina Naomi Hashizume [e] Rodrigo Alex Arthur ; coordenado pela SEAD/UFRGS. – 2. ed. – Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2021.

321 p. : pdf

(Série Ensino, Aprendizagem e Tecnologias)

1. Odontologia. 2. Bioquímica bucal. 3. Microbiologia bucal. 4. Ecologia bucal. 5. Biofilme dental. 6. Cárie. 7. Erosão dentária. 8. Saliva. 9. Flúor. 10. Infecções odontogênicas. I. Hashizume, Lina Naomi. II. Arthur, Rodrigo Alex. III. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Secretaria de Educação a Distância. IV. Título. V. Série

CDU 579.61:616.314-002

CIP-Brasil. Dados Internacionais de Catalogação na Publicação.

(Jaqueline Trombin – Bibliotecária responsável CRB10/979)

ISBN 978-65-5725-038-9

Sobre os autores

Sandra Liana Henz - Cirurgiã-dentista. Professora Associada do Departamento de Odontologia Preventiva e Social, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Pós-Doutorado em Periodontia e Microbiologia Oral na Universidade da Carolina do Norte em Chapel Hill, Doutora em Bioquímica pela UFRGS, Mestre em Microbiologia pela FFFCMPA e Especialista em Periodontia pela UFRGS.

Lina Naomi Hashizume - Cirurgiã-dentista. Professora Titular do Departamento de Odontologia Preventiva e Social, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Doutora em Odontologia pela Tokyo Medical and Dental University, Japão.

Rodrigo Alex Arthur - Cirurgião-dentista. Professor Associado do Departamento de Odontologia Preventiva e Social, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Pós-doutor em Microbiologia Oral e Cariologia pela Indiana University School of Dentistry, Estados Unidos. Mestre e Doutor em Odontologia – Área de Concentração Cariologia pela Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas.

Prefácio

Prezados alunos,

É com satisfação que apresentamos a segunda edição do livro **Tópicos em Bioquímica e Microbiologia Bucais**, agora na forma de e-book para facilitar o acesso, cujo objetivo consiste em fornecer informações básicas sobre bioquímica e microbiologia para um correto entendimento dos processos de saúde-doença que acontecem na cavidade bucal. A decisão de realizar essa obra baseou-se na percepção da necessidade de um material de apoio didático que auxilie os alunos do curso de Odontologia na aquisição dos conhecimentos básicos que são fundamentais para o futuro exercício da profissão. Dedicamos esse livro aos nossos alunos e desejamos que o mesmo possa auxiliar, facilitar e incentivar a busca pelo conhecimento na profissão que escolheram.

Sandra Liana Henz

Sumário

Sobre os autores 5

Prefácio 7

1. Técnicas em Microbiologia Bucal 13

*Laís Daniela Ev, Luisa Weber Mercado
e Sandra Liana Henz*

2. Ecologia Bucal 53

*Sandra Liana Henz, Lina Naomi Hashizume
e Rodrigo Alex Arthur*

3. Saliva 75

*Sandra Liana Henz, Rodrigo Alex Arthur
e Lina Naomi Hashizume*

4. Película Adquirida 97

*Sandra Liana Henz, Rodrigo Alex Arthur
e Lina Naomi Hashizume*

12. Mecanismo de Ação do Flúor **213**

*Rodrigo Alex Arthur, Lina Naomi Hashizume
e Sandra Liana Henz*

**13. Outros Açúcares
e Substitutos da Sacarose** **225**

*Lina Naomi Hashizume, Sandra Liana Henz
e Rodrigo Alex Arthur*

14. Infecções Odontogênicas **237**

Deise Ponzoni e Edela Puricelli

**15. Infecções Endodônticas:
características microbiológicas
e suas repercussões clínicas** **249**

Pauline Mastella Lang e Francisco Montagner

16. Controle Químico do Biofilme Dental **275**

*Sandra Liana Henz, Luisa Weber Mercado,
Eduardo Toschi e Liliane Cardoso Hilgert*

1

Técnicas em Microbiologia Bucal

Laís Daniela Ev

Luisa Weber Mercado

Sandra Liana Henz

IMPORTÂNCIA DO ESTUDO DA MICROBIOLOGIA - breve histórico dos microbiologistas e contribuições

A MICROBIOLOGIA é um ramo da ciência que estuda os organismos microscópicos unicelulares e os vírus (BAKER, J. L. *et al.*, 2017). Seres microscópicos ocupam os mais variados ambientes, seja o solo, o oceano, as superfícies inanimadas e, também, as superfícies internas e externas do corpo humano, como a cavidade bucal, os intestinos e transitoriamente os fluidos corporais (MADIGAN *et al.*, 2010).

Grandes nomes na microbiologia utilizavam técnicas rudimentares para visualização e identificação de micro-organismos. Essas técnicas geraram conhecimento para que se desenvolvessem métodos consagrados que temos hoje (BONNET *et al.*, 2020). Considerando a área da **microbiologia bucal**, é possível analisar que o avanço do conhecimento na área da microbiologia como ciência possibilitou a evolução também dos conceitos na odontologia (MALTZ *et al.*, 2016).

Antonie Van Leeuwenhoek (1632-1723), ao utilizar uma combinação de lentes, observou pela primeira vez bactérias nas mais diversas amostras, dentre elas a saliva. Ainda, demonstrou a presença de uma microbiota bucal na superfície dos dentes, conforme citado em sua carta à coroa britânica. Mais tarde, Robert Koch (1843-1910) e seus colaboradores foram responsáveis por demonstrar uma relação causal entre um micro-organismo e uma doença, o que gerou os postulados de Koch. No mesmo período, foi desenvolvido o método de coloração de Gram por Hans Christian Gram (1853-1938), que permitiu a distinção entre dois tipos de bactérias (Gram-positivas e negativas), além da visualização de características morfológicas desses micro-organismos

(MADIGAN *et al.*, 2010). Miller (1853–1907), ao estudar as bactérias, estabeleceu a teoria químico-parasitária para a doença cárie, demonstrando a importância da presença de biofilme para causar a doença (FEJERSKOV, *et al.* 2009).

Existe uma ampla variedade de métodos disponíveis para estudar os micro-organismos bucais, podendo estes terem uma abordagem descritiva ou uma abordagem funcional da comunidade microbiana (NYVAD *et al.*, 2013). Em vista disso, o objetivo do presente capítulo é **elucidar os diferentes métodos de estudo da microbiologia a fim de proporcionar embasamento teórico a respeito das técnicas realizadas nas aulas práticas da disciplina de Bioquímica e Microbiologia bucal e explanar sobre novos métodos de estudo dos micro-organismos independentes de cultivo.**

TÉCNICAS CONVENCIONAIS PARA ESTUDOS DE MICRO-ORGANISMOS

As técnicas convencionais para estudo de micro-organismos podem ser entendidas por metodologias que abrangem suas características fenotípicas, como a morfologia colonial e a morfologia celular, o metabolismo e a fisiologia, através de provas bioquímicas e imunológicas, entre outras. Para o estudo detalhado das características fenotípicas de um micro-organismo, é importante seu cultivo em laboratório através de meios de cultura adequados. Meios de cultura são soluções que têm em sua composição substâncias que fornecem nutrientes para viabilizar o crescimento de um micro-organismo (MADIGAN *et al.*, 2010).

O cultivo de micro-organismos em meio de cultura pressupõe a viabilidade dos mesmos. Durante o crescimento, são necessárias condições adequadas para que os micro-organismos se proliferem e formem colônias (BONNET *et al.*, 2020). O crescimento microbiano é definido como o aumento no número de células, resultando na formação de uma população de células que compõem uma colônia. Os micro-organismos que crescem em meios de cultura em laboratório são chamados de cultiváveis (TORTORA; CASE; FUNKE, 2017).

Tipos de meio de cultura

Os meios de cultura podem ser classificados como sólidos, líquidos ou semissólidos. Os meios sólidos têm essa consistência devido a presença do ágar na sua composição. São utilizados principalmente para cultivo e visualização das colônias características de cada micro-organismo e para quantificação do número de colônias em amostras biológicas.

Os meios podem ser divididos em dois tipos:

Meios seletivos – são soluções que contêm em sua composição substâncias que favorecem o crescimento de determinados micro-organismos e/ou substâncias que inibem o crescimento de micro-organismos indesejados. As substâncias adicionadas que tornam o meio seletivo podem ser, por exemplo, um antimicrobiano que inibe o crescimento de outras bactérias ou fungos; fatores de crescimento como nutrientes essenciais que promovem o crescimento de micro-organismos

específicos, entre outros (BONNET *et al.*, 2020). Os meios de cultura seletivos utilizados comumente nas aulas práticas são os seguintes: *Mitis salivarius bacitracina* (MSB), *Ágar Rogosa* (ROG) e *Ágar Sabouraud* (SAB).

O **MSB** é um meio de cultura derivado do *Ágar Mitis Salivarius* (MS) utilizado para crescimento de estreptococos. O MS contém em sua composição o Telurito de potássio, um antimicrobiano de amplo espectro que inibe o crescimento de outras bactérias. Quando é necessário selecionar especificamente os estreptococos do grupo mutans (EGM), utiliza-se então o meio MSB. A sua seletividade é resultado da adição de uma quantidade elevada de sacarose (20g/L), o que favorece o crescimento somente de cepas que conseguem metabolizar o açúcar. Além disso, é adicionada a bacitracina, um antimicrobiano ao qual os EGM são resistentes, mas que inibe o crescimento de outros *Streptococcus spp* (GOLD; JORDAN; VAN HOUTE, 1973).

O **ROGOSA (ROG)** é um meio seletivo para micro-organismos acidúricos, pois na sua preparação é adicionado o ácido acético, tornando o pH do meio ácido (pH 5.5). É utilizado principalmente para isolamento de bactérias do gênero *Lactobacillus* (ROGOSA; MITCHELL; WISEMAN, 1951).

O **Sabouraud Dextrose Cloranfenicol (SAB)** é um meio cuja composição o torna seletivo para fungos, além de inibir o crescimento de bactérias. A presença de cloranfenicol atua como inibidor do crescimento de bactérias Gram-positivas e negativas e o pH ácido favorece o crescimento dos fungos (TRABULSI; ALTERTHUM, 2015). É utilizado principalmente para cultivo de leveduras do gênero *Candida* (EGAN *et al.*, 2002).

Meios não seletivos – são aqueles que favorecem o crescimento da maioria dos micro-organismos e, por isso, são indicados para as mais variadas técnicas de cultivo (BROOKS *et al.*, 2012). No estudo de micro-organismos bucais, os meios comumente usados são Brain Heart Infusion (BHI), Ágar Triptona de Soja (TSA), entre outros (BJØRNDAL; LARSEN, 2000; EIDT *et al.*, 2019; GRECCA *et al.*, 2009; SANCHEZ *et al.*, 2018). Na composição desses meios é importante a presença de nutrientes essenciais para o metabolismo microbiano, como fontes de nitrogênio, carbono e minerais que atuam como cofatores de enzimas, e um pH neutro. Como exemplo, a composição do meio de cultura BHI: *Sólido proveniente da infusão Cérebro-coração, hidrolisado péptico de tecido animal; Hidrolisado pancreático de caseína; Cloreto de sódio; Glucose; Fosfato dissódico de hidrogênio; Ágar.*

Técnicas de identificação fenotípica

A avaliação fenotípica de micro-organismos possibilita fazer uma inferência sobre qual espécie se trata. No entanto, são necessários métodos moleculares para confirmação da identificação fenotípica realizada. Algumas características comuns utilizadas para identificação são a morfologia colonial, morfologia celular, padrão de crescimento, capacidade de produzir hemólise, características bioquímicas, entre outras (TORTORA; CASE; FUNKE, 2017).

Morfologia colonial

Cada micro-organismo ao crescer em um meio de cultura apresenta uma morfologia colonial típica. Conhecer as suas características é uma importante ferramenta de identificação, que permite muitas vezes um diagnóstico presuntivo de qual espécie está presente em determinada amostra (BROOKS *et al.*, 2012). No entanto, para caracterizar a morfologia colonial de um micro-organismo é muito importante obter uma cultura pura, ou seja, que tenha somente o crescimento daquela espécie na placa e as condições de cultivo bem definidas. Para caracterizar a colônia, utiliza-se a lupa ou o microscópio estereoscópico (MADIGAN *et al.*, 2010). Os micro-organismos de interesse cultivados nos exames salivares das aulas práticas são *Streptococcus* do Grupo Mutans (EGM) no meio MSB, *Lactobacillus* spp. no Rogosa e *Candida* spp. no Sabouraud.

As colônias de EGM em MSB são caracterizadas por serem consistentes, elevadas, em formato de amora ou vulcão, de cor escura e aderentes ao ágar. A característica mais marcante é que a colônia não se desmancha ao ser tocada. Para verificação desta característica, é possível, com auxílio de uma sonda exploradora, movimentar a colônia inteira pelo ágar (Fig. 1A).

Nas placas de ROG são identificadas colônias do gênero *Lactobacillus*. As características principais são colônias elevadas, lisas, cremosas, cor branca a bege (Fig. 1B).

Nas placas de SAB são identificadas colônias do gênero *Candida*. As características principais são colônias elevadas, opacas, cremosas, cor branca a bege e borda regular (Fig. 1C).

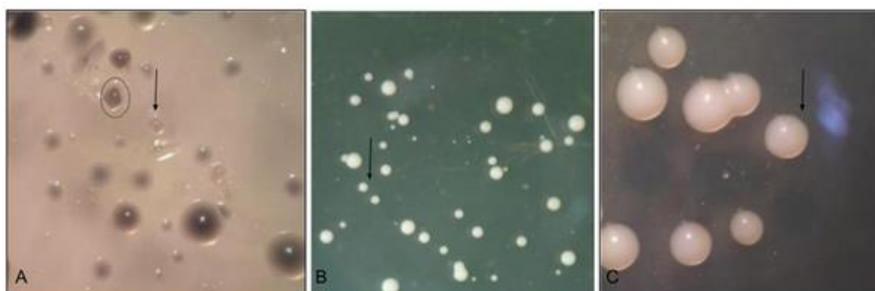


FIGURA 1. Fotos de colônias de EGM crescidas em placas de MSB (A); *Lactobacillus* em ROG e *Candida* spp em SAB (C).-

Morfologia celular e coloração de Gram

A coloração de Gram é uma das importantes ferramentas de identificação complementar dos micro-organismos. A técnica é baseada na diferença existente nos envoltórios das células bacterianas que se comportam de forma distinta na coloração, permitindo que, ao final, as células apresentem dois tipos de colorações diferentes, conforme a composição da sua parede celular. As células Gram-positivas (G+) são caracterizadas por possuírem uma parede celular espessa de peptidoglicano. As células Gram-negativas (G-) possuem uma parede celular delgada e uma membrana externa composta de lipopolissacarídeos (BROOKS *et al.*, 2012).

tococos (*S. oralis* e *S. salivarius*) e *Actinomyces naeslundii*. À medida que o acúmulo de biofilme vai aumentando, ocorre a sucessão microbiana e começam a aparecer cocos e bacilos Gram-negativos como *Fusobacterium nucleatum*, *Campylobacter rectus*, *Porphyromonas gingivalis* e também espiroquetas como *Treponema denticola* (KATANCIK *et al.*, 2016).

Para realização do protocolo do Gram é necessário preparar um esfregaço do material de interesse em uma lâmina de microscópio. A técnica é realizada em 4 etapas conforme desenho esquemático da fig. 3:

1 – Aplicação do corante cristal violeta na lâmina. Como ambos tipos de células (Gram + e Gram -) são permeáveis ao corante, todas as células ficam roxas, independentemente do tipo de parede celular;

2 – Adição da solução de lugol. A solução entra nas células e atua como um fixador do primeiro corante aplicado, formando um complexo iodo-cristal;

3 – Aplicação de solução contendo álcool/acetona. A solução irá dissolver a membrana externa das células G- e, por isso, perderão o corante e ficarão transparentes. As células G+ manterão o corante e permanecerão roxas;

4 – Aplicação de contra corante como a safranina ou a fucsina. A solução irá corar as células G- que perderam o corante na etapa anterior, tornando estas células rosadas (TORTORA; CASE; FUNKE, 2017).

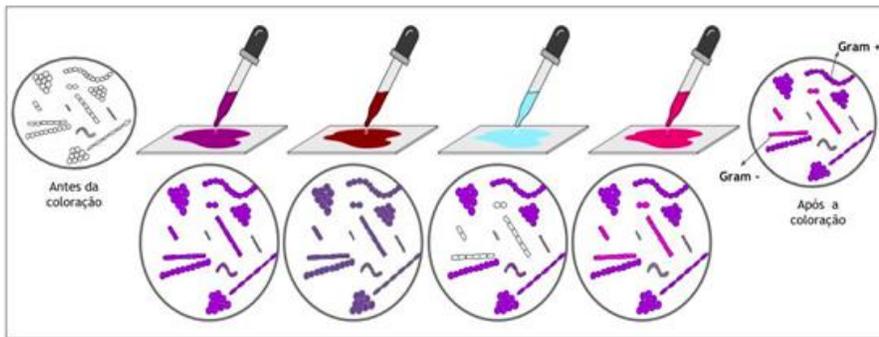


Figura 3. Desenho esquemático das etapas de Coloração de Gram.

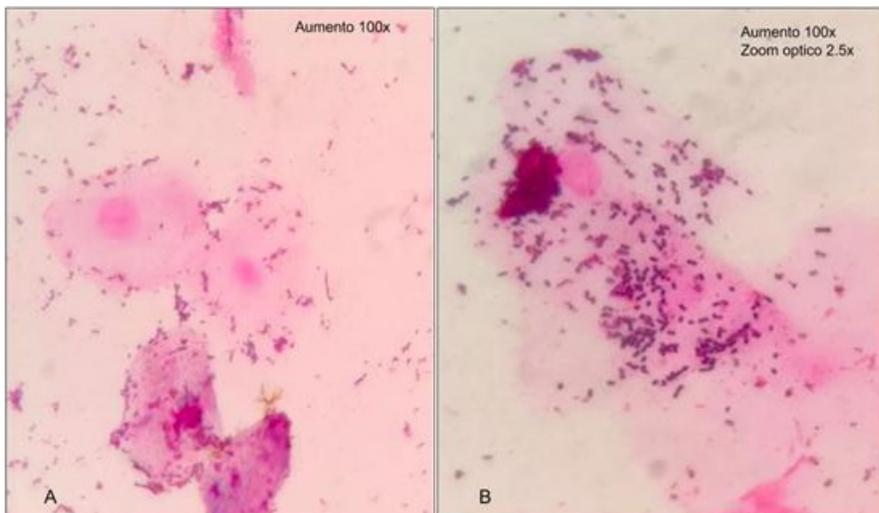


Figura 4. Fotos de uma lâmina com amostra de biofilme dentário após coloração de Gram.

Testes bioquímicos para auxílio na identificação

A identificação bioquímica se baseia na atividade enzimática dos micro-organismos durante o seu crescimento (TORTORA; CASE; FUNKE, 2017). Os testes realizados para identificação podem ser feitos por meio de kits comerciais que permitem resultados rápidos e acurados, mas

têm um custo elevado. Também podem ser feitos por provas bioquímicas convencionais, que são mais baratas, porém mais laboriosas e demoradas (JARDIM JÚNIOR *et al.*, 2011).

É possível fazer um estudo do perfil bioquímico de um micro-organismo de interesse a fim de caracterizá-lo e identificá-lo a nível de espécie ou utilizar testes bioquímicos pontuais que permitam a confirmação da sua identificação fenotípica considerando as características morfológicas já determinadas. Para fins deste capítulo, serão abordados testes bioquímicos pontuais que são utilizados para confirmar a identificação de bactérias orais cultivadas no laboratório.

O **Teste da catalase** se baseia na ação da enzima catalase que atua na reação de quebra da molécula de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), gerando O_2 e H_2O . Para execução da técnica, é possível coletar colônias do micro-organismo de interesse de uma placa de cultura nova e fazer um esfregaço em uma lâmina de microscópio. Ao esfregaço, deve ser adicionada uma gota de solução de peróxido de hidrogênio a 3%.

Se a bactéria possuir a enzima catalase, ocorrerá a reação e serão observadas bolhas de ar na gota aplicada ao esfregaço. Se não apresentar bolhas, será considerada negativa.

Em uma situação em que há dúvida ao observar as colônias de algum micro-organismo quanto a sua identificação, pode-se lançar mão do teste da catalase que permite diferenciar cocos Gram-positivos como *Staphylococcus* spp de *Streptococcus* spp (ANVISA, 2013).

O **Teste de fermentação de carboidratos** é amplamente utilizado para diferenciação e identificação de espécies de micro-organismos. A técnica consiste na verificação da capacidade do micro-organismo de

fermentar um ou mais carboidratos, corroborando para sua caracterização bioquímica de forma a auxiliar na sua identificação. Para realização do teste, o micro-organismo de interesse pode ser cultivado em caldo BHI suplementado com um dos açúcares (ex. melibiose, arabinose, sorbitol, rafinose, trealose, manitol, lactose, entre outros) e um indicador de pH (púrpura de bromocresol). O princípio do teste se baseia na produção de ácido a partir da fermentação do carboidrato resultando na alteração do pH e da cor do meio de cultura, permitindo a visualização após o período de incubação. O resultado é considerado positivo para fermentação quando o meio de cultura muda de púrpura para amarelo (ANVISA, 2013).

A vantagem de utilizar provas bioquímicas está na possibilidade de diferenciar estreptococos orais cultivados em laboratório após sua caracterização morfológica. Por exemplo, ao realizar cultivo de amostras de saliva para quantificação de *S. mutans* é importante diferenciá-lo das demais espécies do grupo EGM que possam crescer no MSB. As colônias de *S. mutans* e *S. sobrinus* são muito semelhantes morfológicamente no MSB. Portanto, é importante lançar mão de um teste que permita diferenciar as espécies para além da morfologia colonial, de forma a permitir uma quantificação mais acurada do micro-organismo de interesse (BEIGHTON *et al.*, 1991).

Quantificação de micro-organismos salivares

A quantificação de micro-organismos salivares pode ser feita para verificação dos níveis de *S. mutans* e *Lactobacillus* spp. em pacientes com atividades de cárie, por exemplo. A análise pode ser feita pela técnica da microgota a partir da coleta da saliva estimulada (WESTERGREN; KRASSE, 1978).

A metodologia consiste em adicionar, com auxílio de uma pipeta, um volume conhecido de saliva a um tubo contendo uma solução fisiológica (por exemplo, 0,5 mL de saliva em 4,5 mL de solução). Desta forma, a saliva será diluída 10 vezes. Após a primeira diluição, o processo é repetido, coletando 0,5 mL do tubo 1 e adicionando ao tubo 2 (que contém 4,5 mL de solução). A diluição é realizada até chegar ao tubo 5, que corresponde a uma diluição final da saliva de 100.000 vezes. Quanto maior é o número de micro-organismos esperado na amostra, maior é o número de diluições que devem ser realizadas.

Após realização da diluição seriada decimal, é feito o inóculo das diferentes diluições em meio de cultivo através da técnica da microgota que consiste em adicionar 25 µL de cada diluição ou da saliva pura ao respectivo local na placa de cultivo conforme mostrado no esquema da Fig 5.

Os meios utilizados para quantificação dos micro-organismos salivares são o BHI, MSB, ROG e SAB. Para o BHI são utilizadas as diluições 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} e para os meios seletivos (MSB, SAB, ROG) a saliva pura (sem diluição) e as diluições 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} . Após inóculo das microgotas, as placas são incubadas em temperatura de 37 °C na estufa

por 24 a 72h. As placas de BHI, MSB e ROG são incubadas em latas contendo velas para propiciar uma atmosfera de **microaerofilia** e as placas de SAB são incubadas em condições de aerobiose.

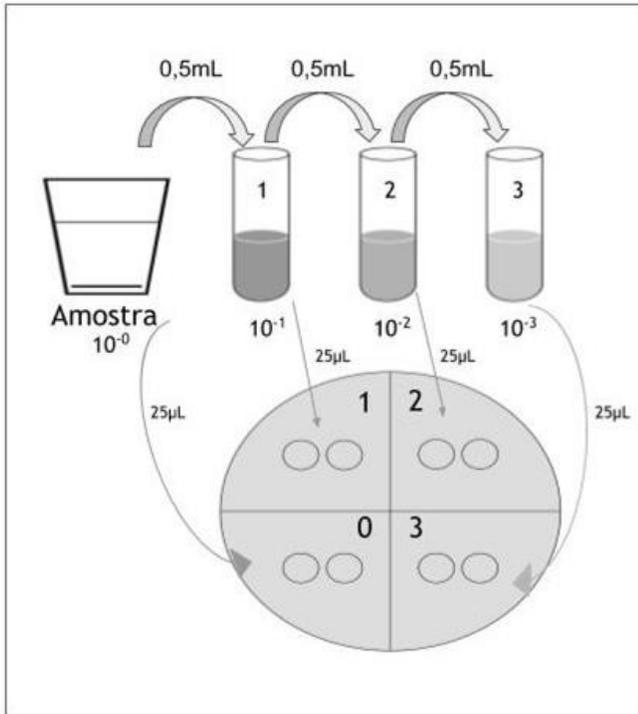


Figura 5. Desenho esquemático da técnica de diluição e cultivo de microgota em placa de meio seletivo.

Após o período de incubação de cada micro-organismo, as placas são retiradas da estufa e as colônias são contadas com auxílio de um microscópio estereoscópico. Cada micro-organismo cresce apresentando colônias que são típicas conforme as condições de cultivo e meios de cultura utilizados. É importante conhecer a morfologia colonial do micro-organismo do qual se deseja realizar a quantificação para realizar da forma mais acurada possível.

Após a identificação morfológica do micro-organismo, deve ser escolhida a diluição adequada para contagem que apresenta um número de colônias de 7 a 75 (NAGHILI *et al.*, 2013), conforme exemplo na fig. 6. O cálculo de Unidades Formadoras de Colônias por mL (UFC/mL) é realizado com a seguinte fórmula:

$$\text{UFC/mL} = \text{média do número de colônias das gotas} \times \text{diluição} \times 40$$

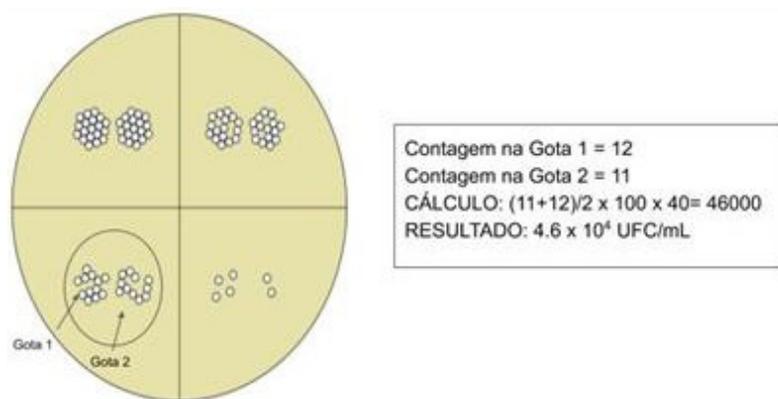


Figura 6: Desenho de uma placa com colônias de *Lactobacillus* spp.

Outra possibilidade de utilizar a técnica de diluição seriada para quantificação de micro-organismos é para avaliar o efeito de substâncias antimicrobianas no número de micro-organismos bucais. A saliva é coletada antes e após a realização de bochechos com colutórios utilizados conforme orientações dos fabricantes e é realizada diluição seriada e cultivo da saliva. Após o cálculo de UFC/mL da saliva antes da realização do bochecho e após, é possível verificar se teve algum efeito sobre a microbiota de interesse (HEGDE; KAMATH, 2017; LORENZ *et al.*, 2018; SEKINO *et al.*, 2003).

Teste de sensibilidade a compostos antimicrobianos

A verificação da sensibilidade a antimicrobianos é também uma forma de identificação dos micro-organismos (ANVISA, 2013) e pode ser feita por diversos protocolos como, por exemplo, a microdiluição em caldo (MC), o E-test (E-T) e o disco-difusão (DD). Com os métodos de MC e E-T, é possível ter uma análise quantitativa da sensibilidade aos antimicrobianos com definição da mínima concentração inibitória (MIC). A vantagem de realizar esse tipo de teste está em definir a dosagem de um antimicrobiano em uma situação clínica de resistência bacteriana, por exemplo, ou para teste de um novo fármaco que se quer saber qual é a concentração eficaz. No entanto, são métodos mais caros, dispendiosos e exigem maior treinamento técnico (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016).

Para fins deste capítulo, será abordado com mais detalhe a técnica de disco-difusão, pois é um dos testes mais antigos (BAUER *et al.*, 1966) e ainda hoje é utilizado como rotina em laboratórios clínicos, uma vez que permite o teste de sensibilidade de uma gama variada de micro-organismos e antimicrobianos (EUCAST®, 2017).

O princípio da técnica consiste na aplicação de um disco de papel filtro impregnado com uma solução antimicrobiana sob a superfície de um ágar inoculado com uma cultura de interesse. O antimicrobiano se difundirá pelo ágar e haverá a formação de um halo de inibição de crescimento correlacionado à sensibilidade do micro-organismo ao composto (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016) (Fig. 7).

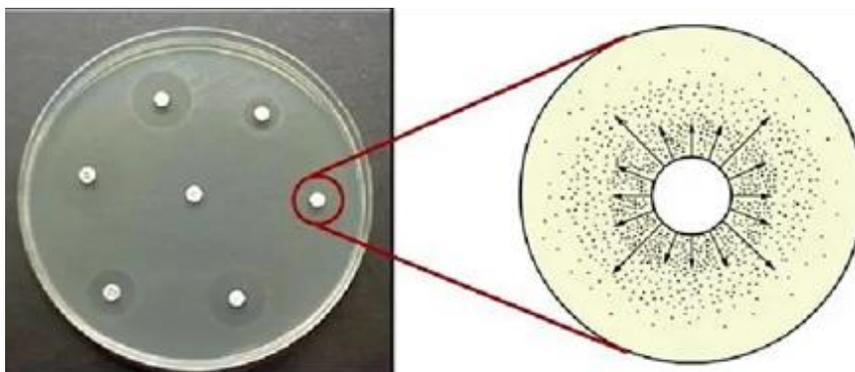


Figura 7. Princípio do método de disco-difusão. Fonte: ANVISA, 2020.

Na odontologia, são utilizados agentes químicos como forma de controle complementar do biofilme dental (FINE, 1995). Para uma verificação da eficácia destes agentes, podemos realizar de forma simplificada a técnica do disco-difusão e testar a sensibilidade de micro-organismos orais a diferentes colutórios.

Primeiramente, é necessário fazer o preparo do inóculo, que pode ser a cultura pura de algum micro-organismo ou uma amostra de saliva.

Preparo do inóculo – bactéria/levedura isolada: A cepa do micro-organismo deve ser cultivada previamente em uma placa de ágar BHI em condições adequadas para verificação da sua pureza. Após isso, as colônias são coletadas e adicionadas a uma solução fisiológica estéril até atingir um nível de turbidez comparável com uma escala padronizada (0,5 na escala de MCFARLAND), que corresponde a um número de células de 10^8 UFC/mL.

Preparo do inóculo – saliva: A coleta de saliva estimulada é realizada no momento da execução do teste.

A partir dessa suspensão do micro-organismo ou da saliva, é coletada uma alíquota de 200µL com uma micropipeta e adicionada a placa de Petri contendo meio de cultura sólido. A suspensão é espalhada pela placa de maneira uniforme com auxílio de pérolas de vidro estéreis. Após um período de secagem do inóculo, os discos são embebidos nas soluções de colutórios e adicionados às placas em locais previamente identificados. As placas são incubadas a 37°C por 24 a 48h em microaerofilia. Após o período de incubação é feita a medição do diâmetro do halo ao redor do disco (halo de inibição). Se houver halo de inibição, o resultado é apresentado em milímetros (mm).

O teste de sensibilidade aos agentes químicos pode ser feito para diversos micro-organismos orais isolados, conforme a disponibilidade do banco de cepas do laboratório, como, por exemplo, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus casei*, *Candida albicans* (ANEJA; JOSHI; SHARMA, 2010; COLLARES *et al.*, 2018; TALEBI *et al.*, 2014).

Os testes de sensibilidade são importantes para determinar se a substância testada é efetiva ou não para controlar/diminuir o número de micro-organismos, eles fornecem instruções importantes para o clínico decidir qual produto deve ser utilizado.

Considerações finais sobre as técnicas convencionais de estudo dos micro-organismos

Considerando os tópicos até aqui, podemos sintetizar que os métodos convencionais são largamente utilizados na microbiologia em geral, principalmente para realizar testes de sensibilidade a antimicrobianos,

identificar características fenotípicas, analisar rotas metabólicas e interações entre micro-organismos. São métodos mais acessíveis e relativamente fáceis de executar sendo amplamente utilizados em vários segmentos como na indústria alimentícia, farmacêutica, biológica, médica, odontológica, veterinária, entre outros.

Atualmente, foram desenvolvidas técnicas que avaliam o material genético. Muitas delas não dependem do crescimento dos micro-organismos, contribuindo para aprofundar o conhecimento existente. É o que discutiremos a seguir.

TÉCNICAS MODERNAS PARA ESTUDOS DE MICRO-ORGANISMOS BUCAIS INDEPENDENTES DE CULTIVO

Introdução à Microbiologia Molecular

A microbiologia molecular baseada em técnicas independentes de cultivo utiliza o material genético ou a expressão dele para compreender os processos ecológicos dos micro-organismos, bem como o metabolismo associado a esses processos. O material genético ou genoma pode ser entendido como o conjunto de genes de um ou mais micro-organismo(s). Para que a informação contida nos genes seja expressa, ocorre a chamada transcrição, que consiste na síntese de uma molécula de RNA mensageiro (mRNA) a partir do DNA e a tradução do RNA em proteína, processo descrito como Dogma Central da Biologia (DNA → RNA → Proteína). Dessa forma, quando um gene é codificado, ou seja, traduzido, chamamos este processo de expressão gênica. O conjunto de proteínas expressas por um

micro-organismo irá determinar quais as funções vitais desempenhadas por esse micro-organismo e irá resultar no seu fenótipo (TORTORA; CASE; FUNKE, 2017).

Os estudos relacionados à microbiologia molecular podem utilizar técnicas de sequenciamento de macromoléculas. O DNA e o RNA são macromoléculas constituídas de unidades repetidas chamadas nucleotídeos e cada espécie de micro-organismo tem uma sequência diferentes dessas unidades. Através do sequenciamento, que consiste na leitura dos nucleotídeos, podemos analisar e comparar essas moléculas entre os diferentes micro-organismos. À medida que as sequências de DNA/RNA dos micro-organismos vão sendo identificadas, essas informações são disponibilizadas em bancos de dados públicos para que se possa fazer comparações entre as sequências para fins de classificação, por exemplo. As etapas que seguem após o sequenciamento são realizadas de maneira computacional. A interpretação dos resultados de análises de dados biológicos através de ferramentas computacionais é conhecida como bioinformática. Existe uma infinidade de softwares específicos para análises, e a escolha desses softwares será feita de acordo com a técnica de análise utilizada (seja ela metodologia molecular tradicional ou de nova geração).

Nos últimos anos, a análise do material genético de amostras microbianas tem permitido um entendimento mais amplo das comunidades microbianas presentes na cavidade bucal. Esse entendimento surge do esforço de pesquisadores de todo o mundo para a amplificação e sequenciamento do DNA e do RNA de amostras biológicas de diferente ambientes. O projeto mais importante e famoso, considerado um marco na história da microbiologia, é o chamado Projeto Microbioma Humano

(Human Microbiome Project - HMP). Esse projeto surgiu em 2008, como uma iniciativa de pesquisa do Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos (NIH) em associação com pesquisadores de todo o mundo, para melhorar a compreensão da comunidade microbiana envolvida na saúde e nas doenças humanas. O projeto analisou amostras provenientes de 300 indivíduos saudáveis, sendo coletadas amostras de diversas superfícies do corpo: pele, nariz, boca (saliva, mucosa vestibular, gengiva ceratinizada, palato, tonsilas, língua, garganta, biofilme dentário supra e subgengival), intestino, vagina. O HMP continua promovendo pesquisas e tem o objetivo de catalogar todos os micro-organismos que vivem dentro e fora do corpo humano e sua influência na saúde e na doença. Graças ao HMP foram desenvolvidos métodos e descobertas relacionadas às interações entre seres humanos e o microbioma, e sua relação com saúde e diferentes doenças. Esses estudos sobre o microbioma humano ainda são muito “novos”. No entanto, as pesquisas relacionadas a este tema não param de crescer. De 2007 a 2019, o resultado das buscas de pesquisas relacionadas ao termo “human microbiome” na base de dados Pubmed subiu de 450 para 13.956 resultados ao ano.

Métodos moleculares têm contribuído amplamente para o estudo e compreensão da microbiologia relacionada à saúde humana, à patogenicidade de micro-organismos e suas relações com o hospedeiro. Esses métodos têm evidenciado o fato de que a maioria dos micro-organismos que colonizam o corpo humano ainda não pode ser caracterizada pelos métodos convencionais de cultivo. Além disso, comprovam que a composição do microbioma humano é mais complexa do que a previamente estudada, apresentando não apenas bactérias, mas também arqueas, fungos, pro-

tozoários, nematoides e vírus. O primeiro estudo relacionado a microbiologia molecular da cavidade bucal foi publicado em 1999 (KROES; LEPP; RELMAN, 1999). Esse estudo analisou o sequenciamento do gene 16S rRNA (região 16S do RNA ribossomal) e mostrou uma alta diversidade de micro-organismos na microbiota subgengival, dentre os quais há uma quantidade considerável de espécies ainda não identificadas.

Atualmente, as técnicas moleculares já identificaram cerca de 620 espécies bacterianas, sendo que 35% delas ainda não foram cultivadas *in vitro* (DEWHIRST *et al.*, 2010; PASTER; DEWHIRST, 2009). A partir desse momento, a biologia molecular foi além da identificação de espécies cultiváveis, podendo contribuir para a compreensão de micro-organismos não cultiváveis e quais as funções que esses micro-organismos têm potencial para desenvolver dentro de suas comunidades. Além disso, a biologia molecular tem permitido uma análise mais complexa das interações dos micro-organismos dos diferentes reinos, e que fazem parte do microbioma bucal, bem como o comportamento dos micro-organismos nos diferentes sítios da cavidade bucal (BOWEN, W.H. *et al.*, 2017; MARSH; ZAURA, 2017; SIMÓN-SORO, A. *et al.*, 2013; SIMÓN-SORO, A.; GUILLEN-NAVARRO; MIRA, 2014; ZAURA; MIRA, 2015; BENÍTEZ-PÁEZ *et al.*, 2014).

Uma amostra biológica (seja ela proveniente da saliva, do biofilme dentário ou de tecido cariado, por exemplo) pode ser analisada de uma perspectiva descritiva (avaliação do DNA) ou funcional (avaliação do RNA) (Figura 8). Iremos apresentar esses diferentes métodos, suas vantagens e desvantagens nos tópicos a seguir.

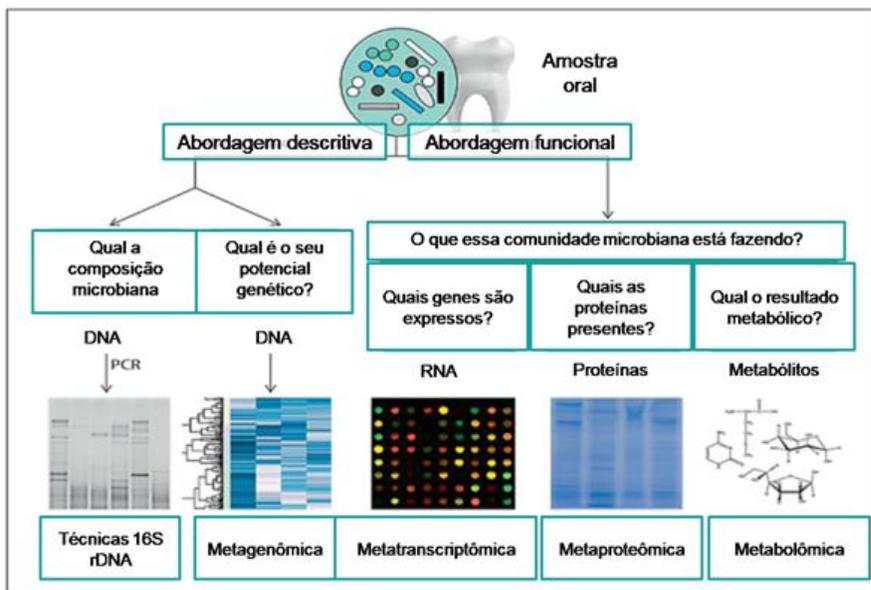


Figura 8. Representação esquemática de diferentes abordagens de estudo das comunidades microbianas (adaptado de NYVAD *et al.*, 2013).

Métodos moleculares

Os métodos moleculares podem ser divididos conforme sua finalidade. Os métodos moleculares tradicionais analisam um gene específico e são utilizados para identificação taxonômica, ou seja, para identificar qual a composição de micro-organismos pertencentes àquela amostra quanto ao seu domínio, reino, filo, classe, ordem, família, gênero e espécie. As técnicas que analisam todos os genes da amostra, são chamadas de tecnologias “omics”, e têm como principal objetivo entender como essa comunidade microbiana age, analisando suas funções. Dentre as tecnologias “omics”, a metagenômica é aquela que fornece informações sobre o repertório genético daquela comunidade. Já a metatranscriptômica,

metaproteômica e a metabolômica são aquelas que fornecem informações sobre os micro-organismos ativos e funcionais daquela amostra no período de tempo em que foi coletada, identificando, respectivamente, quais genes expressos estão metabolicamente ativos, quais proteínas estão sendo expressas e quais vias metabólicas estão sendo ativadas.

Métodos moleculares tradicionais

Estes métodos são baseados no sequenciamento de um único gene, sendo que a maioria das análises moleculares microbianas utilizam como alvo de identificação de micro-organismos, o gene 16S do RNA ribossomal (16S rRNA) para bactérias e arqueas e o gene 18S rRNA para fungos. Essa molécula de RNA é uma peça chave dos ribossomos bacterianos e o gene que codifica para essa molécula pode ser analisado após a extração de DNA da amostra. O 16S rRNA é o gene de escolha devido ao fato de que apresenta regiões do seu DNA bastante conservadas, mas também apresenta regiões variáveis que são únicas a um grupo microbiano ou gênero (WOESE; FOX, 1977), permitindo que o sequenciamento dessa molécula possa ser utilizado para identificar as espécies presentes naquela amostra pela similaridade das regiões conservadas comparadas com informações do sequenciamento de espécies já conhecidas (similaridade de 97% com a referência). Essa classificação é chamada de classificação taxonômica (classifica os micro-organismos quanto ao seu domínio, reino, filo, classe, ordem, família, gênero, espécie).

A biologia molecular tradicional versa sobre uma imensidão de técnicas e tecnologias para as análises de DNA e análises de genes específicos como o 16S rRNA. As técnicas baseadas em PCR são as mais amplamente utilizadas. Essas técnicas consistem na Reação em Cadeia da Polimerase, em que um pequeno fragmento de DNA proveniente de uma amostra biológica (saliva ou biofilme, por exemplo) é amplificado através da ação da enzima *taq polimerase* com *primers* (oligonucleotídeos iniciadores) específicos que ativam reações em cadeia da síntese de DNA *in vitro*. Os resultados das reações em cadeia da PCR podem ser analisados pela técnica de eletroforese em gel com gradiente de desnaturação, na técnica chamada de DGGE. O princípio da técnica está baseado no conceito de que diferentes sequências de DNA do gene 16S rDNA irão ter diferentes temperaturas de fusão (gradientes de desnaturação) e, conseqüentemente, diferente escoamento pelo gel. No gel de eletroforese, formam-se bandas e as diferentes posições indicam a qual espécie aquela sequência pertence (MUYZER; DE WAAL; UITTERLINDEN, 1993). A técnica é relativamente barata, fácil de executar e confiável. No entanto, não é uma técnica quantitativa e encontra importantes limitações para analisar amostras com várias espécies. Ainda assim, é excelente para uma análise inicial da diversidade microbiana em amostras de saliva e biofilme quando se busca por espécies específicas (espécies-alvo). A análise por similaridade também pode ser analisada pela comparação com bancos de dados de referência como o SILVA e *Greengenes*.

Diversas outras técnicas têm sido empregadas para análise do gene 16S rRNA, dentre as quais temos as variações do PCR convencional, como o PCR quantitativo ou *real-time* PCR, que consiste em captar a emissão de fluorescência durante as reações de PCR, obtendo os resultados em tempo real sem a necessidade de ter um passo adicional como o gel.

A técnica de *Microarray*, que utiliza uma grade com várias micro-sondas de DNA (fragmentos de 16S) para identificar trechos complementares das espécies alvo na amostra analisada. Técnica de hibridização DNA-DNA ou também chamada técnica *Checkerboard DNA-DNA hybridization*, que utiliza sondas de genomas completos para identificar um conjunto de espécies ao mesmo tempo.

Outra opção é a técnica de clonagem, que é um método que não necessita da seleção de espécies alvo a serem identificadas (*Open-ended approach*). A técnica consiste da clonagem do gene 16S rRNA da amostra estudada em outro micro-organismo (*Escherichia coli*, por exemplo) e depois os clones são sequenciados e identificados. Essa técnica tem grande valor no estudo da resistência a antimicrobianos e também na identificação de novos antibióticos.

A técnica de *Fluorescent in situ Hybridisation (FISH)* consiste do uso de células microbianas fixadas sobre uma superfície (com produtos químicos como paraformaldeído) e então permeabilizadas para permitir o acesso de oligonucleotídeos marcadores com sondas de fluorescência que marcam as regiões de rRNA específicas, identificando a que grupo taxonômico aquelas bactérias pertencem, sem a necessidade da extração de DNA.

De um modo geral, as técnicas baseadas na análise de um único gene (16S rRNA) são mais baratas do que as tecnologias “omics”, mas não são adequadas para fornecer informações sobre a capacidade funcional e nem sobre os metabólitos produzidos por aquele conjunto de micro-organismos analisados (NYVAD *et al.*, 2013). Essas técnicas têm como principais vantagens: o fato de fornecer uma visão geral das espécies presentes na amostra; ter um menor custo quando comparado às técnicas de sequenciamento de nova geração; as análises exigem menor poder computacional (capacidade de processamento das máquinas), pois não dependem de softwares específicos para análise (diferente dos resultados de sequenciamento que são computacionalmente complexos); podem ser utilizados como uma alternativa mais proveitosa quando os resultados são comparados com bases de dados de espécies que já têm seu genoma previamente sequenciado, como SILVA e Greengenes. Dentre as principais limitações podemos apontar que: em algumas amostras, a classificação taxonômica não consegue chegar a nível de espécies por falta de informação genética; estas técnicas fornecem informações apenas sobre a composição da comunidade microbiana e não trazem informações sobre as funções exercidas por esta comunidade; geralmente são focadas apenas no material de bactérias e arqueas (16S rRNA), sem trazer informações de fungos e vírus que podem ter importante papel nas doenças da cavidade bucal; os resultados podem ser comprometidos pela sensibilidade da técnica (viés de armazenamento, dificuldades na extração de DNA ou durante a execução da técnica de PCR); não discriminam células vivas/ativas de células mortas/inativas (WALKER, 2016).

Métodos moleculares de nova geração

Metagenômica

Ainda dentre os métodos descritivos, a análise das informações do DNA de todos os genes presentes na amostra será realizada pela metagenômica. A genômica se refere à área de estudo que envolve o mapeamento, o sequenciamento, a análise e a comparação de genomas (MADIGAN *et al.*, 2016), já o termo meta se refere a coleção de todos os genomas da comunidade estudada. A metagenômica tem o objetivo de determinar as potenciais funções dos genes, analisando todos os genes presentes naquela amostra, sejam eles ativos ou não.

Dentre as principais vantagens da metagenômica podemos destacar que: permite a caracterização da composição e das potenciais funções da comunidade microbiana; permite a avaliação de espécies não cultiváveis pelos métodos tradicionais de cultivo; fornece simultaneamente informações de bactérias, arqueas, eucariotos e vírus; não está sujeito a vieses da técnica de PCR; pode ser utilizado em indivíduos não viáveis, pois o DNA não degrada facilmente. Já dentre as principais limitações podemos apontar: pode exigir sequenciamento muito profundo para atingir uma cobertura razoável do genoma, tornando a técnica relativamente cara; a análise dos dados gerados exige grande poder computacional; ainda existem muitos genes com funções desconhecidas; vieses de coleta e armazenamento das amostras e extração de DNA podem comprometer a qualidade dos resultados; todos os genes presentes na amostra são iden-

tificados sejam eles viáveis ou não, ou seja, dá as informações sobre todos os micro-organismos vivos ou não presentes naquela amostra, diferente das outras tecnologias “omics” (WALKER, 2016).

Metatranscriptômica

A técnica da Metatranscriptômica, também chamada de RNA-seq, se baseia na análise do RNA da amostra. Para tanto, é necessária realizar a extração do RNA, isolamento do mRNA e o sequenciamento da amostra extraída em um equipamento de alto rendimento (sequenciador Illumina). Os dados sequenciados são então alinhados a genomas de referência ou, anotados para construir um genoma próprio (para casos de espécies que ainda não tem genomas de referência, por exemplo, chamada anotação *de novo*). Essas etapas que seguem após o sequenciamento são realizadas através de softwares de bioinformática. O resultado da metatranscriptômica é a expressão gênica, ou seja, a informação de quais são todos os genes efetivamente expressos por aquela comunidade microbiana no momento da coleta das amostras.

Existem diversas plataformas e equipamentos que permitem este tipo de análise, como os equipamentos da Illumina (MiSeq, HiSeq). Esses tipos de sequenciadores são chamados de Sequenciadores de Próxima Geração (Next-Generation Sequencing) e conseguem realizar o sequenciamento simultâneo de diversos genomas microbianos em poucas horas.

As principais vantagens desta técnica são que: ela fornece informações sobre os genes ativos presentes na amostra; e, permite a avaliação de espécies não cultiváveis pelos métodos tradicionais de cultivo. Dentre as

principais limitações podemos listar: a fácil degradação do RNA, necessitando de reagentes específicos para sua conservação; exige uma técnica laboratorial prévia ao sequenciamento que é trabalhosa e bastante sensível; muitos genes ainda apresentam funções desconhecidas (WALKER, 2016); é uma técnica relativamente cara devido aos reagentes específicos da marca comercial do sequenciador utilizado; além disso, os sequenciadores são equipamentos extremamente caros e que muitas vezes têm uso pago.

Metaproteômica

O total de proteínas expressas por uma amostra ou comunidade microbiana será estudado através da técnica de metaproteômica. Acompanhar mudanças na expressão de proteínas pode ser de grande valor para entender o que difere nas condições de saúde e doença, por exemplo. Este tipo de análise inclui a extração das proteínas, sua separação e caracterização. Análises de espectrometria de massas e subsequente utilização de bioinformática para comparações dos dados obtidos contra bancos de dados existentes e posterior interpretação dos resultados.

As principais vantagens dessa tecnologia são o fato de ela permitir a avaliação de espécies não cultiváveis pelos métodos tradicionais de cultivo; permitir a avaliação das funções efetivamente desempenhadas pela comunidade. Quando comparada com a técnica de metatranscriptômica, a proteômica, tem a vantagem de medir proteínas e não mRNA e, assim, medir de uma maneira mais ampla e representativa da atividade funcional daquela comunidade já que avalia a tradução dos genes em proteínas (CAIN; SOLIS; CORDWELL, 2014). Além disso, as proteínas são mais estáveis e menos suscetíveis a degradação do que o RNA. Quando

comparada à metagenômica, a metaproteômica é relativamente mais rápida e mais barata. Quanto às limitações, deve-se ressaltar que apenas as proteínas com maiores níveis de expressão serão identificadas com expressão diferente entre as duas condições estudadas, sendo geralmente expressas pelos micro-organismos mais prevalentes naquelas amostras. No entanto, pode ser difícil diferenciar proteínas semelhantes (VERBERKMOES *et al.*, 2009) e proteínas que pertencem ao hospedeiro, e as que são realmente de origem microbiana, sendo necessário realizar essa separação com a bioinformática, por exemplo.

Metabolômica

Metabolômica é o estudo do total de metabólitos produzidos por uma comunidade microbiana pertencente a amostra estudada, no determinado tempo em que aquela amostra foi coletada.

Esta técnica envolve a extração dos metabólitos, geralmente de fluidos corporais como saliva, urina, fezes, sangue. Após o isolamento, as diferenças e classificação dos metabólitos é feita por técnicas de ressonância magnética nuclear ou de microscopia ou espectrometria de massas. O resultado final dessas abordagens são uma série de espectros ou picos característicos dos metabólitos que estão presente na amostra original. A principal vantagem desta técnica é que ela avalia os produtos finais (metabólitos) produzidos pela comunidade microbiana (tanto de bactérias, arqueas, fungos, vírus). Então a abordagem da metabolômica é muito mais ampla do que quando estamos analisando genes (mRNA - transcriptômica) ou proteínas (proteômica).

Mas esta técnica também apresenta desvantagens como: não é possível identificar qual espécie de micro-organismo é a responsável pela produção do metabólito; como alguns produtos metabólicos produzidos pela comunidade microbiana são rapidamente absorvidos pelo organismo do hospedeiro, esses metabólitos não serão detectados por esta técnica, ou seja, os resultados devem ser analisados com cautela; além disso, apenas uma parcela dos possíveis metabólitos produzidos pelos micro-organismos dos diferentes reinos é conhecida e registrada nas bases de dados de referência, ou seja, alguns metabólitos produzidos podem ser identificados como tendo função desconhecida (BAKER, M., 2011).

Considerações finais sobre as técnicas modernas de estudo dos micro-organismos

As tecnologias moleculares possibilitam que os estudos sobre os micro-organismos atravessem a barreira de quais são os micro-organismos cultiváveis presentes em determinada comunidade e cheguem a resultados que mostrem quem são e quais as funções dos micro-organismos presentes em determinada comunidade.

Pode-se observar que as diferentes abordagens de análise molecular e funcional do microbioma bucal apresentam tanto vantagens quanto desvantagens. Esses aspectos devem ser levados em consideração no momento do planejamento de metodologias de pesquisas relacionadas ao microbioma bucal.

Diversos autores utilizam estas tecnologias para estudar o microbioma relacionado à saúde e a doença na cavidade bucal. A caracterização dos micro-organismos de diferentes reinos e suas funções em quadros de saúde e doença já foram estudados quanto à doença periodontal (SOLBIATI; FRIAS-LOPEZ, 2018; GUERRA *et al.*, 2018), às alterações endodônticas (GOMES *et al.*, 2015; PERSON *et al.*, 2017) e à cárie dental (SOLBIATI; FRIAS-LOPEZ, 2018; TANNER *et al.*, 2018). No entanto, essa é uma área em crescimento na pesquisa odontológica. Grandes descobertas ainda poderão surgir através dos avanços destas tecnologias.

CONSIDERAÇÕES FINAIS DO CAPÍTULO

O estudo do microbioma através de técnicas modernas de biologia molecular agrega-se em diferentes aspectos ao conhecimento produzido pelas técnicas convencionais. A possibilidade de associar técnicas convencionais e moleculares é, provavelmente, a melhor contribuição para o estudo do microbioma bucal. Ambas as abordagens têm suas vantagens e desvantagens. Enquanto as técnicas moleculares independentes de cultivo trazem conhecimentos sobre uma maior diversidade de micro-organismos, o cultivo dos micro-organismos tem grande papel para confirmar essas informações e para investigar mais sobre as associações de micro-organismos de diferentes espécies ou reinos, por exemplo. Além disso, as técnicas de cultivo têm ainda grande valia na identificação de espécies menos prevalentes das comunidades estudadas e comunidades que, possivelmente, passariam despercebidas pelas técnicas “omics”. Adicional-

mente, as técnicas convencionais também evoluem constantemente com o desenvolvimento e melhoramento da composição dos meios de cultura, a fim de permitir crescimento de espécies antes não cultiváveis.

Assim, podemos concluir que as técnicas se complementam e permitem avanços nos conhecimentos que revelam micro-organismos antes desconhecidos, relações entre diferentes reinos que antes passavam despercebidas e relações entre o microbioma e diversas condições de saúde e doenças humanas. Essas vantagens resultam em avanços com relevância clínica em diversas áreas da saúde humana e também da saúde bucal. O uso da amplitude de técnicas de análise do microbioma permite o desenvolvimento de *insights* sobre o diagnóstico, a modulação e o tratamento de diversas doenças como o câncer bucal, a periodontite, a peri-implantite, as afecções endodônticas e a cárie. É possível inclusive apontar alguns micro-organismos que poderiam ser indicados como marcadores de saúde ou de doença. Por fim, é preciso lembrar que a melhor tecnologia disponível para o estudo do microbioma bucal é aquela que responde à pergunta que queremos resolver, seja quem são os micro-organismos que estão presentes, seja o que eles estão fazendo.

REFERÊNCIAS

ANEJA, K. R.; JOSHI, R.; SHARMA, C. The antimicrobial potential of ten often used mouthwashes against four dental caries pathogens. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 3, p. 15-27, 2010.

ANVISA. III. Métodos para o TSA - Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede_rm/cursos/atm_racional/modulo2/metodos5.htm>. Acesso em: 5 ago. 2020.

Módulo 6 : Detecção e identificação de bactérias de importância médica/ Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2013. Disponível em: <[https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/servicosdesaude/publicacoes/modulo-6-deteccao-e-identificacao-de-bacterias-de-importancia-medica/@@download/file/iras_moduloDeteccaoBacterias%20\(1\).pdf](https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/servicosdesaude/publicacoes/modulo-6-deteccao-e-identificacao-de-bacterias-de-importancia-medica/@@download/file/iras_moduloDeteccaoBacterias%20(1).pdf)>. Acesso em: 10 mar. 2021.

BAKER, J. L. *et al.* Ecology of the Oral Microbiome: Beyond Bacteria. **Trends in Microbiology**, v. 25, n. 5, p. 362-374, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2016.12.012>>. Acesso em: 20 nov. 2020.

BAKER, M. Metabolomics: From small molecules to big ideas. **Nature Methods**, v. 8, p. 117-121, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nmeth0211-117>>. Acesso em: 20 nov. 2020.

BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 6, n. 2, p. 71-79, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>>. Acesso em: 20 nov. 2020.

BAUER, A. W. *et al.* Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American journal of clinical pathology**, v. 45, n. 4, p. 493-496, 1966.

BEIGHTON, D. *et al.* Salivary levels of mutans streptococci, lactobacilli, yeasts, and root caries prevalence in non-institutionalized elderly dental patients. **Community Dentistry and Oral Epidemiology**, v. 19, n. 5, p. 302-307, 1991.

BENÍTEZ-PÁEZ, A. *et al.* Microbiota diversity and gene expression dynamics in human oral biofilms. **BMC Genomics**, v. 15, p. 311, 2014.

BJØRNDAL, L.; LARSEN, T. Changes in the Cultivable Flora in Deep Carious Lesions following a Stepwise Excavation Procedure. **Caries Research**, v. 34, n. 6, p. 502-508, 2000. DOI: 10.1159/000016631. PMID: 11093026. Disponível em: <<https://doi.org/10.1159/000016631>>. Acesso em: 20 nov. 2020.

BONNET, M. *et al.* Bacterial culture through selective and non-selective conditions: the evolution of culture media in clinical microbiology. **New Microbes and New Infections**, v. 34, 2020.

BOYANOVA, L. Direct Gram staining and its various benefits in the diagnosis of bacterial infections. **Postgraduate Medicine**, v. 130, n. 1, p. 105-110, 2018.

BOWEN W. H.; BURN R. A.; WU H.; KOO H. Oral Biofilms: Pathogens, Matrix, and Polymicrobial Interactions in Microenvironments. **Trends Microbiol**, v. 6, n. 3, p. 229-242, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.09.008>>. Acesso em: 20 nov. 2020.

BROOKS, G. F. *et al.* **Microbiologia Médica de Jawetz, Melnick & Adelberg**. 26.ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

CAIN, J. A.; SOLIS, N.; CORDWELL, S. J. Beyond gene expression: The impact of protein post-translational modifications in bacteria. **Journal of Proteomics**, v. 97, p. 265-286, 2014.

COLLARES, F. M. *et al.* Methacrylate-based root canal sealer containing chlorhexidine and α - tricalcium phosphate. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, v. 106, n. 4, p. 1439-1443, 2018.

DEWHIRST, F. E. *et al.* The human oral microbiome. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 19, p. 5002-5017, 2010.

EGAN, M. W. *et al.* Prevalence of yeasts in saliva and root canals of teeth associated with apical periodontitis. **International Endodontic Journal**, v. 35, n. 4, p. 321-329, 2002.

EIDT, G. *et al.* Role of candida albicans on enamel demineralization and on acidogenic potential of streptococcus mutans in vitro biofilms. **Journal of Applied Oral Science**, v. 27, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/1678-7757-2018-0593>>. Acesso em: 20 nov. 2020.

EUCAST®. Teste sensibilidade aos antimicrobianos. Método de disco-difusão EUCAST. **European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 0, p. 1-34, 2017.

FEJERSKOV, O. *et al.* Dental caries: the disease and its clinical management, 2nd edition. 2. ed. Blackwell Munksgaard, 2009. v. 206.

FINE, D. H. Chemical agents to prevent and regulate plaque development. **Periodontology 2000**, v. 8, p. 87-107, 1995. DOI: 10.1111/j.1600-0757.1995.tb00047.x. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.1995.tb00047.x>>. Acesso em: 20 nov. 2020.

GOLD, O. G.; JORDAN, H. V.; VAN HOUTE, J. A selective medium for Streptococcus mutans. **Archives of Oral Biology**, v. 18, n. 11, p. 1357-1364, 1973.

GOMES, B. P. F. A. *et al.* Microbiomes of Endodontic-Periodontal Lesions before and after Chemomechanical Preparation. **Journal of Endodontics**, v. 41, n. 12, p. 1975-1984, 2015. DOI: 10.1016/j.joen.2015.08.022. Disponível: <<https://doi.org/10.1016/j.joen.2015.08.022>>. Acesso em: 20 nov. 2020.

GRECCA, F. S. *et al.* Effect of timing and method of post space preparation on sealing ability of remaining root filling material: In vitro microbiological study. **Journal of the Canadian Dental Association**, v. 75, p. 583, 2009.

GUERRA, F. *et al.* Periodontitis and the microbiome: A systematic review and meta-analysis. **Minerva Stomatologica**, v. 67, n. 6, p. 250-258, 2018.

HEGDE, R. J.; KAMATH, S. Comparison of the Streptococcus mutans and Lactobacillus colony count changes in saliva following chlorhexidine (0.12%) mouth rinse, combination mouth rinse, and green tea extract (0.5%) mouth rinse in children. **Journal of Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry**, v. 35, n. 2, p. 150-155, 2017. DOI: 10.4103/JISPPD.JISPPD_13_17. Disponível em: <https://doi.org/10.4103/jisppd.jisppd_13_17>. Acesso em: 20 nov. 2020.

JARDIM JÚNIOR, E. *et al.* Detecção de microrganismos de infecções bucais: perspectivas e cuidados a serem seguidos. **Revista FUNEC Científica - Multidisciplinar**, v. 1, n. 1, p. 1-8, 2011. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/133528>>. Acesso em: 20 nov. 2020.

KROES, I.; LEPP, P. W.; RELMAN, D. A. Bacterial diversity within the human subgingival crevice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 25, p. 14547-14552, 1999. DOI: 10.1073/pnas.96.25.14547. Disponível em: <<https://doi.org/10.1073/pnas.96.25.14547>>. Acesso em: 20 nov. 2020.

LIU, Y. *et al.* Antibacterial photodynamic therapy: overview of a promising approach to fight antibiotic-resistant bacterial infections. **Journal of Clinical and Translational Research**, v. 1, n. 3, p. 140-167, 2015.

LORENZ, K. *et al.* Impact of different concentrations of an octenidine dihydrochloride mouthwash on salivary bacterial counts: a randomized, placebo-controlled cross-over trial. **Clinical Oral Investigations**, v. 22, n. 8, p. 2917-2925. 2018. DOI: 10.1007/s00784-018-2379-0. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00784-018-2379-0>>. Acesso em: 20 nov. 2020.

MADIGAN, M. *et al.* Microbiologia de Brock. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

MADIGAN, M. *et al.* Microbiologia de Brock. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

MALTZ, M. *et al.* **Cariologia: Conceitos Básicos, Diagnóstico e Tratamento Não Restaurador: Série Abeno: Odontologia Essencial - Parte Clínica**. 1. ed. Porto Alegre: Artes Medicas, 2016. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?id=SVSnDAAAQBAJ>>. Acesso em: 20 nov. 2020.

MARSH, P. D.; ZAURA, E. Dental biofilm: ecological interactions in health and disease. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 44, S12-S22, 2017. DOI: 10.1111/jcpe.12679. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/jcpe.12679>>. Acesso em: 20 nov. 2020.

MUYZER, G.; DE WAAL, E. C.; UITTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 695-670, 1993.

NAGHILI, H. *et al.* Validation of drop plate technique for bacterial enumeration by parametric and nonparametric tests. **Veterinary research forum: an international quarterly journal**, v. 4, n. 3, p. 179-183, 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4312378>>. Acesso em: 20 nov. 2020.

NYVAD, B. *et al.* Dental caries from a molecular microbiological perspective. **Caries Research**, v. 47, p. 89-102, 2013.

PASTER, B. J.; DEWHIRST, F. E. Molecular microbial diagnosis. **Periodontology 2000**, v. 51, p. 38-44. 2009. DOI: 10.1111/j.1600-0757.2009.00316.x. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1600-0757.2009.00316.x>>. Acesso em: 20 nov. 2020.

PERSOON, I. F. *et al.* The mycobiome of root canal infections is correlated to the bacteriome. **Clinical Oral Investigations**, v. 21, n. 5, p. 1871-1881, 2017. DOI: 10.1007/s00784-016-1980-3. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00784-016-1980-3>>. Acesso em: 20 nov. 2020.

ROGOSA, M.; MITCHELL, J. A.; WISEMAN, R. F. A Selective Medium for the Isolation and Enumeration of Oral Lactobacilli. **Journal of Dental Research**, v. 30, n. 5, p. 682-689, 1951.

SANCHEZ, A. Y. *et al.* In situ effect of arginine-containing dentifrice on plaque composition and on enamel demineralization under distinct cariogenic conditions. **Caries Research**, v. 52, n. 6, p. 588-597, 2018. DOI: 10.1159/000488212. Disponível em: <<https://doi.org/10.1159/000488212>>. Acesso em: 20 nov. 2020.

- SEKINO, S. *et al.* Effect of various chlorhexidine regimens on salivary bacteria and de novo plaque formation. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 30, n. 10, p. 919-925, 2003.
- SIMÓN-SORO, A. *et al.* A tissue-dependent hypothesis of dental caries. **Caries Research**, v. 47, n. 6, p. 777-780, 2013.
- SIMÓN-SORO, A.; GUILLEN-NAVARRO, M.; MIRA, A. Metatranscriptomics reveals overall active bacterial composition in caries lesions. **Journal of Oral Microbiology**. v. 6, 2014. DOI: 10.3402/jom.v6.25443. Disponível em: <<https://doi.org/10.3402/jom.v6.25443>>. Acesso em: 20 nov. 2020.
- SOLBIATI, J.; FRIAS-LOPEZ, J. Metatranscriptome of the Oral Microbiome in Health and Disease. **Journal of Dental Research**, v. 97, n. 5, p. 492-500, 2018.
- TALEBI, S. *et al.* Comparison of the in vitro effect of chemical and herbal mouthwashes on *Candida albicans*. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v.7, n.12, 2014. DOI: 10.5812/jjm.12563. Disponível em: <<https://doi.org/10.5812/jjm.12563>>. Acesso em: 20 nov. 2020.
- TANNER, A. C. R. *et al.* The Caries Microbiome: Implications for Reversing Dysbiosis. **Advances in dental research**, v. 29, n. 1, p. 78-85, 2018. DOI: 10.1177/0022034517736496. Disponível em: <<https://doi.org/10.1177/0022034517736496>>. Acesso em: 20 nov. 2020.
- TORTORA, G.; CASE, C.; FUNKE, B. **Microbiologia**. Porto Alegre: Artmed, 2017.
- TRABULSI, L. R.; ALBERTHUM, F. **Microbiologia**. 6. ed. São Paulo: Atheneu, 2015.
- VERBERKMOES, N. C. *et al.* Shotgun metaproteomics of the human distal gut microbiota. **ISME Journal**, v. 3, p. 179-189, 2009.
- WALKER, A. W. Studying the human microbiota. *In*: SCHWIERTZ, A. (Org.). **Advances in Experimental Medicine and Biology**. Springer, Cham., 2016. v. 902. p. 5-32.
- WESTERGREN, G.; KRASSE, B. Evaluation of a micromethod for determination of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 7, n. 1, p. 82-83, 1978.
- WOESE, C. R.; FOX, G. E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 11, p. 5088-5090, 1977.
- ZAURA, E.; MIRA, A. Editorial: The oral microbiome in an ecological perspective. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 5, n. 39, 2015.

2

Ecologia Bucal

Sandra Liana Henz

Lina Naomi Hashizume

Rodrigo Alex Arthur

A ecologia microbiana define-se por atuações de micro-organismos em ecossistemas.

Ecologia Bucal: estudo da relação entre os membros da microbiota bucal e a influência do ambiente sobre eles.

Ecossistema Bucal: espaço natural com características biológicas e ambientais definidas. É composto pelos organismos vivos e os elementos ambientais. Composto por fatores abióticos e bióticos.

Fatores Abióticos: habitat. Na cavidade bucal, constituem-se das estruturas anatômicas da região (mucosas, dentes e sulcos). Também fazem parte: temperatura, umidade, pH e potencial de oxirredução.

Fatores Bióticos: micro-organismos que vivem no habitat.

MICROBIOTA NORMAL DO ORGANISMO

Cada região do organismo possui uma microbiota característica em decorrência de fatores como: superfícies adequadas para adesão, estruturas específicas dos micro-organismos, temperatura, umidade, presença de fatores nutritivos e quantidade de substâncias inibitórias.

Na cavidade oral, pode ser verificada uma série de fenômenos de interações microbianas favorecidas pela grande variedade e quantidade de micro-organismos que nela habitam, bem como pelas suas características anatômicas e fisiológicas. A boca possui condições variáveis de

oxigênio, nutrientes e estruturas. O fluxo salivar e o fluido do sulco gengival criam condições favoráveis às exigências nutritivas, respiratórias e de aderência para os micro-organismos.

A flora presente na cavidade bucal, em geral, é classificada em três tipos:

- **Indígena:** grupo fixo ou permanente de micro-organismos encontrados em uma determinada área em quantidade compatível com o hospedeiro. Quando alterada, prontamente se recompõe. Também chamada de permanente, normal ou autóctone. Compreende aquelas espécies presentes em número superior a 1% em cada sítio específico.
- **Suplementar:** grupo de micro-organismos presentes em baixo número (abaixo de 1%), podendo estar associados a doenças. Com alterações no meio ambiente, podem aumentar em número ou tornarem-se parte da microbiota indígena.
- **Transitória:** grupo de micro-organismos não patogênicos ou potencialmente patogênicos que habitam o meio bucal por horas, dias ou semanas. São espécies originárias do meio ambiente, que ficam presentes por um determinado período e depois são eliminadas por mecanismos de defesa. Não se estabelecem de modo permanente na região por não conseguirem se fixar a ela.

IMPORTÂNCIA E PREJUÍZOS DA MICROBIOTA PARA O HOSPEDEIRO

- **Efeitos positivos:** nutrição do hospedeiro (digestão e síntese de vitaminas); estimula o desenvolvimento de anticorpos naturais, papel no antagonismo a micro-organismos patogênicos, atuação no desenvolvimento de tecidos e órgãos.
- **Efeitos negativos:** reações de hipersensibilidade e infecções (cárie, doença periodontal, infecções anaeróbicas e endocardite bacteriana subaguda). Em certas ocasiões, os micro-organismos presentes podem exercer o papel de patógenos oportunistas, como a *Cândida spp.* e *Staphylococcus spp.*, que têm sido reportados em casos de superinfecções (MARTINS; KOGA-ITO; JORGE, 2002).

CARACTERÍSTICAS DA MICROBIOTA BUCAL

A cavidade bucal foi descrita em 1944 por Appleton como um sistema fluvial. A microbiota bucal é um sistema de crescimento bacteriano aberto e que permite interações entre suas espécies constituintes. Nutrientes, oxigênio e micro-organismos são introduzidos e removidos constantemente. O estabelecimento de micro-organismos se dá através de suas capacidades de aderência às superfícies do meio bucal ou que se refugiam em sulcos, fissuras ou espaços interproximais dos dentes.

Trata-se de uma microbiota própria, devido a características próprias da cavidade oral, como o sistema fluvial proporcionado pela presença constante da saliva e de outros fluidos orais. Isso significa que a maioria dos seus componentes não tem capacidade de colonizar outro local.

Existem na boca cerca de 800 espécies bacterianas diferentes, constituindo uma média de 750 milhões de micro-organismos a cada mililitro de saliva e cerca de 200 bilhões a cada grama de biofilme. Quanto à aquisição da microbiota, o recém-nascido é asséptico e constitui sua microbiota com micro-organismos vindos de veículos ambientais como ar, água e contato com outros seres humanos e leite materno. Já no primeiro dia de vida, adquirimos diferentes micro-organismos, que se estabelecem nos tecidos moles.

Nas crianças ainda desdentadas, a microbiota predominante é a aeróbia, enquanto que nas crianças dentadas e adultos observa-se uma microbiota mista. Os micro-organismos pioneiros isolados durante as primeiras semanas pós-natal são predominantemente os *Streptococcus*, incluindo os *S. Mitis*, *S. oralis* e *S. salivarius*. A microbiota torna-se mais complexa ao longo dos meses iniciais, com bactérias como a *Veillonella* e a *Prevotella* incluídas na comunidade bacteriana.

Na medida em que ocorrem as erupções dentárias, vão criando-se diferentes superfícies para a agregação microbiana como fóssulas, fissuras e sulcos gengivais, caracterizando a criação de nichos anaeróbios. Entre os micro-organismos que se estabelecem a partir de então, encontram-se *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. sanguis*, algumas espécies de *Actinomyces* e bactérias anaeróbias.

Durante a colonização contínua, a microbiota sofre alteração de microbiota aeróbia para microbiota anaeróbia. Os *Streptococcus mutans* necessitam de superfícies duras para se aderirem, mas mesmo assim alguns autores relatam a possibilidade desses micro-organismos fazerem parte da microbiota oral de bebês edêntulos como habitantes transitórios, uma vez que não encontram as condições favoráveis para a colonização efetiva.

Existem quatro nichos de micro-organismos principais na cavidade oral: superfície do dente, sulco gengival, dorso da língua e mucosa da bochecha. Em cada uma dessas regiões há uma microbiota específica, devido aos mecanismos de aderência dos micro-organismos e aos mecanismos de defesa do hospedeiro.

- **Língua:** Cocos Gram-positivos representam 50% do total. Entre eles estão *S. salivarius*, *S. mitis*, *S. sanguis*. Entre os cocos Gram-negativos, está presente a *Veillonella* com maior virulência e, entre os bastonetes Gram-positivos, a *Actinomyces*.
- **Superfície dental:** Cocos Gram-positivos (*S. salivarius*, *S. mitis*, *S. sanguis* e *S. milleri*) representam 40% do total. Também estão presentes cocos Gram-negativos e bastonetes Gram-negativos.
- **Sulco gengival:** presença de cocos Gram-positivos, bastonetes Gram-positivos (*Actinomyces*) e bastonetes Gram-negativos (*Bacteroides* e *Fusobacterium*).
- **Mucosa da bochecha:** favorece anaeróbios facultativos. Ex: *Streptococcus viridans*.

SUCESSÃO MICROBIANA

Processo de troca de uma comunidade por outra em resposta a modificações do habitat. Ocorre aquisição de novos micro-organismos e modificação na quantidade e na localização dos já existentes. Colonizadores secundários aderem-se aos primários por interações adesina-receptor. A sucessão de micro-organismos em um determinado meio pode ocorrer de duas formas, favorecendo que diferentes espécies o colonizem a partir de então:

- **Alogênica:** quando o habitat é alterado por fatores não microbianos, mas sim por modificação nas condições do meio ou no hospedeiro. Exemplos são o nascimento, a erupção ou perda dentária, os procedimentos de higiene bucal, a presença de doenças.
- **Autogênica:** quando o habitat é alterado pelos próprios micro-organismos do meio. Exemplos são a remoção de nutrientes, a formação de ácidos e a produção de compostos inibitórios. Os micro-organismos pioneiros criam um meio que é mais favorável para a proliferação dos invasores secundários.

DETERMINANTES ECOLÓGICOS

São fatores que condicionam a existência dos micro-organismos na microbiota bucal, controlando quais irão se estabelecer e onde irão se estabelecer. Podem ser:

- **Fatores Físicos:** características estruturais do ambiente. Exemplo: temperatura em 37°C, umidade controlada, pH entre 6 e 7,8 e potencial de oxirredução (ambiente aeróbio ou anaeróbio).
- **Fatores Nutricionais:** composição da saliva (proteínas, lipídios, minerais), disponibilidade de nutrientes endógenos (fluido gengival, células, sangue) e consistência e composição da dieta do hospedeiro.
- **Fatores Inibitórios:** presença de fluxo salivar, movimentos musculares, descamação natural das células epiteliais da mucosa, práticas de higiene bucal, presença de inibidores salivares (enzimas com capacidade lítica) e substâncias bacterianas (ácidos e bacteriocinas).
- **Fatores de Aderência:** possibilidade de aderência com a superfície, presença de tecidos fixos e capacidade de aderência entre espécies.

ADERÊNCIA BACTERIANA

São meios de retenção dos micro-organismos para se estabelecer na cavidade oral. Quando conseguem resistir aos fatores determinantes, conseguem colonizar a região através desses meios.

Existem dois mecanismos essenciais de aderência bacteriana. São eles a retenção adesiva e a não adesiva.

Retenção adesiva: adesão das bactérias à superfície dos tecidos bucais. Um micro-organismo pode possuir vários mecanismos de adesão ou pode possuir nenhum e, mesmo assim, conseguir se estabelecer. As bactérias possuem mecanismos de adesão químico-físicos como:

Glicocálice Bacteriano: cápsulas polissacarídeas externas à parede celular que permitem a formação de pontes de hidrogênio ou interações dipolo-dipolo entre o dente e a bactéria.

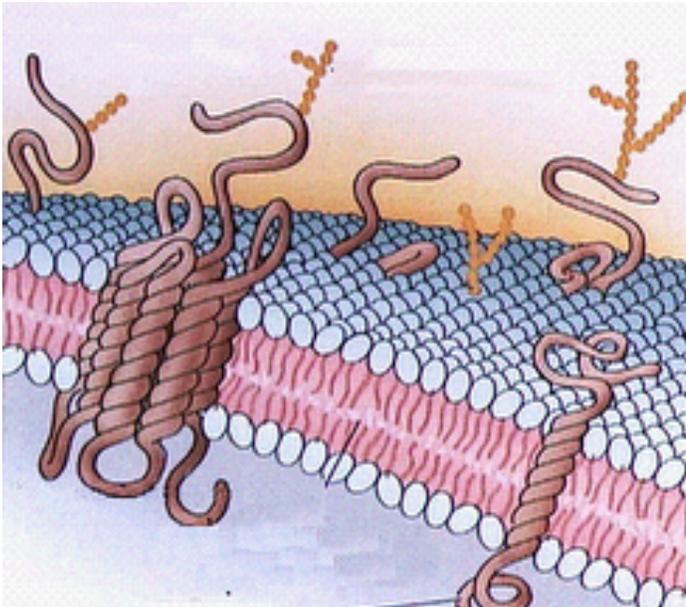


Figura: Glicocálice bacteriano.

Pili ou Fímbrias: extensões do glicocálice que formam pontes de contato entre a bactéria e o dente.

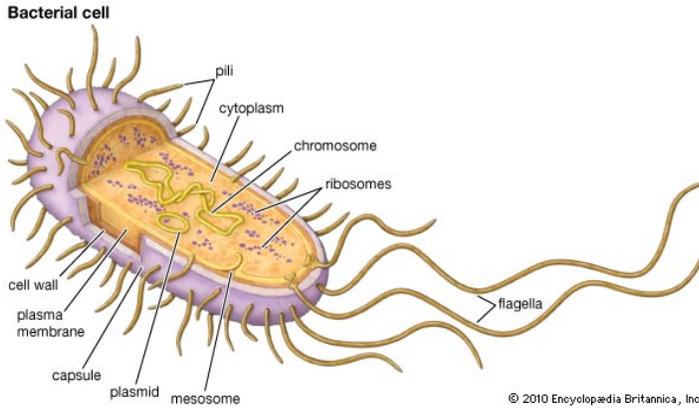


Figura: Pili ou Fímbrias bacterianas apontadas pela seta.

Adesinas: moléculas do glicocálice ou das fímbrias que se ligam aos receptores localizados na superfície dentária, nas células epiteliais ou na película adquirida.

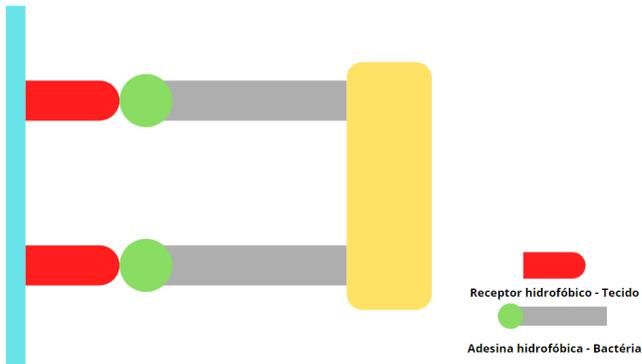


Figura: Adesinas bacterianas representadas pela cor verde. Fonte: Autores.

Camada de Hidratação: camada formada por íons cálcio, que são íons positivos, que se ligam aos íons negativos do dente e da bactéria, promovendo sua interação.

Polissacarídeos Extracelulares (PEC): polímeros formados pelas bactérias a partir da sacarose que promovem aderência entre a superfície dentária e o micro-organismo ou entre os micro-organismos.

Polímeros Salivares: substâncias presentes na saliva, envolvidas na fixação inicial das bactérias.

Micro-organismos: constituintes de sua superfície possuem estruturas que auxiliam na aderência de novos micro-organismos.

Exemplos de adesão:

S. mitis, sanguis e mutans: se aderem à superfícies duras.

S. salivarius: se adere à língua e bochecha. Possui glicocálice fibrilar denso.

S. sanguis, A. viscosus e A. naeslundii são aglutinados por polímeros salivares.

S. mutans é aglutinado por polissacarídeo extracelular dextrano.



Figura: *S. sanguis* (imagem de microscopia eletrônica).

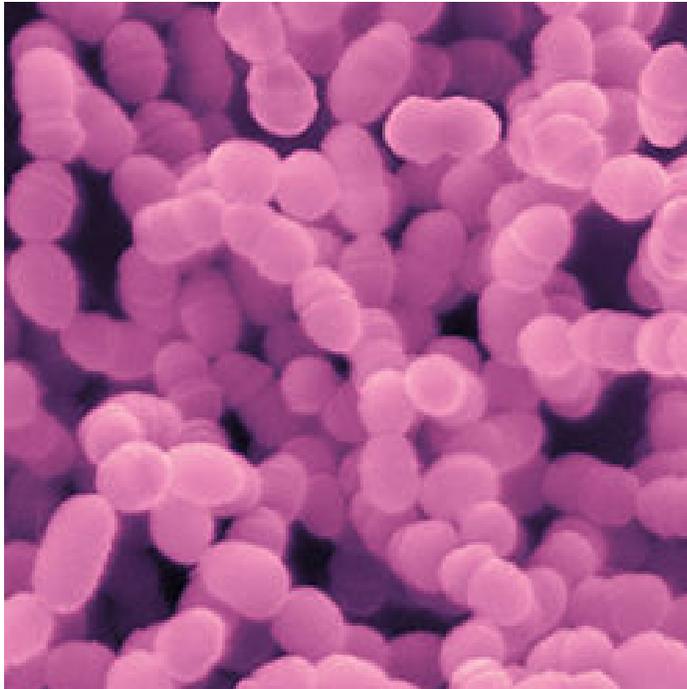


Figura: *S. mutans* (imagem de microscopia eletrônica).



Figura: *S. Salivarius* (imagem de microscopia eletrônica).

Retenção não adesiva: dá-se pela retenção mecânica das bactérias em superfícies como fóssulas, fissuras, lesões cariosas, sulco gengival, bolsas periodontais. Chegam até essa região por veículos como ar, água e alimentos.

CARACTERÍSTICAS E RELAÇÕES ESTABELECIDAS ENTRE MICRO-ORGANISMOS

Dentro de uma microbiota composta por várias espécies, ocorrem diversos tipos de interações microbianas, considerando-se as diferentes fisiologias de cada micro-organismo. A anfibiote (relação estabele-

cida entre micro-organismos em um determinado meio) pode ocorrer de maneira simbiótica (relação cooperativa) ou antibiótica (relação antagônica).

Simbiose: relação cooperativa, onde há associação de micro-organismos com benefício mútuo. Exemplo: *Streptococcus* produzem ácido láctico, consumido pela *Veillonella*, que mantém o pH estável, necessário para o crescimento dos *Streptococcus*.

Antibiose: relação antagônica, onde a presença de um micro-organismo inibe a do outro. Exemplo: *Streptococcus mutans* produz mutacinas que inibem bactérias Gram-positivas.

Anfibiose: associação entre micro-organismos e hospedeiro, que pode ocorrer ora como simbiose (benéfica, mútua e estável) e ora como antibiose (prejudicial e instável).

A microbiota da cavidade oral varia de indivíduo para indivíduo, e até mesmo no mesmo indivíduo devido a oscilações sistêmicas. É necessário que haja um equilíbrio entre a microbiota bucal e os tecidos do hospedeiro para que tenhamos saúde. Caso ocorra um desequilíbrio, há necessidade de uma abordagem cuidadosa, relacionada à orientação da dieta, melhorias de higiene bucal, uso de eliminadores de bactérias e modificação de habitats.

Quanto à atividade funcional, os micro-organismos podem apresentar certas características como:

- **Acidogênicos:** capacidade de produção de ácido a partir de um substrato. Todos os micro-organismos acidogênicos são também acidúricos. Exemplo: *Lactobacillus* e *Streptococcus*.

- **Acidúricos:** capacidade de sobrevivência em meios com o pH baixo. Exemplos: *Lactobacillus*, *Streptococcus* e Leveduras.
- **Proteolíticos:** capacidade de degradação de proteínas. Exemplo: *Prevotella* e certos *Streptococcus*.
- **Sacarolíticos:** capacidade de degradação de açúcares. Exemplo: certos *Streptococcus*.

Principais micro-organismos encontrados na cavidade bucal

Os micro-organismos mais prevalentes encontrados na cavidade bucal são os cocos Gram-positivos (sendo os *Streptococcus* os mais prevalentes). Possuem as características de serem anaeróbios facultativos. Compreendem cerca de 18 espécies na cavidade bucal. São diferenciados em ágar Mitis-Salivarius. Apresentam-se na forma esférica e são dispostos em cadeia.

Cocos gram-positivos:

- *Streptococcus salivarius*: são um dos primeiros colonizadores da cavidade oral. São colonizadores permanentes. Colonizam tecidos moles e possuem baixa cariogenicidade.

- *Streptococcus sanguis*: é a espécie mais isolada do biofilme. Quando presente no sangue esta espécie indica a presença de endocardite bacteriana subaguda, mas possui baixa virulência na cavidade bucal. São colonizadores de tecidos duros.
- *Streptococcus mutans*: são um complexo de espécies com o fenótipo em comum (classificação em 7 subespécies, sendo *S. mutans* e *S. sobrinus* isolados em humanos). Altamente associados com o consumo de uma dieta rica em sacarose e higiene oral deficiente, sendo associados com a presença da doença cárie. São colonizadores da superfície dos dentes. Produzem PEC (polissacarídeos extracelulares a partir de sacarose), que auxiliam nos mecanismos de adesão e polissacarídeos intracelulares-PIC (a partir de carboidratos fermentáveis). Alguns fermentam manitol e sorbitol, mas nenhum o xilitol. Formam colônias elevadas, irregulares, imersas em glicanas, azuladas e firmes.

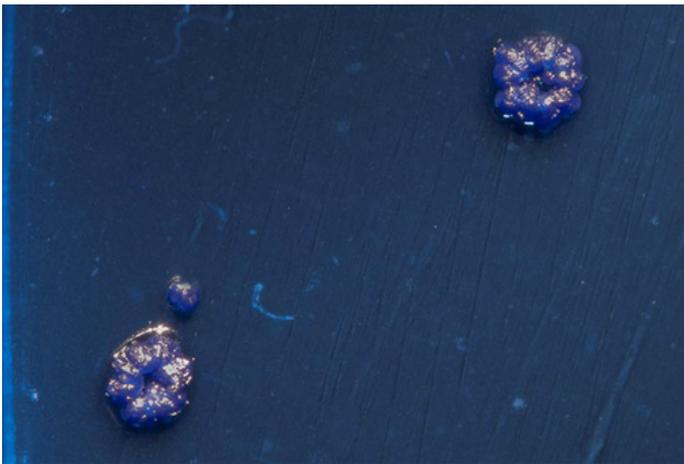


Figura: Colônias de *S. mutans* cultivadas em ágar Mitis-Salivarius. Fonte: Autores.

- *Streptococcus mitis*: forma pequenas colônias puntiformes. É produtor de polímero bacteriano extracelular (PEC) em pequena quantidade, mas possui baixa cariogenicidade. Coloniza vários locais da cavidade bucal.

Cocos gram-negativos:

- *Neisseria*: anaeróbios, vivem isolados ou aos pares. Várias espécies colonizam em baixas concentrações as mucosas do trato respiratório superior e da cavidade oral, incluindo o dorso da língua.
- *Veillonella*: são anaeróbios estritos e vivem em grandes massas. Encontrados no biofilme supragengival, nas regiões mais internas. Caracterizam-se por apresentar a forma de cocos dispostos em pares. Fazem parte da microbiota normal da cavidade bucal, cólon e vagina. Em algumas situações, comportam-se como patógenos oportunistas que produzem abscessos em amígdalas, cérebro e infecções mistas causadas por anaeróbios. Têm sido isoladas na saliva e língua na frequência de 5-10% dos casos, e no biofilme bucal em 28% (BRICENO; PARDI; PERRONE, 2008).

Bastonetes gram-positivos:

- *Lactobacillus*: fermentadores de carboidratos. São acidogênicos e acidúricos e podem ser homofermentativos (produzem exclusivamente ácido láctico) e heterofermentativos (produzem outros ácidos orgânicos além do ácido láctico, como etanol e CO₂). São anaeróbios

facultativos e associados à cárie devido a sua propriedade fermentadora de carboidratos e de sua presença em dentina cariada. Sua colonização primária se dá somente em áreas retentivas do dente.

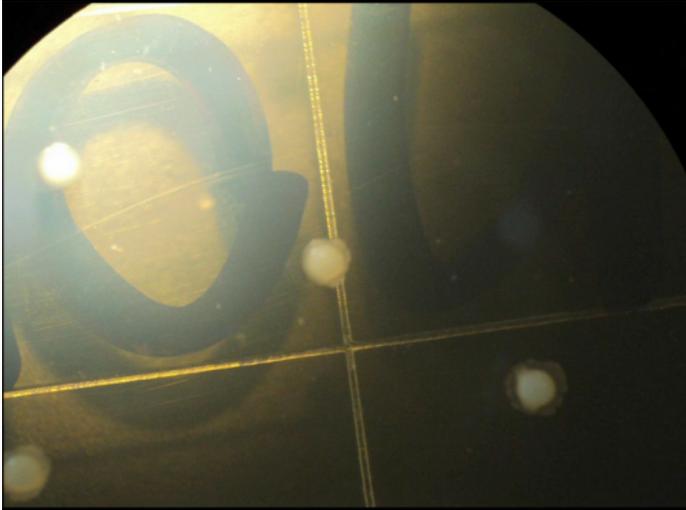


Figura: Colônias de *Lactobacillus* cultivadas em ágar Rogosa. Fonte: Autores.

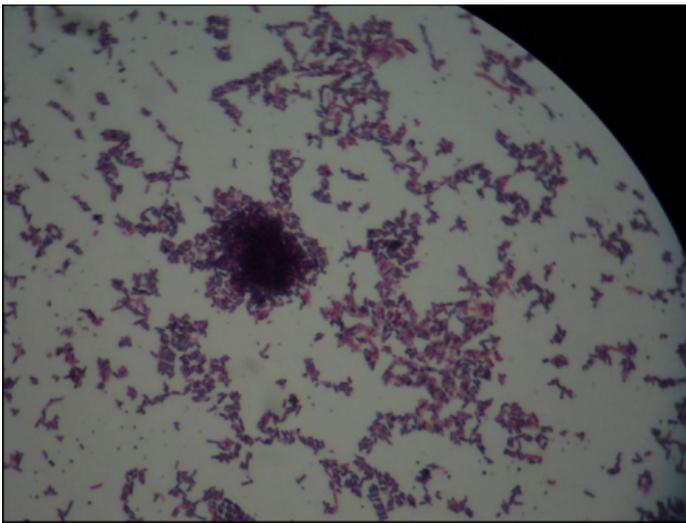


Figura: Imagem de microscopia óptica de *Lactobacillus* após a Coloração de Gram. Fonte: Autores.

- *Actinomyces*: São colonizadores primários do biofilme supra-gengival. Tem a forma de bastonetes curtos e filamentosos. São anaeróbios facultativos que se desenvolvem melhor na presença de CO₂. Associados à cárie de superfície radicular, doença periodontal, formação de abscessos na mucosa oral, na língua, na face e também a doença pulmonar.

Bastonetes Gram-negativos:

- *Fusobacterium*: São anaeróbios estritos que degradam proteínas. Possuem extremidades afiladas, conferindo-lhes a forma de fuso (bacilos largos fusiformes). As células são pleomórficas, não formam esporos e são imóveis. São encontrados no sulco gengival, nos tratos intestinal, genital e respiratório humanos. Podem causar lesões purulentas graves. Apresentam um importante papel na formação do biofilme dentário, sendo o agente de união entre colonizadores iniciais e tardios. Sua patogenicidade está associada à presença de fímbrias, lipopolissacarídeos, à produção de fatores solúveis inibidores da quimiotaxia de polimorfonucleares e à produção de metabólitos que se comportam como compostos tóxicos para os tecidos (GUILARTE; PERRONE, 2005).

- *Bacteroides*: Bacilos Gram-negativos pleomórficos. Geralmente são anaeróbios e imóveis (apenas duas espécies apresentam mobilidade). São encontrados no sulco gengival humano, trato intestinal de humanos e animais e infecções purulentas tanto de seres humanos como de animais. A espécie típica é o *Bacteroides fragilis*, não sendo uma espécie bucal. *B. forsythus* está frequentemente associado à periodontite refratária. Ao que parece, sua virulência está

relacionada com a produção de neuraminidases e enzimas tripsínicas com especificidade sobre proteínas com resíduos de arginina (TANNER *et al.*, 1986).

Espiroquetas:

- *Treponema*: encontrado no fundo de bolsas periodontais. São anaeróbios estritos e possuem flagelo. Estudo realizado por Rôças *et al* (2000) encontrou a presença de *T. denticola* associado às infecções endodônticas através do método PCR.

Bacilos gram-negativos móveis vibrinóides:

- *Campylobacter*: microaerófilos (crescem melhor com 5% de O₂). São encontrados no sulco gengival de pacientes com gengivite e periodontite juvenil localizada.

Fungos:

- *Cândida*: Compreende aproximadamente 150 espécies de leveduras não produtoras de endosporos. A espécie típica é a *Cândida albicans*, um fungo dimórfico que, na forma de levedura, apresenta células globosas, Gram-positivas, ovaladas ou alongadas. Quando há a presença de micélio, este se apresenta como pseudo-hifas ou hifas verdadeiras, que se alongam a partir das leveduras. Possui a capacidade de fermentar glicose e maltose, e geralmente não fermenta a sacarose. Há indícios de que altas contagens do fungo na

cavidade bucal podem estar associadas com a presença de cárie dentária. É aeróbia, no entanto, cresce em condições de anaerobiose. O dorso da língua é o reservatório primário do fungo, não estando uniformemente distribuído pela cavidade bucal. O restante da mucosa, os dentes, a placa bacteriana e a saliva são colonizadas secundariamente pelo fungo. Superfícies acrílicas, principalmente a de próteses totais, pré-dispõem o aumento do número de *Cândida albicans*, pois o fungo coloniza mais intensamente esta superfície do que a mucosa palatina. Outras próteses e o uso de aparelhos ortodônticos também favorecem o desenvolvimento deste fungo na cavidade bucal. Muitos investigadores têm isolado *Cândida albicans* na cavidade bucal de 30 a 50% da população de indivíduos saudáveis (MATA DE HENNING; PERRONE, 2000).

REFERÊNCIAS

- BRICENO, C.; ELSI; PARDI, C.; GERMÁN; PERRONE, C.; MARIANELLA. Genero Veillonella en cavidad bucal, nuevas especies reportadas. **Acta odontol. venez.**, Caracas, v. 46, n. 3, 2008.
- GUILARTE, C.; PERRONE, M. Bacterias Periodontopatógenas: Bacilos Anaerobios gran negativos como agentes Etiológicos de la Enfermedad Periodontal. **Acta odontol. venez.**, Caracas, v. 43, n. 2, 2005.
- INTRA, J. B. G. et al. Correlação entre o índice CPOD e níveis de Streptococcus mutans na saliva de mães e filhos. **Int. RFO UPF**, v. 11, n. 2, p. 16-20, 2006.
- MARSH P.; MARTIN, M. V. **Microbiologia oral**. São Paulo: Santos, 2005.
- MARTINS, Clélia Aparecida de Paiva; KOGA-ITO, Cristiane Yumi; JORGE, Antonio Olavo Cardoso. Presence of Staphylococcus spp. and Candida spp. in the human oral cavity. **Braz. J. Microbiol.**, São Paulo, v. 33, n. 3, p. 236-240, 2002.

MATA DE HENNING, M.; PERRONE, M. Factores determinantes de patogenicidad en relación a la ecología de *Candida Albicans* en cavidad bucal: Revisión Bibliográfica. **Acta odontol. venez.**, Caracas, v. 39, n. 2, 2001.

ROCAS, Isabela das Neves et al. Detecção de *Treponema denticola* em casos de abscesso perirradicular agudo. **Pesqui. Odontol. Bras.**, São Paulo, v. 14, n. 3, p. 209-212, 2000.

TANNER, A.; LISGARTEN, M.; EBERSOLE, J.; STRZEMPKO, M. *Bacteroides forsythus* sp. nov., a Slow Growing, Fusiform *Bacteroides* sp. from the Human Oral Cavity. **Int. J.Syst. Bacteriol.**, 36(2), p. 213-221, 1986.

THYLSTRUP, A.; FEJERSKOV, O. Ecología oral e a cárie dentária. In:_____. **Cariologia clínica**. 3. ed. São Paulo: Liv. Santos, 2001. Cap. 3, p. 45-69.

UZEDA, M. **Microbiologia oral**. Medsi, 2002.

IMAGENS

Site. Disponível em: <<http://2.bp.blogspot.com/fAhfFIRQ/T5hcz7Jhryl/AAAAAAAAAAw/WZaLP0V9NiM/s1600/4.jpeg>>.

Site. Disponível em: <<http://media-3.web.britannica.com/eb-media/42/128842-004-73342DD8.jpg>>.

Site. Disponível em: <[https://s5.static.brasilescuela.uol.com.br/be/e/proteinas+transmembrana\(1\).png](https://s5.static.brasilescuela.uol.com.br/be/e/proteinas+transmembrana(1).png)>.

Site. Disponível em: <<http://www.ebah.com.br/content/ABAAABaEMAE/ecossistema-bucal>>.

Site. Disponível em: <<https://images.app.goo.gl/SADknC9rwaPeC8xp9>>

Site. Disponível em: <<https://images.app.goo.gl/B9hDVsv8Hd8B6zEd8>>

Site. Disponível em: <http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/artnov10macro/Dina-Yang/_DYY7604.jpg>.

Site. Disponível em: <<https://microbewiki.kenyon.edu/images/thumb/5/52/26643C.jpg/250px-26643C.jpg>>.

3

Saliva

Sandra Liana Henz
Rodrigo Alex Arthur
Lina Naomi Hashizume

A saliva é um fluido que banha a cavidade bucal, sendo produzido pelas glândulas salivares maiores e menores. A saliva é um fluido variável, pois vários fatores influenciam a quantidade que é produzida em cada indivíduo. O volume total produzido é em média de 0,5 a 1,5l por dia. A **saliva primária** é aquela produzida nos ácinos, no interior das células acinares, sendo isotônica e com uma composição semelhante ao plasma. Ao passar pelos ductos a saliva primária vai sofrendo trocas iônicas, principalmente reabsorção de Na^+ e Cl^- (e excreção de K^+ e HCO_3^-), e ao chegar na cavidade bucal se encontra hipotônica em relação ao plasma. Na cavidade bucal, a saliva irá se misturar com as células bacterianas, células epiteliais descamadas e as secreções gengivais (fluido crevicular), dando origem à chamada **saliva total**.

A saliva é produzida pelas glândulas salivares maiores e menores.

Glândulas salivares:

Maiores: parótidas, submandibulares e sublinguais.

Menores: em várias partes da mucosa oral, exceto na gengiva e porção anterior do palato duro.

Adenômero: unidade secretora (produção) e ductos (excreção).

Quanto à natureza das secreções:

Serosas: secreção aquosa fina e rica em enzimas. Ex.: Parótida.

Mucosas: secreção viscosa e rica em mucinas (glicoproteína importante em várias funções). Ex: Glândulas Salivares menores do palato mole.

Mista: o produto da secreção varia de espesso a fino. Ex.: Submandibular e sublingual.

SECREÇÃO E EXCREÇÃO DE SALIVA

Porção Secretora - ácinos: formados pelas células serosas ou mucosas, ou ambas (sero-mucosas). Compõe cerca de 80% das glândulas salivares. São formados por células piramidais, responsáveis pela produção da saliva primária.

Células Serosas: são arrançadas de uma forma esférica. Produzem uma secreção fluida e rica em enzimas. São encontradas na glândula parótida.

Células Mucosas: tendem a ter um arranjo tubular, produzem uma secreção viscosa e rica em mucina (carboidrato). São encontradas nas glândulas salivares menores do palato mole.

Células Mistas: associação de arranjos de túbulos com uma meia lua serosa. Produzem uma secreção que varia de espessa a fluida. São encontradas nas glândulas sublingual e submandibular.

Porção Excretora: formada pelos ductos, que compõem cerca de 20% das glândulas salivares. São responsáveis por conduzir a saliva primária e por promover diversas trocas iônicas.

Ducto Intercalar: formado por epitélio cuboide. Possui um pequeno lúmen central. É responsável por conduzir a saliva.

Ducto Estriado: formado por células com microvilosidades e ricas em mitocôndrias. Promovem trocas iônicas, tornando a saliva hipotônica.

Ducto Excretor: formado por diversos estratos de células. Pode possuir células caliciformes, que secretam muco. Também pode alterar a composição dos eletrólitos como o ducto estriado. É responsável por conduzir a saliva até a cavidade oral.

Glândulas Salivares Maiores: Responsáveis pela produção de 90% da saliva.

Glândula Parótida: localiza-se na região anterior ao ouvido. Seu ducto, chamado de ducto de Stenon, emerge sobre a superfície do masseter e sai, na cavidade oral, na altura do segundo molar superior. Produz uma secreção serosa e predomina na salivação estimulada.

Glândula Submandibular: localiza-se no assoalho da boca. Possui o ducto de Wharton, que sai na cavidade oral nas carúnculas sublinguais, abaixo da língua. Produz uma secreção mista, com predomínio seroso. Predomina na salivação não estimulada.

Glândula Sublingual: grupo de glândulas localizadas abaixo da membrana mucosa sublingual. Possui o ducto de Bartholin, que abre na cavidade oral próximo ao freio lingual. Produz uma secreção mista, com predomínio mucoso.

Glândulas Salivares Menores: responsáveis pela produção de 10% da saliva. São as glândulas labiais, linguais, palatinas, glossopalatinas e retromolares. Produzem uma secreção mucosa, exceto pela glândula de Von Ebner, que produz uma secreção serosa.

OBS: Glândula de Von Ebner – São glândulas presentes abaixo das papilas foliadas e circunvaladas da língua, são serosas a fim de promover a limpeza das papilas e dos botões gustativos e dos sulcos e mucosa oral.

FORMAÇÃO DA SALIVA:

Saliva Primária: produzida no interior de célula secretora. Primeiramente, há transporte ativo com saída de potássio e entrada de cloro. Logo após, pelo aumento da negatividade no interior da célula, ocorre a entrada de íons sódio. Forma-se então um meio mais concentrado no interior da célula e menos concentrado no lúmen. Por isso, há saída de sais e entrada de água. Assim, forma-se a saliva primária, isotônica em relação ao plasma, que vai em direção aos ductos.

Saliva Propriamente Dita: produzida pela modificação da saliva primária nos ductos. Ocorre entrada de íons de sódio e cloro para o interior da célula do ducto, e saída de íons potássio e bicarbonato em direção ao lúmen. Forma-se uma saliva hipotônica em relação ao plasma.

COMPOSIÇÃO DA SALIVA: composta por 99% água e cerca de 1% de moléculas orgânicas e inorgânicas, sendo uma mistura complexa de todos eletrólitos encontrados no corpo. Possui centenas de macromoléculas que se juntam com produtos bacterianos, muco, etc. Sua pro-

dução é influenciada por fatores fisiológicos como o fluxo, duração do estímulo (alteração na concentração de proteínas), ritmo diurno (observa-se o dobro de íons Ca e PO_4) e tipo de estímulo.

A saliva não estimulada contém mais potássio, enquanto que a saliva estimulada contém mais sódio, cloro e bicarbonato. A saliva estimulada tem maior capacidade tampão, pois há mais íons bicarbonato na saliva, que não foram totalmente reabsorvidos nos ductos. Desta forma, ela ajuda a prevenir a dissolução do esmalte dentário.

Componentes Inorgânicos:

- **Cálcio:** encontrado 50% na forma iônica e o restante na forma de compostos moleculares. Presente em maior quantidade na secreção da glândula sublingual.
- **Fosfato:** encontrado 90% na forma iônica.

A estrutura dentária é formada por cristais de hidroxiapatita, que contém fosfato e cálcio. Por tal motivo, esses íons estão envolvidos no processo de desmineralização e remineralização. Em um pH em torno de 7, é pouco provável que ocorra dissolução dos cristais de hidroxiapatita. Quando há uma diminuição do pH, predomina o processo de desmineralização, devido à saída de cálcio e fosfato do dente. Quando há um aumento do pH, há a reposição destes minerais na superfície dentária.

- **Bicarbonato:** participa da capacidade-tampão da saliva. É o principal sistema tamponante presente na saliva. Atua contra os ácidos produzidos pelas bactérias, aumentando o pH da saliva. Presente em baixa quantidade na saliva não estimulada.

- **Flúor:** participa do processo de des/remineralização dentária, visto que faz com que o pH crítico para desmineralização se torne mais baixo. Assim, há necessidade de uma grande queda para que ocorra o processo de desmineralização da estrutura dentária.
- **Outros Íons:** tiocianato, sódio, potássio, chumbo, cádmio e cobre.

Componentes Orgânicos:

- **Mucinas:** são glicoproteínas com função protetora, visto que formam uma pseudomembrana sobre as superfícies. São moléculas hidrofílicas com alta elasticidade e adesividade, mas baixa solubilidade. São importantes para a lubrificação da cavidade bucal, para a formação da película adquirida, para impedir a adesão de bactérias (bloqueia as adesinas) e para aglutinar bactérias.
- **Aglutininas:** são proteínas antimicrobianas capazes de interagir com bactérias não aderidas, promovendo sua aglutinação em grandes agregados, que serão mais facilmente eliminados pela saliva e deglutição.
- **Amilase:** possui função digestiva, hidrolisando o amido. É uma molécula que modula a adesão de bactérias.
- **Lipase:** possui função digestiva, quebrando lipídios.
- **Lisozima ou Muramidase:** é secretada pelas glândulas salivares maiores e menores, pelo fluido crevicular e leucócitos salivares. Possui um efeito bactericida, visto que hidrolisa o peptidoglicano

da parede das bactérias e promove sua morte. Além disso, impede a ingestão de glicose pelas bactérias e promove agregação de bactérias, auxiliando na sua eliminação.

- **Lactoferrina:** é uma glicoproteína não enzimática, secretada pelas glândulas salivares maiores e menores. Os leucócitos também liberam lactoferrina na saliva. Tem alta afinidade pelo ferro, impedindo a sobrevivência de bactérias que necessitem dele para seu metabolismo. Impede e retarda o crescimento bacteriano, pois se liga ao ferro impedindo que esse metal seja utilizado por micro-organismos patogênicos, tendo assim um efeito bacteriostático. Quando não está ligada ao ferro, pode se ligar a certas bactérias como *S. mutans* e aglutiná-las, tendo assim um efeito bactericida. Além disso possui também atividade fungicida, antiviral e anti-inflamatória.

- **Esterina:** peptídeo com altos níveis de prolina, tirosina e fosfoproteína, responsáveis por manter os altos níveis de cálcio e fosfato na saliva, evitando a desmineralização.

- **Proteínas Ricas em Prolina (PRPs):** proteínas presentes na película adquirida, são protetoras da superfície do esmalte e promovem adesão seletiva de bactérias. Impedem a perda de cálcio e fosfato da superfície dentária.

- **Histatinas:** favorecem a remineralização do dente. Também inibem o crescimento de leveduras.

- **Cistatinas:** possuem atividade antibacteriana e antiviral. Promovem a supersaturação da saliva, impedindo a precipitação de fosfato e cálcio.

- **Sistema Peroxidase:** O Sistema peroxidase compreende duas enzimas a **Peroxidase Salivar** ou **Sialoperoxidase (SP)**, produzida e secretada por células das glândulas salivares, e a **Mieloperoxidase (MP)**, que é produzida pelos leucócitos. A sialoperoxidase catalisa a oxidação do tiocianato em hipotiocianato. Suas duas principais funções biológicas são: atividade antimicrobiana e proteção das proteínas e células do hospedeiro contra a toxicidade do H_2O_2 , que é originado de bactérias aeróbicas orais. Dependendo do pH (mais efetiva em pH baixo) e da concentração de hipocianato, o sistema peroxidase é efetivo contra vários micro-organismos, tais como *S. mutans*, lactobacilos, fungos e mesmo alguns vírus.
- **Imunoglobulinas:** possuem ação antimicrobiana, inibindo o crescimento e favorecendo a aglutinação de bactérias.

CARACTERÍSTICAS E FUNÇÕES DA SALIVA:

A função digestiva da saliva humana é mínima, pois a única enzima digestiva importante presente é a amilase salivar. Entretanto, a função da saliva como lubrificante, facilitada pelo seu conteúdo de mucina, é importante para a criação do bolo, para a deglutição e para a fala. Como solvente para substâncias com propriedades de sabor, a saliva também influencia na sua percepção, funcionando como referência básica, por exemplo, para o sal. A saliva é importante na defesa contra micro-organismos virulentos que invadem a cavidade oral, onde as substâncias antibacterianas de origem salivar mantém o equilíbrio ecológico. Ela

protege a cavidade oral contra danos causados por alterações do pH devido à sua capacidade tampão. Além disso, a saliva desempenha várias outras funções na cavidade bucal como:

Autolimpeza: a secreção salivar está associada com a deglutição (movimento dos lábios e da língua). Solubiliza e remove substâncias e bactérias da cavidade oral.

Digestão e Gostação: promove a preparação do bolo alimentar, solubilizando os alimentos e atuando nos lipídios e proteínas. Também propicia a interação com os receptores gustativos, favorecendo a percepção dos sabores.

Lubrificação: fornece uma barreira contra ressecamento e descaiação, através da presença das mucinas que possui propriedades viscoelásticas. Ao promover lubrificação, auxilia na fonação, na deglutição e na mastigação. Previne a atrição (desgaste mecânico entre as estruturas dentais), a abrasão (desgaste mecânico por uma força externa, como por escovação) e erosão (desgaste químico, como por ácidos).

Manutenção do pH: possui capacidade tampão (desempenhada pelos íons bicarbonato, fosfato e algumas proteínas), que depende do fluxo salivar, mas que corrige as mudanças do pH causadas por variações nas concentrações de ácido ou base provenientes da fermentação de alimentos. Assim, previne a desmineralização do dente.

Na saliva estimulada, há presença de maior quantidade de bicarbonato, enquanto na não estimulada encontramos maior quantidade de potássio. A presença de bicarbonato promove uma neutralização do íon H^+ , formando água e gás carbônico.

Remineralização: a presença de proteínas (como estaterina e prolina) mantém a saliva supersaturada, estabilizando os íons cálcio e potássio na superfície do dente. Quando encontramos um pH baixo, considerado crítico para que ocorra a desmineralização, a ação conjunta do flúor também é importante.

Antimicrobiana: presença de proteínas, enzimas e peptídeos que promovem a morte, a agregação ou o aumento das bactérias na cavidade oral. Presença também de imunoglobulinas que neutralizam vírus, fungos e bactérias.

Formação da Película Adquirida: A saliva propicia a formação da película adquirida, pois é a partir de seus componentes que a mesma será formada.

Reparo Tecidual: presença de fatores de crescimento, que permitem o crescimento e a diferenciação de tecidos, bem como a cicatrização de feridas e outros efeitos benéficos.



FLUXO SALIVAR:

Produção de Saliva: O volume de saliva produzido varia de 0,5 -1,5L por dia.

Salivação Não Estimulada (glândula salivar em repouso): A produção é de 25% da parótida, 60% submandibular, 7-8% sublingual, 7-8% glândulas menores.

Salivação Estimulada: A produção de saliva aumenta 5x, sendo a glândula parótida com a maior produção. A produção é de 50% da parótida, 25% submandibular, 7-8% sublingual, 7-8% glândulas menores.

QUANTIDADE DE SECREÇÃO SALIVAR:

Testes Salivares

Indicações de medição do fluxo salivar:

Paciente novo: diagnóstico de cárie ativo, como parte dos exames iniciais.

Paciente com suspeita de hipossalivação, causada pela Síndrome de Sjögren ou por irradiações ou uso de medicamentos.

Avaliação do tratamento profilático e terapêutico da cárie, para obter informações de como o procedimento geral afetou a saúde bucal. Também é possível medir a capacidade tampão e os níveis salivares de *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus* spp e fungos.

Medição do fluxo:

Coleta de **saliva estimulada**: mastigar 1g de parafina por 1 min; remover toda a saliva por expectorações ou deglutição; mastigar por mais 5 min; expectorar a saliva em cilindro graduado. Os valores são expressos em ml/min. Obs: jejum de 1h antes da coleta.

Saliva não estimulada: é recolhida simplesmente salivando passivamente dentro de um cilindro. A saliva não pode ser cuspidada. É um indicador menos confiável de fluxo de saliva reduzido e hipossalivação, do que a estimulada. Em pacientes com suspeita de hipossalivação, a amostragem deve ser de 15 min.

Valores de fluxo salivar em coletas feitas em repouso e sob estímulo:

	Hipossalivação	Baixo	Normal
Repouso	< 0,1 ml/min	0,1 - 0,25 ml/min	0,25 - 0,35 ml/min
Estimulada	< 0,7 ml/min	0,7 - 1,0 ml/min	1 - 3 ml/min

Pacientes saudáveis: devem exceder 0,1ml/min (TENOVUO, 1997)

Parece que os indivíduos com taxas de fluxo anormais de saliva não estimulada (<0,2 ml/min) são um grupo que tem uma taxa de desmineralização elevada e um maior risco de desenvolver cárie (TENOVUO, 1997).

São considerados valores normais de fluxo:

Saliva Não Estimulada $\geq 0,1\text{mL/mim}$

Saliva Estimulada $\geq 0,7\text{ mL/mim}$

Mudanças hormonais também podem afetar o fluxo e a composição da saliva humana. Homens têm índices maiores que as mulheres, mas é devido ao tamanho das glândulas.

Quanto mais o fluxo salivar é estimulado, mais perto a concentração de bicarbonato salivar estará da concentração do plasma. Logo, o pH da saliva pode ser mais baixo que 6 na saliva não estimulada, aumentando exponencialmente o pH para próximo de 8 nos índices de fluxo muito altos. A saliva primária produzida nos ácinos vai sofrendo modificações ao passar pelo sistema de ductos até sua excreção na cavidade bucal. Abaixo podemos ver a concentração de alguns íons presentes na saliva em diferentes situações:

Saliva primária (no ácino)

Na ⁺	K ⁺	Cl ⁻	HCO ⁻³
145	4	100	24

Na cavidade oral:

Saliva não estimulada (mM)

Na ⁺	K ⁺	Cl ⁻	HCO ⁻³
2	27	23	2

Saliva estimulada (mM)

Na ⁺	K ⁺	Cl ⁻	HCO ⁻³
47	20	40	25

(Adaptado de Bardow *et al.*, 2008)

A composição final da saliva secretada na boca depende fortemente da taxa de fluxo salivar. O pH da saliva depende muito da taxa de secreção, em indivíduos saudáveis varia entre 7,0 e 7,5.

O pH crítico ocorre quando o produto de atividade iônica é igual ao produto de solubilidade da hidroxiapatita. A solução está saturada e não ocorre remineralização ou desmineralização.

Capacidade tampão da saliva e controle do pH:

Após a ingestão de alimentos que contém açúcar, o pH da placa cai e permanece reduzido até que o açúcar seja removido da boca e os ácidos produzidos pelas bactérias sejam tamponados. A magnitude da queda no pH é determinada pela quantidade de ácido produzido pelas bactérias e pela capacidade tampão da saliva, já que a desmineralização dentária pode ocorrer quando o pH real fica abaixo do pH crítico. Se a adição de grandes quantidades de ácido resulta numa pequena mudança de pH, a capacidade tampão é alta e vice-versa (FEJERSKOV; KIDD, 2011).

Na saliva estimulada, o fluxo é maior e não há tempo de absorver todo bicarbonato, aumentando a capacidade tampão.

CAPACIDADE TAMPÃO: é a capacidade da saliva em neutralizar ácidos.

	pH FINAL
ALTA CAPACIDADE TAMPÃO	entre 5 e 7 - ≥ 4
BAIXA CAPACIDADE TAMPÃO	< 4

(Adaptado de JORGE, 2007)

Testes Microbiológicos

MICROBIOLÓGICO: presença de *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus* spp e Fungos.

	Altas contagens bacterianas
STREPTOCOCCUS MUTANS	≥ 10 ⁶ UFC/mL
LACTOBACILLUS	≥ 10 ⁵ UFC/mL
FUNGOS	≥ 400 UFC/mL

(Adaptado de JORGE, 2007)

DISFUNÇÃO SALIVAR:

Condições prejudiciais:

Doenças autoimunes – Síndrome de Sjögren

Desordem autoimune na qual as células imunes atacam e destroem as glândulas exócrinas que produzem lágrimas e saliva. O paciente tem baixa qualidade de vida. As mucosas ficam ressecadas.

Desidratação

Provoca diarreia, vômitos e poliúria. Uma vez que a saliva é 99% água, quando falta água no corpo, falta água na saliva, e, portando, ocorre a desidratação da cavidade bucal.

Radioterapia

Ocorre atrofia de ácinos, por fibrose ou substituição por tecido adiposo. O ácino seroso é o mais sensível. A saliva fica espessa, os eletrólitos alterados, o pH diminuído e a secreção de imunoglobulinas diminuída.

Idade

Hipótese de Scott sobre o que acontece com a saliva em idosos: Glândulas salivares de adultos jovens contêm uma reserva em excesso de tecido acinar, além do necessário. É esta reserva de células epiteliais secretoras que vai ser substituída no futuro. Esta perda de células epiteliais secretoras deixa o indivíduo idoso mais vulnerável às condições que afetam a atividade secretora.

Um indivíduo idoso, se saudável, perderia parte do tecido acinar. Assim, seria capaz de manter um fluido adequado por causa da reserva de tecido excedente. Se sofrer um stress adicional nas glândulas salivares, por medicamento, radioterapia ou doença autoimune, as glândulas salivares não serão capazes de responder adequadamente porque não há tecido suficiente.

Medicamentos

Antidepressivos, hipnóticos, sedativos, tranquilizantes, anti-histamínicos, reguladores de apetite, anti-hipertensivos, relaxantes musculares, diuréticos, entre outros podem afetar a produção de saliva.

SINAIS E SINTOMAS DA DISFUNÇÃO SALIVAR

Sinais: aquilo que o profissional da saúde observa

Sintomas: aquilo que o paciente relata para o profissional

Avaliação clínica:

O profissional deve levar em conta queixas do paciente, como secura da boca e dor, sensação de queimação da mucosa oral e língua, dificuldade na fala, dificuldade de mastigar alimentos secos, comprometimento e distúrbios do paladar, dificuldade no uso de próteses removíveis, lábios secos, refluxo ácido e náuseas, sensação de sede. Os sintomas orais são muitas vezes associados a outros sintomas como pele seca, nariz seco, olhos secos, mucosa vaginal seca, garganta seca, tosse seca. Essas queixas podem indicar que o paciente está com hipossalivação.

Sinais:

Ressecamento da mucosa: mucosa oral seca, envidraçada e vermelha, lobulação e fissuras da parte dorsal da língua, atrofia das papilas filiformes que são responsáveis pelo tato, lábios secos, queilite angular, aumento da experiência de cárie pelo aumento de *S.mutans*, candidíase oral.

Sintomas:

Secura da boca (o mais comum), halitose, sensação de queimadura bucal, perda de paladar, dificuldade na deglutição.

Diagnóstico:

Baseado na história médica/odontológica, sinais, sintomas e exame clínico ou investigações especiais (fluxo salivar, testes laboratoriais, sialografia, biópsia).

Conduta Clínica:

Considerações dietéticas e ambientais, preventivas – medidas de cuidados dentários, estimulantes de saliva e substitutos de saliva.

Considerações sobre dieta e ambiente

Dieta:

Evitar fármacos que podem produzir xerostomia, evitar alimentos secos e volumosos, alta ingestão de líquidos, evitar fumo, álcool e açúcar.

Meio Ambiente:

Manter a umidade do ar ideal no lar, usar vaselina para proteger os lábios.

Medidas bucais preventivas:

Verificar e ajustar próteses, orientação de higiene, uso de flúor e antissépticos bucais, uso de medicamentos antifúngicos (caso necessário).

Substitutos da Saliva:

Carboximetilcelulose de sódio: solução aquosa de 0,5% e géis hidratantes orais: OralBalance, Xero-Lube, Salivart, Optimoist entre outros.

Composição da saliva artificial (marca comercial Salivan):

Cada ml da solução contém:

Carmelose sódica **10 mg**

Veículo* q.s.p. 1 ml

*Veículo: sorbitol¹, cloreto de sódio, cloreto de potássio, cloreto de cálcio diidratado, cloreto de magnésio hexaidratado, fosfato ácido de potássio, metilparabeno, água purificada.

¹**Sorbitol:** Substituto da sacarose (adoçante com quatro calorias por grama).

Fonte: www.bulas.med.br



Estimulantes Salivares:

O uso de goma de mascar sem açúcar, gotas de limão ou hortelã são métodos conservadores que estimulam temporariamente o fluxo salivar em pacientes com hipossalivação por medicação ou com disfunção da glândula salivar. Mascar chicletes sem açúcar pode ser entendida como uma medida benéfica em certas ocasiões, visto que ocorre um aumento do fluxo salivar, acarretando em um aumento da capacidade tampão pelo íon bicarbonato. Com isso, ocorre um aumento do pH da saliva. Entretanto, é preciso estar atento aos possíveis efeitos adversos do uso abusivo de gomas de mascar para o organismo, e então avaliar se os benefícios superam os riscos.

SALIVA X DOENÇAS

A deficiência de saliva pode acarretar alguns problemas ou acelerar a ocorrência de outros, como por exemplo: cárie, erosão, doença periodontal e candidíase.

REFERÊNCIAS

BARDOW, A.; LAGERLÖF, F.; NAUNTOFTE, B., TENOVUO, J. The role of saliva. *In*: FEJERSKOV, Ole; KIDD, Edwina (Org.). **Dental caries: the disease and its clinical management**. Oxford: Wiley-Blackwell, 2008.

EDGAR, M.; DAWES, C.; O`MULLANE, D.; (Tradução Nilson D. Martello). **Saliva e Saúde Bucal- Composição, Funções e Efeitos Protetores**. 3 ed. São Paulo: Editora Santos, 2010. 145p:il.

FEJERSKOV, O. & KIDD, E. **Cárie dentária: A doença e seu tratamento clínico**. São Paulo: Editora Santos, 2013.

JORGE, A. O. C. **Microbiologia Bucal**. São Paulo: Santos, 2007.

NICOLAU, J. **Fundamentos de Bioquímica Oral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

O'BRIEN, P. J. Peroxidases. **Chem Biol Interact**, 129 (1-2), p. 113-39, 2000.

TENOVUO, J. Salivary parameters of relevance for assessing caries activity in individuals and populations. **Community Dent Oral Epidemiol**, 25, p. 82-6, 1997.

IMAGENS

Site. Disponível em: <<http://www.brindoavida.com.br/blog/wp-content/uploads/2011/09/25tg4A.jpg>>.

Site. Disponível em: <http://www.medvidabahia.com.br/app/config/580/Imagens/Produto/grd_184089.jpg>.

4

Película Adquirida

Sandra Liana Henz
Rodrigo Alex Arthur
Lina Naomi Hashizume

A película adquirida consiste em um filme orgânico, proteico, acelular e livre de bactérias formado sobre a superfície do dente, através da adsorção seletiva de macromoléculas presentes na saliva, sendo distinta do biofilme dental. Encontra-se presente não só nas superfícies do esmalte e dentina mas também sobre superfícies de restaurações e próteses (substratos sólidos). Não possui origem embriológica, e é a interface dente-biofilme-saliva (HANNIG; JOINER, 2006; LENDMANN *et al.*, 2000; SIQUEIRA *et al.*, 2007; HARA; ZERO, 2010). Dentre os principais componentes identificados, estão as proteínas e glicoproteínas. Ficou demonstrado que a hidroxiapatita possui um caráter anfótero, podendo ligar tanto cargas negativas quanto positivas. Os sítios de cálcio são responsáveis pelas ligações dos grupos ácidos e os fosfatos, pelos básicos (BERNARDI *et al.*, 1972).

COMPOSIÇÃO:

A película é formada principalmente por proteínas e glicoproteínas de origem salivar, principalmente proteínas ricas em prolina (PRPs), estaterinas e mucinas, mas também são encontrados carboidratos, lipídios neutros, fosfolipídios e glicolipídios (HANNIG; JOINER, 2006; HARA; ZERO, 2010). Os componentes orgânicos têm alta afinidade pela superfície do esmalte, haja vista a rapidez da formação após exposição da superfície à saliva. As proteínas precursoras da película são as primeiras proteínas salivares a serem adsorvidas sobre a superfície do esmalte dentário (histatina, estaterina, PRPs). Possui afinidade pela hidroxiapatita (afinidade por íons fosfato).

A película possui um papel modificador na cárie e erosão dentárias devido à sua permeabilidade seletiva, que restringe o transporte de íons para dentro e para fora dos tecidos. Ela altera a carga e a energia livre de superfície, aumentando a eficiência de adesão. Os primeiros a se aderirem são cocos, células epiteliais e leucócitos (grandes quantidades de micro-organismos podem ser carregadas para a superfície dos dentes por células epiteliais).

FORMAÇÃO:

A primeira fase de formação da película ocorre através da adsorção espontânea das proteínas da saliva na superfície dental. Quando em contato com a saliva, os íons cálcio dos cristais de hidroxiapatita tendem a se dissolver, e os íons fosfato restantes conferem carga negativa para esta superfície, que é então revestida por uma camada de carga positiva dos íons cálcio dissolvidos. Assim, essa superfície eletropositiva interage com as proteínas eletronegativas.

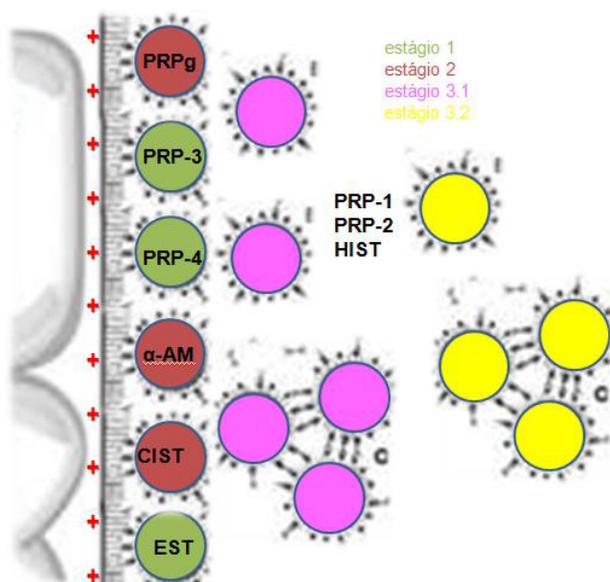
Segundo Otto (2011), a película se forma em quatro estágios:

Estágio 1 – Após as modificações iniciais, na fase seguinte as fosfoproteínas com alta afinidade PRP-3, PRP-4 e estaterina, capazes de reagir com os íons cálcio e fosfato do esmalte, adsorvem instantaneamente. Ocorrem interações iônicas, forças de van der Waals e ligações hidrofóbicas.

Estágio 2 – Ocorre uma interação mais lenta das proteínas α -amilase, PRPg, cistatina com a hidroxiapatita (LAMKIN *et al.*, 1996; HANNIG; JOINER, 2006).

Estágio 3 – Ocorre uma contínua adsorção de biopolímeros da saliva (ocorrendo interação entre as proteínas salivares e as proteínas precursoras da película primária), sendo esta uma fase mais complexa, de adsorção rápida, seguida de uma fase mais lenta. As proteínas que participam dessa última etapa são PRP-1, PRP-2 e histatina (LAMKIN *et al.*, 1996; HANNIG; JOINER, 2006). Estudos sugerem que essa fase não atinge seu auge em 2 horas, mostrando que a formação da película dental adquirida não se completa neste tempo (LAMKIN *et al.*, 1996; HANNIG; JOINER, 2006)

Estágio 4 – O equilíbrio ocorre próximo a 2 horas de formação da película e bactérias podem ser encontradas apenas após 4 horas (LENDMANN *et al.*, 2000; HANNIG; JOINER, 2006). Após a remoção química ou mecânica da película dental adquirida, esta volta a ser formada instantaneamente (HANNIG; JOINER 2006; HARA; ZERO, 2010).



Estágios de formação da Película Adquirida (OTTO, 2011).

ESPESSURA:

Varia de 0,1 a 1,0 milímetro.

Película Jovem: até duas horas de formação. Espessura de 200 a 500 nm. É um revestimento orgânico fino, desigual e incompleto.

Película Madura: após horas ou dias. Espessura de 500 a 1000 nm. É um revestimento mais denso, homogêneo e com aparência estrutural granular. Em cerca de 24h, ocorre um aumento de espessura e alterações morfológicas que caracterizam a total maturação da película. Sua remodelação estrutural se dá principalmente por ação da transglutaminase. Quanto maior o tempo de maturação, maior a capacidade protetora da película.

CARACTERÍSTICAS:

É um sistema dinâmico, que sofre remodelação contínua por processos químicos, modificação enzimática por proteínas adsorptivas e mudança da complexidade intermolecular pela adição de proteínas. Ocorrem processos contínuos de adsorção e dessorção. Na face palatina dos dentes anteriores superiores é mais fina. Já na face lingual dos dentes posteriores inferiores se encontra mais espessa. A diferença de espessura da película nas diferentes regiões se dá devido a diferença de fluxo salivar de cada região e também devido às diferentes forças de atrito entre as superfícies.

FUNÇÕES:

Positivas:

- **Processo de Des/Remineralização:** Evita a desmineralização e favorece a remineralização, possui permeabilidade seletiva, protegendo de ácidos (desmineralização). Permite um meio de troca de íons cálcio, fosfato e fluoreto (remineralização) e previne a formação de cálculo dentário (placa mineralizada pela precipitação de cálcio e fosfato). As proteínas presentes evitam a precipitação desses íons, coibindo a formação do cálculo. A presença de lipídeos retarda a difusão de ácidos provenientes da placa.
- **Lubrificação:** promove lubrificação dos dentes, protegendo o contato com dentes antagônicos, com tecidos moles e com alimentos abrasivos. Reduz o desgaste do esmalte e da dentina decorrente do uso de dentifrícios.
- **Proteção contra erosão:** impede a perda progressiva e irreversível do tecido dental duro por processos químicos, visto que preenche lacunas erodidas com proteínas contidas no seu interior. Assim, auxilia na remineralização do tecido também. Isso está relacionado à composição, espessura e tempo de maturação da película.

Negativas:

- **Prevê Sítios para Adesão Bacteriana:** A película dental adquirida serve de base para o desenvolvimento do biofilme bucal, pois as bactérias reconhecem sítios de adesão nas proteínas presentes na película.

PELÍCULA ADQUIRIDA X BIOFILME:

A película adquirida é um filme totalmente livre de bactérias, que participa do estágio inicial da formação do biofilme, visto que é uma base para adesão de micro-organismos. Após quatro a seis horas de formação, essa película já começa a ser colonizada por bactérias, permitindo o desenvolvimento da placa bacteriana.

O biofilme bacteriano é a comunidade de bactérias organizadas e aderidas a uma superfície sólida, envolvidas por uma matriz extracelular formada por polímeros bacterianos e por substâncias da saliva e da dieta do hospedeiro. Ele se forma sobre a película por meio da colonização de micro-organismos por interações específicas ou inespecíficas.

Interações Inespecíficas: micro-organismos conseguem se aderir à película através de interações fracas e reversíveis, como interações iônicas e pontes de hidrogênio. Isso ocorre devido à formação da camada de hidratação, uma camada de íons cálcio que se forma sobre a superfície da película e permite a interação entre a bactéria e a superfície dental.

Se a camada de hidratação não existisse, a bactéria não conseguiria vencer a força de repulsão causada entre suas cargas negativas e as cargas negativas do dente.

Interações Específicas: micro-organismos se aderem à película por interações fortes e estáveis. Ocorrem interações de “encaixe” entre as proteínas da película e as proteínas da superfície de bactérias, através das chamadas adesinas. Cada adesina se liga a um componente específico, por um receptor.

REFERÊNCIAS

BERNARDI G.; GIRO, M. G.; GAILLARD C. Chromatography of polypeptides and proteins on hydroxiapatite. Some new developments. **Biochim Biophys Acta**, v. 278, n. 3, 409-420, 1972.

HANNIG, M.; JOINER, A. The structure, function and properties of the acquired pellicle. **Monographs in Oral Science**, v. 19, p. 29-64, 2006.

HARA, A. T.; ZERO, D. T. The Caries Environment: Saliva, Pellicle, Diet, and Hard Tissue Ultrastructure. **Dental Clinics of North America**, v. 54, n. 3, p. 455-467, 2010.

LAMKIN, M. S.; ARANCILLO, A. A.; OPPENHEIM, F. G. Temporal and Compositional Characteristics of Salivary Protein Adsorption to Hydroxyapatite. **Journal of Dental Research**, v. 75, n. 2, p. 803-808, 1996.

LENDENMANN, U.; GROGAN, J.; OPPENHEIM, F. G. Saliva and dental pellicle -A review. **Advances in Dental Research**, v. 14, n. 1, p. 22-28, 2000.

NICOLAU, J. **Fundamentos de Bioquímica Oral**. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2009.

OTTO, W. B. **Estudo in vivo do perfil proteico da película dental adquirida após o consumo de bebida a base de soja e leite bovino**. Dissertação (Mestrado em Saúde Bucal durante a Infância e Adolescência) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

SIQUEIRA, W. L.; ZHANG, W.; HELMERHORST, E. J.; GYGI, S. P.; OPPENHEIM, F. G. Identification of Protein Components in in vivo Human Acquired Enamel Pellicle Using LC-ESI-MS/MS. **Journal of Proteome Research**, v. 6, n. 6, p. 2152-2160, 2007.

5

Biofilme Dental

Rodrigo Alex Arthur

Sandra Liana Henz

Lina Naomi Hashizume

A cárie dental tem sido definida como uma doença multifatorial, biofilme-açúcar dependente. Nesse contexto, considera-se que o fator etiológico necessário para o seu desenvolvimento seja o acúmulo de biofilme sobre os dentes. Na forma de biofilmes, os micro-organismos apresentam-se mais virulentos, aumentando o potencial patogênico desses biofilmes. Dessa forma, o conhecimento sobre a formação do biofilme e sobre a íntima relação entre ele e o desenvolvimento da cárie dental é de extrema importância no que se refere ao entendimento sobre a etiologia da cárie e também como forma de adoção de medidas preventivas eficientes.

O termo biofilme dental ou placa dental se refere à complexa comunidade microbiana encontrada na superfície dos dentes, embebidos numa matriz de polímeros extracelulares derivados do metabolismo bacteriano e do meio ambiente, nesse caso, a saliva.

O biofilme dental é naturalmente formado nas superfícies dentais a partir da microbiota residente. Um dos benefícios da microbiota residente é atuar como uma barreira para a colonização permanente por micro-organismos transitórios, com potencial patogênico. Os mecanismos envolvidos nessa resistência à colonização incluem: 1) saturação, pela microbiota residente, dos sítios disponíveis para a adesão; 2) competição mais efetiva por nutrientes essenciais; 3) criação de microambientes desfavoráveis ao crescimento de espécies invasoras e 4) produção de fatores inibidores pela microbiota normal.

AQUISIÇÃO DA MICROBIOTA ORAL RESIDENTE

Essa microbiota residente é adquirida logo após o nascimento e a sucessão de bactérias dentro da boca continua por toda a vida. A boca do recém-nascido é comumente estéril, e a aquisição de micro-organismos depende da transmissão de micro-organismos dos locais de potencial colonização, como a saliva, por exemplo. Nesse sentido, alguns estudos têm sugerido que a mãe é a fonte principal de micro-organismos (transmissão vertical) (LI & CAUFIELD, 1995).

Os primeiros micro-organismos que podem ser isolados da boca durante as primeiras semanas após o nascimento, são os *Streptococcus*, incluindo o *S. mitis*, o *S. oralis* e o *S. salivarius*. Outros micro-organismos aparecem como transitórios (lactobacilos e estreptococos do grupo *mutans*), pois não podem competir com as bactérias estabelecidas. A fonte imediata dessas bactérias é particularmente a mãe, o que também já foi verificado por estudos de Caufield *et al.* (2007); Alves *et al.* (2009). Nos primeiros meses de vida, a microbiota torna-se mais complexa, com bactérias anaeróbicas como *Veillonella* e *Prevotella* estando incluídas na comunidade.

A erupção dos dentes fornece novos tipos de superfícies e de microambientes, alterando a composição da microbiota oral. Com isso, há colonização da cavidade oral por espécies que se aderem na superfície dental e aí se multiplicam, como *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. sanguis*, *Actinomyces* e um aumento de tipos de bactérias anaeróbicas. A microbiota da cavidade bucal torna-se mais complexa, e atinge uma relativa estabilidade em termos de gêneros e espécies. A perda dos dentes, por sua vez, resulta em perda de microambientes na boca e na redução da com-

plexidade da microbiota. A superfície das próteses e de implantes pode ser uma alternativa às superfícies dentais para a colonização dos demais micro-organismos da cavidade bucal.

A microbiota oral continua a aumentar em diversidade até ser alcançada uma situação estável, denominada de comunidade clímax. Essa estabilidade, representada pelo equilíbrio dinâmico entre a microbiota residente e as condições ambientais locais, é denominada de “homeostasia microbiana”. Quaisquer fatores responsáveis pela alteração dessa homeostasia podem levar a um desequilíbrio, havendo aumento na predisposição à doença.

Raramente, ou praticamente nunca, um habitat é ocupado por uma única espécie ou por um único filo de micro-organismos. Em geral, há uma mistura de bactérias que são capazes de sobreviver no ambiente. Uma característica importante de muitos habitats é a presença de um ou mais tipos de superfícies, fornecendo áreas ricas em nutrientes, bem como locais estáveis onde os micro-organismos podem se aderir e evitar serem removidos de seu habitat.

A boca não é um ambiente homogêneo para a colonização microbiana. Existem microambientes distintos, tais como as superfícies mucosas (palato, bochecha, língua), as superfícies dentárias e o sulco gengival.

FATORES QUE INFLUENCIAM O CRESCIMENTO E O METABOLISMO MICROBIANO NA CAVIDADE ORAL

A boca é, ao mesmo tempo, um ambiente amigável e hostil para o crescimento bacteriano. Na maior parte de tempo, há escassez de nutrientes, mas pode haver também períodos repentinos e irregulares de excesso de alimentos. Além disso, a cavidade bucal apresenta condições de aerobiose. Porém, bactérias anaeróbias estritas e facultativas são capazes de crescer nesse ambiente.

A saliva desempenha um importante papel na regulação do crescimento e atividade metabólica da microbiota oral. Ela ajuda a manter a temperatura e o pH em níveis ideais para o crescimento da maioria dos micro-organismos, pode atuar como fonte primária de carboidratos para a microbiota, por meio de glicoproteínas, peptídeos e aminoácidos, e possui uma gama de fatores inatos e específicos de defesa.

A seguir, uma breve descrição dos fatores que podem interferir com o metabolismo microbiano:

Temperatura

A boca é mantida a uma temperatura relativamente constante (35-36°C), o que proporciona condições adequadas para o crescimento de uma ampla gama de micro-organismos.

Potencial redox/anaerobiose

A cavidade bucal possui uma concentração de oxigênio de aproximadamente 20%. Porém, apenas uma pequena parcela da microbiota bucal compreende espécies aeróbias. A maioria dos micro-organismos da cavidade bucal é anaeróbia facultativa (crescem na presença ou ausência de oxigênio) ou anaeróbias estritas (requerem condições reduzidas, e o oxigênio pode ser até tóxico). Há ainda os microaerófilos (que requerem baixas concentrações de oxigênio) e os capnofílicos (que necessitam de CO_2).

O que determina a colonização bucal e sobrevivência dos os microorganismos em uma determinada região é o potencial de óxido-redução (potencial redox) dessa região. Oxigênio resulta em oxidação da região, o que inibe o crescimento de anaeróbios, que necessitam de regiões com tensões de oxigênio reduzidas. Entretanto, anaeróbios estritos podem sobreviver em ambientes aeróbios devido a parcerias com espécies que consomem o oxigênio, criando um potencial redox adequado para o seu crescimento. Durante a formação da placa dental, o potencial redox das superfícies dentais se altera, de inicialmente alto (altamente oxidado) para baixo (altamente reduzido), sugerindo que há uma sucessão de micro-organismos na placa dental, que inicialmente usam o O_2 , criando um ambiente adequado para a colonização de micro-organismos anaeróbicos.

pH

Muitos micro-organismos requerem pH em torno da neutralidade para crescerem, e são sensíveis aos extremos de pH ácido ou alcalino. O pH da maioria das superfícies da boca é regulado pela saliva (6,75 a 7,25),

de modo que, em geral, os valores de pH ótimo para o crescimento microbiano são proporcionados nas áreas banhadas por este fluido. Porém, flutuações no pH do ambiente podem acarretar em mudanças da população bacteriana da placa dental. Esse fenômeno ocorre após ingestão de carboidratos fermentáveis, onde há produção de ácidos devido ao metabolismo bacteriano. Lentamente, o pH se recupera, atingindo valores iniciais. Dependendo da frequência da ingestão de açúcar, as quedas de pH são mais frequentes, inibindo o crescimento de bactérias ácido-sensíveis, e viabilizando o crescimento de bactérias ácido-tolerantes, como os *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus*, predispondo a superfície dental à ocorrência de cárie.

Nutrientes

A persistência e a diversidade de microflora oral residente devem-se principalmente ao metabolismo de nutrientes endógenos, ao invés de nutrientes exógenos fornecidos pela dieta. A principal fonte de nutrientes endógenos é a saliva, que contém aminoácidos, glicoproteínas, peptídeos, proteínas, vitamina e gases. O sulco gengival, suprido pelo fluido gengival, contém albumina, glicoproteínas e moléculas contendo sangue. A diferença na fonte de nutrientes endógenos é uma das razões para a variação na microflora do sulco gengival comparada ao dente, por exemplo.

Além disso, alimentos periodicamente ingeridos na dieta também se constituem em fonte de energia para os micro-organismos e podem interferir com a ecologia bucal. No caso de frequente ingestão de carboidratos fermentáveis, como, por exemplo, a sacarose, há produção

de glucanos e frutanos decorrentes da fermentação desse carboidrato pelas enzimas glicosiltransferases e frutossiltransferases dos *S. mutans*. Os frutanos podem atuar como reservatório energético extracelular, ao passo que os glucanos possuem função estrutural e de manutenção da arquitetura do biofilme. As frequentes quedas de pH decorrentes desse consumo regular aumentam a proporção de *S. mutans* e lactobacilos, e reduzem a proporção de *S. sanguis* e *S. gordonii* na placa dental. Substitutos de açúcar, como o xilitol, podem ser utilizados, pois não são metabolizados pelas bactérias orais.

Aderência e aglutinação

A mastigação e o fluxo salivar provocam o deslocamento de micro-organismos não firmemente aderidos a uma superfície oral. Esses micro-organismos são principalmente derivados dos dentes (placa dental) e da mucosa (língua). Alguns componentes salivares, como as glicoproteínas do tipo mucinas, podem agregar esses micro-organismos, facilitando sua remoção da boca pela deglutição. Como superfícies mucosas se descamam frequentemente, a carga bacteriana nessas superfícies é mais leve. Entretanto, a superfície dental pode acumular maior carga bacteriana (placa dental), principalmente em áreas de estagnação, como sulcos e fissuras e região interproximal.

Agentes antimicrobianos

A microbiota oral é constantemente desafiada por agentes antiplaca ou antimicrobianos. Os agentes antiplaca removem células já aderidas, ou evitam a adesão de novas células à superfície do dente, ao passo que os antimicrobianos podem matar ou inibir o crescimento das bactérias. Ambos os tipos podem ser distribuídos por dentifrícios ou enxaguatórios.

Defesas do hospedeiro

Fatores não específicos

*Lisozimas: unem e agregam bactérias orais. Hidrolizam peptidoglicanos que conferem rigidez às paredes celulares bacterianas. Os membros da microbiota residente são insensíveis à ação da lisozima, de forma que seu papel pode ser mais dirigido para a inibição do crescimento de bactérias exógenas.

*Lactoferrina: glicoproteína que possui afinidade com o ferro. Sequestra o ferro, que é necessário para o metabolismo bacteriano.

*Peroxidase salivar (sialoperoxidase): produz hipotiocianato em pH neutro ou ácido hipotiocianoso em pH baixo (na presença de H_2O_2), que podem inibir o metabolismo bacteriano.

*Histidinas e cistatinas: histidinas possuem ação antifúngica, ao passo que cistatinas são inibidores de proteases.

Fatores específicos

*IgAs: pode aglutinar bactérias orais, modular a atividade enzimática e inibir a aderência de bactérias à superfície dental. É considerada a primeira linha de defesa do hospedeiro.

*IgA, IgG e IgM: impedem a adesão microbiana; opsonização.

Placa bacteriana: desenvolvimento, estrutura, composição e propriedades

O desenvolvimento da placa bacteriana pode ser dividido em vários estágios arbitrários:

- Formação de película;
- Adesão de células bacterianas simples (0 a 4 horas);
- Crescimento de bactérias aderidas, levando a formação de microcolônias distintas (4-24 horas);
- Sucessão e coagregação microbianas, levando a um aumento na diversidade microbiana (1-14 dias);
- Multiplicação dos micro-organismos e síntese de polímeros extracelulares;
- Comunidade clímax ou placa madura (2 semanas ou mais);
- Descolamento de células do biofilme para fase planctônica (saliva) facilitando a colonização de novos sítios.

Obs: a formação da placa dental é dinâmica. Adesão, crescimento, remoção e readesão (re-colonização) ocorrem ao mesmo tempo.

Formação da película salivar

Os micro-organismos não colonizam diretamente a superfície mineralizada do dente. Os dentes são sempre cobertos por uma camada proteica acelular denominada película, que se forma logo após a superfície dental ser limpa. Essa película é composta por glicoproteínas salivares, fosfoproteínas, lipídeos e proteínas. Remanescentes da parede celular bacteriana e outros produtos também têm sido encontrados na película.

Colonização microbiana

Os colonizadores iniciais constituem uma parte altamente seletiva da microbiota oral, principalmente o *S. sanguis*, o *S. oralis* e o *S. mitis*. Essas espécies representam 95% dos estreptococos e 56% da microbiota inicial. Essa microbiota inicial compreende *Actinomyces* e bactérias Gram-negativas, como *Neisseria*. Independente da exposição à sacarose, os estreptococos *mutans* representam apenas 2% ou menos dos estreptococos iniciais.

Essa adesão microbiana é seletiva (teoria de Kolenbrander; KOLENBRANDER *et al.*, 2006). As bactérias possuem componentes específicos de superfície, chamados de adesinas, que se aderem a moléculas complementares (receptores) na película. Pequenas séries de forças são responsáveis pela interação entre adesinas e receptores. Essas interações

contribuem para o tropismo de um micro-organismo com uma superfície particular ou habitat. Alguns micro-organismos se ligam à alfa-amilase, outros à estaterina, ou às proteínas ricas em prolina presentes na película salivar. Além disso, alguns mecanismos de adesão envolvem proteínas bacterianas semelhantes às lectinas, que interagem com os oligossacarídeos, carboidratos e glicoproteínas adsorvidas na superfície do dente (por exemplo, *S. sanguis*). Outros micro-organismos, como o *Actinomyces*, possuem fímbrias, que permeiam a aderência bacteriana às proteínas ricas em prolina e estaterina presentes na película. Algumas proteínas localizadas na superfície das bactérias também podem atuar como adesinas para a ligação em receptores de outras células.

Ainda, é preciso ressaltar que os receptores do hospedeiro não estão apenas adsorvidos à superfície do dente, mas estão livremente acessíveis em solução na saliva, podendo agregar as bactérias, facilitando sua remoção da boca por deglutição. Por isso, para que haja formação de placa, as bactérias não podem se aderir a tais receptores livres na saliva. Especificamente, *A. naeslundii* não se aderem a receptores de Proteínas ricas em prolina (PRP) livres, mas apenas quando essas proteínas estão adsorvidas na superfície dental. Provavelmente, há segmentos ocultos dessas PRPs que somente tornam-se expostos quando adsorvidos à superfície do dente, provavelmente, devido a mudanças conformacionais. Esses receptores ocultos são chamados de “criptítapos”, impedindo com que haja a ligação das bactérias a receptores livres na saliva. As adesinas que podem reconhecer criptítapos em moléculas associadas a superfícies, podem prover uma forte vantagem seletiva para qualquer micro-organismo. Além disso, o fato de que a atividade enzimática bacteriana

pode modificar constituintes da película, destruir receptores de algumas espécies e criar novos receptores para outras espécies é, provavelmente, um importante fator na regulação da colonização.

Coagregação

A coagregação é o reconhecimento célula a célula. Frequentemente, envolve interações do tipo lectinas, que são proteínas que interagem com receptores complementares contendo carboidratos em outra célula. Observa-se que as fusobactérias se coagregam com a maior parte dos gêneros de bactérias. Foi proposto que essas fusobactérias agem como uma ponte entre os colonizadores iniciais e as colonizadoras tardias. Essa coagregação mediada por lectinas pode ser um importante mecanismo envolvido com a organização das comunidades microbianas da placa dental. Além disso, moléculas salivares continuarão a ser adsorvidas em bactérias já ligadas à superfície do dente, e os mecanismos de adesão descritos anteriormente continuarão funcionando. A diversidade de mecanismos potenciais para a aderência, juntamente com a heterogeneidade molecular das superfícies das bactérias, significa que a formação do biofilme envolve múltiplas interações.

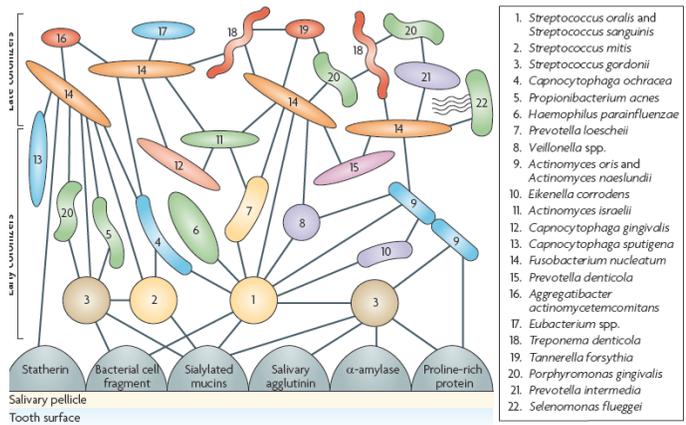
Multiplicação, síntese de polímeros e formação de biofilme

Uma vez estabelecidas na superfície dental, as bactérias começam a se multiplicar. Porém, essa taxa de crescimento muda à medida que o biofilme amadurece.

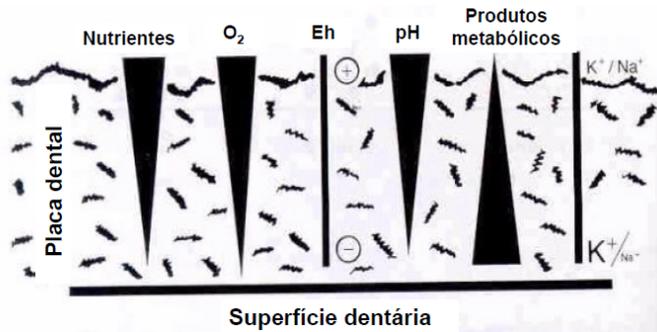
Durante o desenvolvimento do biofilme, há síntese de polímeros extracelulares pelas bactérias. Particularmente no caso de *S. mutans*, a síntese de polissacarídeos extracelulares insolúveis (ou mutanos) é responsável pela integridade estrutural da placa, mas também pelo aumento na porosidade da placa. Esses polissacarídeos são sintetizados por enzimas glicosiltransferases, que podem estar adsorvidas na superfície bacteriana ou mesmo na superfície dental, formando parte da película adquirida. Os polissacarídeos extracelulares insolúveis podem atuar como colas biológicas entre as gtf's na superfície bacteriana e aquelas na superfície dental, viabilizando a aderência desses micro-organismos à placa, como no caso dos *S. mutans* (RÖLLA, 1985, 1989). Além disso, os polissacarídeos extracelulares insolúveis também viabilizam a adesão entre os micro-organismos. Os polissacarídeos extracelulares solúveis são sintetizados pelas frutossiltransferases, e atuam, principalmente, como fonte de energia para bactérias da placa.

Nesse processo de multiplicação, o biofilme torna-se mais espesso. O metabolismo das espécies pioneiras cria condições apropriadas para a colonização por bactérias com maior nível de exigências atmosféricas. O oxigênio é consumido pelas espécies aeróbicas e anaeróbicas facultativas, e, gradualmente, o potencial redox é diminuído, favorecendo o crescimento de bactérias anaeróbicas obrigatórias. Nutrientes adicionais também se tornam viáveis em razão do metabolismo das espécies pioneiras, e a diversidade da microflora aumenta em termos de tipos morfológicos e de número de espécies. Nesse caso, o estabelecimento de micro-organismos primários é um antecedente primário para a sub-

sequente proliferação de outros micro-organismos, num processo de sucessão microbiana. Após algumas semanas de crescimento não perturbado, a microbiota se desenvolve numa comunidade clímax.



(KOLENBRANDER *et al.*, 2010). Esquema ilustrativo da formação do biofilme na superfície dental e espécies envolvidas.



(MARSH & MARTIN, 2005) Ilustração das variantes ambientais presentes durante o crescimento dos biofilmes.

Como exemplo desse processo de formação de biofilme, abaixo está descrita a sequência de colonização microbiana inicial da superfície do dente:

Após uma superfície ter sido limpa e exposta a aproximadamente 4 horas ao ambiente oral, poucas bactérias são encontradas. O esmalte está coberto por um depósito granular denominado película, que é irregularmente distribuída sobre a superfície dos dentes. Essa película forma-se primeiramente em depressões do esmalte. Bactérias encontradas nos estágios iniciais de formação de placa são cocos ou bacilos. Existe uma fase adaptativa (sem multiplicação celular) antes que a colonização pelas bactérias prossiga. Um rápido aumento só é observado depois de 8 a 12 horas e as bactérias se espalham pela superfície em uma única camada. Em algumas regiões, os micro-organismos formam multicamadas, nas quais esses micro-organismos são embebidos numa matriz intermicrobiana. Porém, os depósitos microbianos sobre os dentes não são uniformes em espessura. Após 1 dia, a placa é constituída por cocos e filamentos. Após o segundo dia há múltiplos organismos filamentosos com orientação perpendicular à superfície. Em relação à placa formada sobre dentina radicular, a taxa de formação é mais rápida e também a espessura da placa é mais homogênea.

A adsorção contínua de micro-organismos simples, provenientes da saliva, também contribui para a expansão dos depósitos bacterianos. Na camada superficial, alguns se coagregam com outras espécies para formar estruturas semelhantes a espigas de milho (filamento central coberto por micro-organismos esféricos). Com o envelhecimento da placa (duas semanas ou mais), ocorrem alterações estruturais desde as camadas mais profundas até a superfície. Há formação de uma camada interna de bactérias pleomórficas Gram-positivas, que é ultra estruturalmente semelhante à espécie de *Actinomyces*. A parte mais externa desses depósitos microbianos maduros é em geral mais fracamente estruturada e varia em composição.

PLACA COMO UMA COMUNIDADE BACTERIANA

Em um biofilme complexo, como o biofilme dental, populações de bactérias estão próximas umas das outras, e, em consequência disso, interagem. Essas interações podem ser benéficas para uma ou mais populações de micro-organismos, ou antagonista para outras populações. O metabolismo da placa irá produzir gradientes de fatores na placa, tais como nutrientes, pH, oxigênio, produtos tóxicos. Esses gradientes levam ao desenvolvimento de estratificações verticais e horizontais no biofilme, permitindo o crescimento de micro-organismos com necessidades amplamente diversas, permitindo que espécies incompatíveis coexistam no mesmo ambiente.

Interações sinérgicas

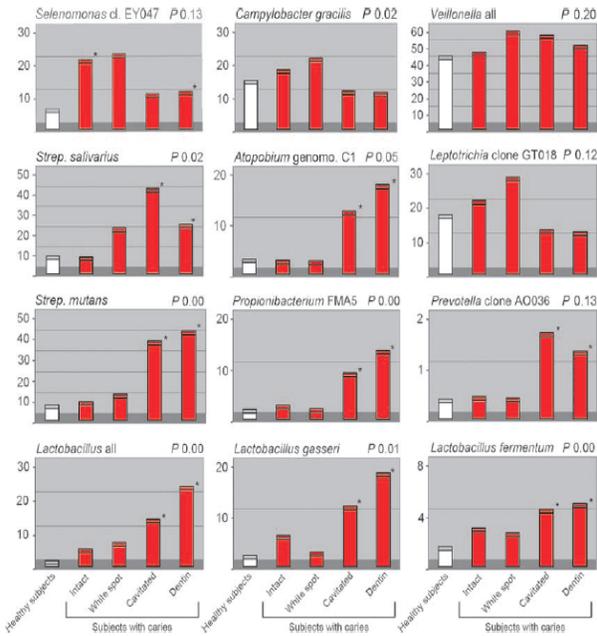
Durante o metabolismo bacteriano, os produtos obtidos pelo metabolismo de uma determinada população podem ser utilizados como nutriente para outros micro-organismos. Exemplo é o caso dos *S. mutans*, que produzem ácido lático que é usado como nutriente por *Veillonella*. O acetato produzido por *Veillonella* é usado como nutriente por *Eubacterium*. Além disso, existe uma complementação enzimática entre populações. Esse sinergismo contribui para que espécies diferentes evitem competição direta por nutrientes, e, conseqüentemente, sejam capazes de coexistir. Forma-se uma cadeia de interações nutricionais e de redes alimentares, criando interdependência entre os micro-organismos. A coagregação também é uma interação sinérgica, já que pode auxiliar na colonização de micro-organismos metabolicamente dependentes.

Interações antagonísticas

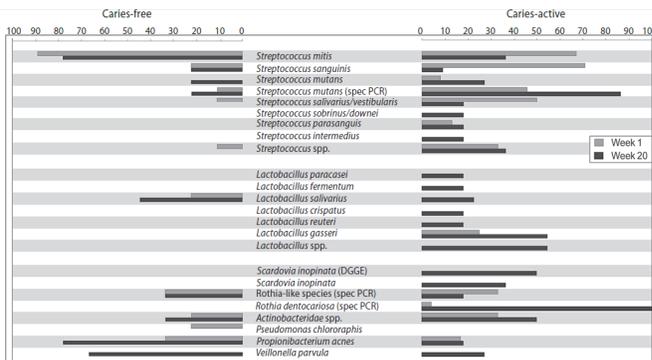
A produção de compostos antagônicos, como bacteriocinas, por exemplo, podem inibir o crescimento de alguns micro-organismos, conferindo vantagem competitiva a outros. Essas bacteriocinas são produzidas pela maioria dos estreptococos orais. Além disso, produtos metabólicos como ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio e enzimas também podem interferir com o crescimento da microbiota da placa dental. O baixo pH é particularmente inibitório para micro-organismos Gram-negativos.

Essas interações sinérgicas e antogonísticas permitem que os micro-organismos do biofilme dental convivam na forma de uma comunidade. Em adição, as estreitas interações físicas e metabólicas deixam poucos nichos incompletos, reduzindo, desse modo, a probabilidade de colonização por micro-organismos exógenos, e contribuindo para a estabilidade microbiana natural da flora da placa (*homeostasia microbiana*). O equilíbrio da microflora permanece estável a menos que severamente perturbado por um estresse no meio ambiente. Essa estabilidade é mantida apesar das defesas do hospedeiro e de uma variedade de estresses do meio ambiente (dieta, distúrbios físicos, antibióticos), e resulta principalmente de um equilíbrio entre sinergismo e antagonismo. Quando esse equilíbrio é perturbado, mecanismos autorreguladores forçam a restauração do equilíbrio original. Quando essa homeostase não puder ser recuperada, há o desenvolvimento de doenças bucais, como por exemplo a cárie dental.

Classicamente, o desenvolvimento de cárie dental tem sido associado à presença de *S. mutans* no biofilme dental. (HAMADA & SLADE, 1980; LÖESCHE, 1986). Entretanto, o emprego de técnicas avançadas de biologia molecular para identificação de micro-organismos em estudos recentes têm demonstrado que o biofilme dental coletado de superfícies dentais cariadas (lesão em esmalte ou dentina) ou mesmo de indivíduos cárie-ativos e de indivíduos livres de cárie (cárie inativos) apresentam uma composição microbiana diversa. Observa-se que os indivíduos cárie-inativos apresentam altos níveis de *Veillonella parvula* e de *Streptococcus mitis* no biofilme, ao passo que indivíduos cárie-ativos, além de elevadas contagens de *S. mutans*, possuem elevados níveis de *Rothia dentocariosa*, *Scardovia inopinata* e *Propioniumbacterium ssp*, sugerindo que possivelmente outras bactérias, além do *S. mutans*, também contribuem para a cariogenicidade do biofilme dental (AAS *et al.*, 2006; THOMAS *et al.*, 2012). Porém, pouco se sabe sobre a função dessas novas espécies no biofilme. Hipotetiza-se que são as interações metabólicas entre todos os micro-organismos presentes no biofilme que criam condições favoráveis para o desenvolvimento da lesão de cárie. Estudos têm sido conduzidos para se avaliar individualmente o metabolismo e características fenotípicas dessas novas espécies bacterianas no intuito de melhor explicar o seu papel no biofilme cariogênico.



(AAS *et al.* 2008). Distribuição de espécies microbianas me biofilmes coletados de superfícies dentais de indivíduos cárie-inativos (primeira coluna), de superfície hígida de indivíduos cárie ativos (segunda coluna), de superfície com lesão não cavitada ativa em esmalte de indivíduos cárie-ativos (terceira coluna), de superfície de lesão cavitada ativa em esmalte de indivíduos cárie-ativos (quarta coluna) e de superfícies com cavidade de cárie em dentina (indivíduos cárie-ativos). O asterisco significa proporções estatisticamente maiores.



(THOMAS *et al.*, 2012) Proporção de micro-organismos isolados de biofilme dental de indivíduos livres de cárie e de indivíduos cárie-ativos após 1 ou 20 semanas de formação do biofilme.

Uma vez estabelecida na cavidade bucal, a relação entre microbiota e hospedeiro pode culminar com 2 situações distintas: Saúde e Doença, na dependência de fatores diretamente relacionados ao hospedeiro, externos ao hospedeiro ou relacionados à própria comunidade microbiana.

MANUTENÇÃO DE UM EQUILÍBRIO SAUDÁVEL ENTRE MICROBIOTA ORAL E O HOSPEDEIRO (SAÚDE)

A manutenção de um equilíbrio saudável entre microbiota oral e o hospedeiro, correspondente a sua situação de saúde, está na dependência de alguns fatores:

Fatores do hospedeiro

***Saliva:**

Desempenha uma função muito importante na manutenção de um equilíbrio apropriado entre microbiota oral e hospedeiro, aumentando a capacidade de sobrevivência de algumas bactérias, e reduzindo a competitividade de outras.

- A saliva é responsável pela formação de **película salivar adquirida**, fornecendo receptores para a adesão de bactérias específicas. Nesse ponto, a saliva pode atuar “modulando” o primeiro estágio da colonização dental, que é a aderência.

- Fonte de nutrientes (glicoproteínas salivares, aminoácidos, carboidratos, vitaminas e sais inorgânicos). Muitas bactérias podem sobreviver tendo a saliva como fonte principal de nutrientes, mas outras bactérias não são bem sucedidas sob certa restrição de nutrientes.
- Capacidade tampão da saliva controla o pH da placa dental, mantendo o nível de pH próximo da neutralidade, eliminando a vantagem dada às bactérias cariogênicas acidúricas.

Além disso, a atuação das lisozimas, lactoferrinas, peroxidases, histatitas e cistatinas bem como de imunoglobulinas salivares também podem modular as interações entre os micro-organismos da placa dental de forma a possibilitar o crescimento de um biofilme que seja compatível com saúde bucal.

Fatores externos ao hospedeiro

***Dieta:**

A composição química, a consistência e a frequência de ingestão dos alimentos podem influenciar a composição da microbiota da placa dental. Alimentos com alto peso molecular não são degradados ou podem ser degradados lentamente, não fornecendo nutrientes para a placa dental. Alimentos fibrosos podem ter um efeito de limpeza física. Carboidratos de baixo peso molecular (glicose, frutose, sacarose) se difundem facilmente pela placa dental e são metabolizados, atuando como nutrientes para a placa dental. Alimentos líquidos ficam menos

disponíveis para as bactérias, ao passo que os pastosos permanecem mais tempo na cavidade bucal. As melhores dietas alimentares para a saúde em termos de cárie são as que fornecem quantidades menores e menos frequentes de carboidratos rapidamente fermentáveis.

Fatores associados à placa dental

Alguns fatores associados à placa dental podem promover a estabilidade da composição bacteriana e do metabolismo da placa dental:

*Metabolismo de lactato por *Veillonella*, *Neisseria* e *Eubacterium*: levam o pH ambiental e a composição ácida da placa para níveis de estado de repouso.

*Geração de bases a partir da utilização de nitrogênio e ureia pelas bactérias orais. Esses compostos alcalinos podem explicar o porquê do pH da placa em repouso ser maior do que o da saliva. Proteínas da saliva e da dieta podem ser fontes de nitrogênio.

A manutenção de um pH próximo do repouso anula a vantagem das bactérias acidúricas e acidogênicas.

A HIPÓTESE DA PLACA DENTAL ECOLÓGICA

Hipótese da placa ecológica (MARSH, 2003)

Esse é um modelo dinâmico para explicar as mudanças na ecologia da placa que levam ao desenvolvimento da lesão de cárie. Bactérias potencialmente patogênicas podem ser naturalmente encontradas na placa dental. Porém, em pH neutro, esses micro-organismos são fracamente competitivos e estão presentes apenas em uma pequena proporção na microbiota da placa, em níveis baixos para serem considerados clinicamente relevantes. Nessa situação, os processos de des- e remineralização estão em equilíbrio. Se a frequência de ingestão de carboidratos aumenta, a placa permanece mais tempo com pH abaixo do pH crítico para desmineralização do esmalte. Essa condição de baixo pH favorece a proliferação de bactérias acidogênicas e acidúricas (especialmente *S. mutans* e lactobacilos, mas não exclusivamente) (VAN HOUTE, 1994) e também desloca o equilíbrio dinâmico entre esmalte e saliva para a condição de desmineralização. O aumento de *mutans* e lactobacilos na placa resultaria em maior produção de ácidos, aumentando ainda mais a desmineralização. Outras bactérias podem também produzir ácidos nessas condições. Porém, numa taxa mais lenta e poderiam estar associadas aos estágios iniciais da desmineralização. Se espécies acidúricas não estiverem presentes inicialmente, então as repetidas condições de pH baixo junto com a inibição da competição dos organismos podem aumentar a possibilidade de colonização por *mutans* e lactobacilos. Essa sequência contribui para a falta de especificidade total na ecologia da microbiota da cárie dental e explica o padrão de sucessão microbiana observado.

Nessa hipótese, a cárie é uma consequência de mudanças no equilíbrio da microbiota residente da placa provocada por fatores locais (altas frequências de ingestão de açúcar e queda no pH na placa). Essa hipótese também reconhece a relação dinâmica entre microbiota e hospedeiro. Nesse caso, para a prevenção de cárie, a doença pode ser controlada não somente pelo ataque direto aos patógenos, mas também pela interferência nos fatores que interferem com o equilíbrio da microbiota. A identificação de tais pontos críticos pode levar à seleção de estratégias apropriadas na prevenção de cárie dental, sob medida para as necessidades individuais.

Características comuns aos micro-organismos cariogênicos

*Rápido transporte de açúcares fermentáveis e conversão em ácidos (acidogenicidade).

Estreptococos do grupo mutans possuem um eficiente sistema de transporte de açúcar (fosfoenol piruvato/fosfotransferase), que são capazes de transportar carboidratos para o meio intracelular mesmo quando esses estão presentes em baixas concentrações.

*Produção de polissacarídeos extracelulares (glucanos e frutanos, que possuem função estrutural ou energético) e de polissacarídeo intracelular (reserva energética), usado quando açúcar livre não está disponível.

*Capacidade de manter o metabolismo do açúcar sob condições ambientais extremas, como em baixo pH (aciduricidade). Os *S. mutans* e lactocobilos não só permanecem viáveis em pH baixo, como também crescem e metabolizam produtos, isto é, são acidogênicos e acidúricos. Essa capacidade depende da habilidade de manter um ambiente in-

tracelular favorável e bombear prótons mesmo sob condições ácidas, presença de enzimas com pH ótimo ácido e produção de proteínas de resposta ao estresse ácido.

Deve-se enfatizar que essas propriedades não são específicas apenas para estreptococos *mutans*. Porém, esses são os micro-organismos com a combinação ideal dessas propriedades cariogênicas descritas acima. Portanto, não é surpreendente que os estreptococos são comumente encontrados em altas proporções em locais cariados, que outras bactérias podem estar envolvidas e que a etiologia não é monoespecífica em termos de bactérias envolvidas, embora a doença possa ser considerada específica do ponto de vista funcional, isto é, em termos acidúricos e acidogênicos.

Considerações sobre biofilmes x células planctônicas

Estudos recentes têm ressaltado o fato de que propriedades de bactérias crescidas sobre uma superfície (na forma de biofilmes) são distintas dos fenótipos expressos pelos mesmos organismos em uma cultura líquida convencional.

Propriedades gerais de um biofilme (MARSH, 2005):

- *Proteção contra a defesa do hospedeiro e predadores;
- *Proteção contra o ressecamento;
- *Alta resistência ou tolerância a agentes antimicrobianos, devido a:
 - Novo fenótipo associado à superfície (devido expressão diferencial de genes):

- Biofilmes formados com *S. sobrinus* necessitaram de uma concentração de amina fluoretada cerca de 100x maior do que em célula planctônica para matar a mesma quantidade de células (SHANI *et al.*, 2000). Em outro experimento, a concentração inibitória mínima para *P. gingivalis* foi 160x maior que em célula planctônica (LARSEN, 2002).
- Pobre penetração no biofilme: a matriz do biofilme pode atuar como uma barreira física à difusão dos antimicrobianos. Componentes da matriz podem aprisionar os antimicrobianos. Experimentalmente, Thurnheer *et al* (2003) mostrou que macromoléculas com diferentes pesos moleculares apresentam diferentes capacidades de penetrarem num biofilme multi-espécie formado *in vitro*. Moléculas maiores penetraram no biofilme numa menor extensão quando comparada às moléculas mais leves, razão do tamanho dos poros da matriz e de sua organização na forma de rede, que aprisiona essas macromoléculas.
- Taxa de crescimento lenta

Limitação de nutrientes promove menor crescimento do biofilme, podendo aumentar sua resistência aos antimicrobianos.

- Inativação por enzimas

*Alteração na expressão gênica, proteica e fenotípica:

O meio ambiente de crescimento dentro do biofilme pode diferir significativamente de cultura planctônica no que diz respeito aos fatores chave, resultando na expressão alterada de genes e fenótipos alterados.

S. mutans cultivados na forma de biofilmes apresentam uma expressão proteica diferente quando comparada à expressão em células planctônicas. Em biofilmes, há superexpressão de algumas proteínas

que, ou não são expressas em cultura planctônica, ou são subexpressas, sugerindo que o crescimento bacteriano na forma de biofilmes altera o fenótipo do micro-organismo (SVENSÄTER *et al.*, 2001).

S. mutans cultivados na forma de biofilme foram mais acidúricos em relação às células planctônicas (WELIN-NEILANDS & SVENSÄTER, 2007).

*Heterogeneidade espacial e ambiental criando um mosaico de microambientes (gradiente de pH, oxigênio, nutrientes), contribuindo para o aumento na diversidade microbiana.

*Interações metabólicas

*Comunicação intercelular

Bactérias podem responder às alterações do ambiente externo e também à presença de outras bactérias. Esse mecanismo de comunicação permite adaptação a fatores estressores e regula expressão de genes envolvidos com patogenia. Além disso, pode induzir competência genética e aumenta a frequência de transformação dos micro-organismos, habilitando-os na aquisição de material genético exógeno e de plasmídeos, que eventualmente carregam genes de resistência a antimicrobianos.

Para *S. mutans*, esse *quorum sensing* é mediado por moléculas de baixo peso molecular, denominados de peptídeos de competência (LI *et al.*, 2002). Alguns trabalhos sugerem que esse mecanismo é essencial para adaptação de *S. mutans* em ambientes ácidos. Quando os genes envolvidos na codificação dos peptídeos de competência são nocauteados, os *S. mutans* tornam-se menos tolerantes à acidificação (LI *et al.* 2002).

*Troca de material genético: Também chamada de transferência horizontal, é viabilizada pelos peptídeos de competência.

Comunidade residente da placa dental em locais diferentes

As condições ambientais em um dente não são uniformes: superfícies diferentes variam no seu grau de proteção das forças de remoção orais e da fonte de nutrientes. Essas diferenças terão reflexo na composição da comunidade microbiana.

Placa de fissura

A microbiota é formada principalmente por Gram-positivos e é dominada por estreptococos, especialmente aqueles produtores de polissacarídeos extracelulares. Há também *Actinomyces*. Anaeróbios estritos como *Veillonella* e *Propionibacterium* também são detectados, porém em baixos números. A comunidade mais simples encontrada em fissuras comparadas a outras superfícies do esmalte provavelmente reflete um meio ambiente mais severo, talvez com uma faixa relativamente limitada de nutrientes. A principal fonte de nutrientes é a saliva e a dieta. Na entrada das fissuras, cocos e bastonetes estão arrançados em paliçada, perpendiculares à superfície do esmalte, mesclados com micro-organismos filamentosos. Na fissura propriamente dita, filamentos são muito menos presentes e a microbiota consiste principalmente de cocos e bastonetes. De forma geral, os micro-organismos presentes no fundo (na parte mais interna da fissura) são micro-organismos mortos e metabolicamente inativos.

Placa interproximal

A microbiota é dominada por bacilos Gram-positivos, principalmente *Actinomyces*, mas estreptococos e *Veillonella* estão presentes em altos níveis. Semelhante ao descrito para placa de fissura, cada local apresenta um ecossistema diferente. Tais variações locais na composição da microbiota podem explicar porque alguns locais experimentam alta atividade de cárie com possível formação de cavitação, enquanto um local adjacente, na mesma boca, permanece sem lesões de cárie clinicamente detectáveis. A principal fonte de nutrientes são saliva, dieta e fluido gengival.

CONCLUSÃO

A placa dental possui uma grande diversidade de micro-organismos pertencentes à microbiota oral residente. Esses micro-organismos interagem constantemente uns com os outros por meio de interações sinérgicas e antagônicas. O equilíbrio entre essas interações é responsável pelo equilíbrio microbiológico presente no biofilme dental, compatível com uma condição de homeostase microbiana. Essa condição é compatível com saúde bucal. Entretanto, determinados fatores podem alterar esse equilíbrio entre microbiota e hospedeiro e permitir o desenvolvimento de doenças. Frequente ingestão de carboidratos fermentáveis, aliada a reduzido fluxo salivar do hospedeiro, promove uma ruptura na homeostasia microbiana permitindo o desenvolvimento de cárie dental.

REFERÊNCIAS

Livros e capítulos de livro

- CARLSSON, J.; HAMILTON I. Atividades metabólicas das bactérias orais. *In*: THYLSTRUP, A.; FEJERSKOV, O. **Cariologia Clínica**. 3. ed. São Paulo: Editora Santos, 2001. Cap. 4. p. 71-88.
- MARSH, P. D.; MARTIN, M. V. Placa dentária. *In*: **Microbiologia oral**. 4. ed. São Paulo: Livraria Santos, 2005. Cap. 5. p. 58-81.
- MARSH, P. D.; NYVAD, B. The oral microflora and biofilms on teeth. *In*: FEJERSKOV, O.; KIDD E. **Dental Caries: The disease and its clinical management**. Second edition. Blackswell-Munksgaard, 2008. Cap. 10. p. 163-188.
- NYVAD, B.; FEJERSKOV, O. Desenvolvimento, estrutura e pH da placa dental. *In*: THYLSTRUP, A.; FEJERSKOV, O. **Cariologia Clínica**. 3. ed. São Paulo: Editora Santos, 2001. Cap. 5. p. 89-110.

Artigos científicos

- AAS, J. A.; GRIFFEN, A. L.; DARDIS, S. R.; LEE, A. M.; OLSEN, I.; DEWHIRST, S. E.; LEYS, E. J.; PASTER, B. J. Bacterial of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. **J Clin Microbiol**, 46, p. 1407-1417, 2008.
- ALVES, A. C.; NOGUEIRA, R. D.; STIPP, R. N.; PAMPOLINI, F.; MORAES, A. B.; GONÇALVES, R. B.; HOFLING, J. F.; LI, Y.; MATTOS-GRANER, R. O. Prospective study of potential sources of *Streptococcus mutans* transmission in nursery school children. **J Med Microbiol**, 58, p. 476-481, 2009.
- CAUFIELD, P. W.; SAXENA, D.; FITCH, D.; LI Y. Population structure of plasmid-containing strains of *Streptococcus mutans* a member of the human indigenous biota. **J Bacteriol**, 4, p. 1238-1243, 2007.
- KOLENBRANDER, P. E.; PALMER, R. J.; RICKARD, A. H.; JAKUBOVICS, N.S.; CHALMERS, N. I.; DIAS, P. I. Bacterial interactions and successions during plaque development. **Periodontology** 2000, 42, p. 47-79, 2006.
- HAMADA, S.; SLADE D. Biology, immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. **Microbiol Rev**, 44, p. 331-384, 1980.

LARSEN, T. Susceptibility of *Porphyromonas gingivalis* in biofilms to amoxicillin, doxycycline and metronidazole. **Oral Microbiol Immunol**, 17, p. 267-271, 2002.

LI, Y. H.; TANG, N.; ASPIRAS, M. B.; LAU, P. C.; LEE, J. H.; ELLEN, R. P.; CVITKOVITCH, D. G. A quorum-sensing signaling system essential for genetic competence in *Streptococcus mutans* is involved in biofilm formation. **J Bacteriol**, 184, p. 2699-2678, 2002.

LI, Y.; CAUFIELD, P. W. The fidelity of initial acquisition of mutans streptococci by infants from their mothers. **J Dent Res**, 74, p. 681-685, 1995.

LÖESCHE, W. J. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. **Microbiol ver**, 50, p. 353-380, 1986,

MARSH, P. D. Dental plaque: Biological significance of a biofilm and community life-style. **J Clin Periodontol**, 32, p. 7-15, 2005.

MARSH, P. D. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? **Microbiology**, 149, p. 279-294, 2003.

RÖLLA, G.; SCHEIE, A. A.; CIARDI, J. E. Role of sucrose in plaque formation. **Scand J Dent Res**, 93, p. 105-111, 1985.

RÖLLA, G. Why is sucrose so cariogenic? The role of glucosyltransferase and polysaccharides. **Scand J Dent Res**, 97, p. 115-119, 1989.

SHANI, S.; FRIEDMAN, M.; STEINBERG, D. The anticariogenic effect of amine fluorides on *Streptococcus sobrinus* and glucosyltransferase in biofilms. **Caries Res**, 34, p. 260-267, 2000.

SVENSATER, G.; WELIN, J.; WILKINS, J. C.; BEIGHTON, D.; HAMILTON, I. Protein expression by planktonic and biofilm cells of *Streptococcus mutans*. **FEMS Microbiology Letters**, 205, p. 139-146, 2001.

THOMAS, R. Z.; ZIJNGE, V.; CIÇEK, A.; DE SOET, J. J.; HARMSEN, H. J. M.; HUYSMANS, M. C. D. N. J. M. Shifts in the microbial population in relation to in situ caries progression. **Caries Res**, 46, p. 427-431, 2012.

THURNHEER, T.; GMUR, R.; SHAPIRO, S.; GUGGENHEIM, B. Mass transport of macromolecules within an in vitro model of supragingival plaque. **Applied Environ Microbiol**, 69, p. 1702-1709, 2003.

VAN HOUTE, J.; LOPMAN, J.; KENT R. The predominant cultivable flora of sound and carious human root surface. **J Dent Res**, 73, p. 1727-1734, 1994.

WELIN-NEILANDS, J.; SVENSATER, G. Acid tolerance of biofilm cells of *Streptococcus mutans*. **Applied Environ Microbiol**, 73, p. 5633-5638, 2007.

6

Cálculo Dental

Sandra Liana Henz
Rodrigo Alex Arthur
Lina Naomi Hashizume

O cálculo dental é o biofilme mineralizado. Sua formação consiste em um processo de mineralização do biofilme, quando este fica acumulado na superfície do dente por um longo período de tempo e acaba sofrendo trocas iônicas com a saliva. Pode ocorrer também em próteses, dentaduras e implantes. Independente da superfície em que ocorre, há necessidade de deposição de biofilme anteriormente, visto que o cálculo acumula/retém essa placa e torna a superfície mais irregular e porosa. Existem várias manifestações do cálculo dental, que variam de indivíduo para indivíduo, dependendo do fluido salivar e da microbiota bucal.

O cálculo é um fator etiológico secundário na periodontite. Sua presença, entretanto, torna impossível a remoção adequada da placa e impede um controle de placa apropriado por parte do paciente. O cálculo abriga em sua superfície uma camada de placa bacteriana viável (ZANDER *et al.*, 1960; THEILADE, 1964; SCHROEDER, 1969).

Origem: placa bacteriana envelhecida e calcificada.

Tamanho: depende do tempo de acúmulo das formações bacterianas.

Associação: tem papel secundário na etiologia da doença periodontal, sua superfície porosa e rugosa facilita o acúmulo de biofilme.

CLASSIFICAÇÃO:

Cálculo Supragengival: ocorre acima da margem gengival e caracteriza-se por ser uma massa com coloração branca amarelada ou amarela acastanhada. Possui uma dureza moderada. Geralmente, está localizado em regiões próximas à saída dos ductos das glândulas salivares maiores. Por isso, deposita-se na região lingual dos dentes anterio-

res e inferiores e na região vestibular dos primeiros molares superiores. Seu diagnóstico se dá através de exame clínico com campo isolado e seco, e uso de uma sonda exploradora e milimetrada.

Cálculo Subgingival: ocorre abaixo da margem gengival, localizado no sulco gengival ou na bolsa periodontal. Caracteriza-se por ser de uma coloração marrom ou preta e superfície rugosa. Essa diferença na cor é resultante dos produtos do fluido crevicular e do sangue, presentes nessa região. Seu diagnóstico se dá através de um exame clínico mais complexo, com auxílio de jatos de ar na gengiva ou com uso de instrumentos de retração. Utiliza-se sonda exploradora ou milimetrada, que pode detectar a presença de depósitos duros no interior da bolsa periodontal. Ocasionalmente, pode-se recorrer a radiografias dentais, desde que os depósitos sejam volumosos.

COMPOSIÇÃO:

Composto por 70 a 80% de sais inorgânicos, sendo que estes possuem cálcio (40%) e fósforo (20%) em maior quantidade. Há presença também de pequenas quantidades de magnésio, carbonato e flúor. Quanto à composição orgânica, há algumas proteínas e carboidratos, e uma pequena fração de lipídios.

Existem quatro formas diferentes de cristais de fosfato de cálcio: a bruxita (B), o fosfato de octacálcio (OCP), a hidroxiapatita (HA) e o fosfato de cálcio (W). Dependendo da localização e da maturação do cálculo, há quantidades diferentes desses cristais (SCHROEDER, 1969).

Fatores locais que podem afetar a composição do cálculo:

- Concentração de cálcio e fosfato;
- Quantidades relativas de cada íon presentes no local;
- O pH (o ideal é básico);
- Presença de outros minerais de fosfato e cálcio.

Cálculo Supragengival: formado em camadas, resultando em uma grande heterogeneidade de uma camada para outra, no que diz respeito ao seu conteúdo mineral. Em média, o conteúdo é de 37%, podendo variar de 16 a 51%, com algumas camadas alcançando um conteúdo mineral em torno de 80% (KANI *et al.*, 1983; FRISKOPP & ISACSSON, 1984).

Nos cálculos jovens, encontramos grande quantidade de bruxita, o que indica que esse cristal parece ser a base para a formação do cálculo supragengival maduro. Após estabelecido, nas camadas exteriores, predominam cristais formados por fosfato de octacálcio enquanto nas camadas interiores encontramos hidroxiapatita. O fosfato de cálcio, por sua vez, está presente em pequenas quantidades.

Cálculo Subgengival: é mais homogêneo, formado por camadas com uma densidade igualmente alta dos minerais. Em média, os cálculos são compostos em 58% de conteúdo inorgânico, variando de 32 a 78%. Há predominância do fosfato de cálcio, com pequenas porções de magnésio. Também podemos encontrar hidroxiapatita em menores quantidades (KANI *et al.*, 1983; FRISKOPP & ISACSSON, 1984).

ADESÃO:

O cálculo dental geralmente se adere de forma persistente às superfícies dentárias, devido ao fato de que a película adquirida também se torna calcificada, promovendo um íntimo contato dos cristais de cálculo com o esmalte, cemento e dentina. Além disso, as irregularidades da superfície também são preenchidas por cristais, promovendo a união ao dente.

Em superfícies de titânio comercialmente puro, a adesão do cálculo se dá em menor grau, devido a presença de menores irregularidades. Geralmente, a remoção quando realizada com cuidados não traz prejuízos (MATARASSO *et al.*, 1996).

MINERALIZAÇÃO:

Inicia-se em centros que surgem intracelularmente nas colônias bacterianas ou extracelularmente a partir da matriz, com a cristalização do núcleo das bactérias.

Na presença de pH relativamente baixo na placa e uma relação alta de cálcio e fosfato na saliva, há formação de bruxita que pode se desenvolver e, mais tarde, formar hidroxiapatita e whitloquita de magnésio. Quando a placa supragengival é mineralizada, fosfato de octacálcio é formado, sendo gradualmente transformado em hidroxiapatita. Na presença de condições anaeróbias e alcalinas, com grandes quantidades de magnésio, forma-se a whitloquita de magnésio a partir do fosfato de cálcio, que representa a forma estável de mineralização do biofilme (Lang *et al.*, 2010)

Essa mineralização é extremamente variável entre os indivíduos e, até mesmo, em diferentes sítios da cavidade oral.

MINERALIZAÇÃO DO BIOFILME – CÁLCULO DENTAL
UMA SEMANA – evidência de mineralização
DUAS SEMANAS – formação do cálculo dental com 80% do material inorgânico
MESES OU ANOS – formação do cálculo dental com composição cristalina madura

IMPLICAÇÕES CLÍNICAS:

O efeito do cálculo parece ser um efeito secundário. É uma superfície irregular, que favorece o acúmulo de placa e compromete as práticas de higiene. Por ser capaz de manter os depósitos bacterianos em íntimo contato com a superfície dental, influencia na ecologia bacteriana e na resposta tecidual. Assim, amplifica os efeitos da placa, por isso deve ser removido para que se possa alcançar um tratamento adequado e possibilitar a execução de atividades profiláticas.

	SUPRAGENGIVAL	SUBGENGIVAL
COR	amarelo esbranquiçado	marrom ou preto
LOCALIZAÇÃO	superfície da coroa	superfície radicular
COMPOSIÇÃO	baixa concentração de cálcio, magnésio, flúor e zinco e maior concentração de carbonato e magnésio	maior concentração de cálcio, magnésio e flúor e menor concentração de carbonato
CONTEÚDO MINERAL	37% de conteúdo mineral, oriundo da saliva	58% de conteúdo mineral, oriundo do fluido crevicular

	SUPRAGENGIVAL	SUBGENGIVAL
TIPO DE CRISTAL E TAMANHO	Fosfato de octacálcio (OCP) e hidroxiapatita (HÁ) – cristais pequenos em agulha ou maiores em faixa	fosfato de octacálcio (OCP) e whitloquita (W) – cristais pequenos
FORMAÇÃO	heterogênea – calcificação variável	homogênea – calcificação uniforme
MICRO-ORGANISMOS	presentes em áreas não calcificadas	pouco presentes

REFERÊNCIAS

- CARRANZA, F. A.; NEWMAN, M. G. Cálculo Dental. *In: Clinical Periodontology*. 8. ed. Philadelphia, 1990. cap. 11, p.150-160.
- FRISKOPP, J.; ISACSSON, G. Mineral content of supragingival and subgingival calculus. *Journal of Periodontology*, 51, 553-562, 1984.
- KANI, T.; KANI, M.; MORIWAKI, Y.; DOI, Y. Microbean x-ray diffraction analysis of dental calculus. *Journal of Dental Research*, 62, 92-95, 1983.
- LANG, N. P.; MOMBELLI, A.; ATTSTRÖM, R. Biofilmes e Cálculos Orais. *In: LINDHE, J.; LANG, N. P.; KARRING, D. Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral*. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2010. cap. 8, p. 173-196.
- MARSH, P. D.; MARTIN, M. V. PLACA DENTÁRIA. *In: Microbiologia oral*. 4. ed. São Paulo: Livraria Santos, 2005. cap. 5, p. 58-81.
- MATARASSO, S.; QUAREMBA, G.; CORAGGIO, F.; VAIA, E.; CAFIERO, C.; LANG, N. P. Maintenance of implants: an *in vitro* study of titanium implant surface modifications subsequent to the application of different prophylaxis procedures. *Clinical Oral Implants Research*, 7, 64-72, 1996.
- SCHROEDER, H. E. **Formation and inhibition of Dental Calculus**. Berne: Hans Huber Publishers, 1969.
- THEILADE, J. Electron microscopic study of calculus attachment to smooth surfaces. *Acta odontologica scandinavia*, 22, 379-387, 1964.

ZANDER, H. A.; HAZEN, S. P.; SCOTT, D. B. Mineralization of dental calculus.
Proceedings of the Society Experimental Biology and Medicine, 103, 257-260,
1960.

7

Biofilme Subgengival

Sandra Liana Henz

Eduardo Toschi

Os biofilmes correspondem a uma complexa comunidade tridimensional constituída de micro-organismos circundados por uma matriz extracelular, presente, na maioria das vezes, sobre uma superfície sólida. Já o biofilme dentário, faz parte do conceito apresentado anteriormente, porém o acúmulo de micro-organismos se localiza sobre a superfície dos dentes. No interior dessa estrutura, há canais capazes de promoverem a passagem de oxigênio, água, nutrientes, moléculas sinalizadoras e genes, garantindo assim a comunicação e as relações entre os micro-organismos e a comunicação com o meio externo (KINANE; MOMBELLI, 2012).

FORMAÇÃO DO BIOFILME

A formação do biofilme se inicia através da deposição da película adquirida pela saliva na superfície do dente. Então, células planctônicas ou agregados de células se aderem a esta película através de estruturas especializadas das células bacterianas, as adesinas, que reconhecem proteínas da película adquirida e se ligam por interações físico-químicas. Essas ações irão resultar em um padrão disperso de depósitos bacterianos composto por colonizadores iniciais como *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mitior* e *Streptococcus sanguis* e *Actinomyces*. A maturação do biofilme prossegue através da co-agregação de bactérias planctônicas ao biofilme já formado (ZIJNGE *et al.*, 2010).

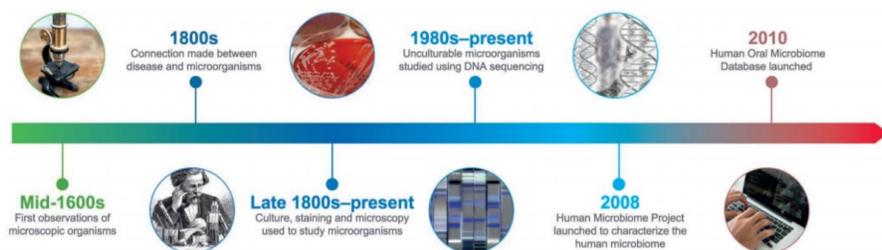
TIPOS DE BIOFILME

Na cavidade bucal podemos encontrar dois tipos de biofilmes: o biofilme supragengival e o subgengival. O biofilme supragengival se forma acima da margem gengival, através da adesão de micro-organismos à película adquirida, podendo ser encontrado em qualquer superfície dos dentes. Já o biofilme subgengival se forma abaixo da margem gengival, na região do sulco gengival ou bolsa periodontal, possuindo uma composição e estruturação diferentes do supragengival.

O biofilme subgengival se forma a partir da migração apical do biofilme supragengival em decorrência do aumento de volume gengival, ocasionado pelo processo inflamatório presente na gengiva, e um aumento na quantidade e diversidade de espécies bacterianas nesse nicho (NEWMAN, 1976; LAMONT, KOO & HAJISHENGALLIS, 2018). Ele se apresenta de forma mais fina devido a anatomia da região e é dividido microscopicamente em três partes distintas (JORGE *et al.*, 2012):

- Biofilme aderido: associado ao dente.
- Biofilme não aderido: associado ao epitélio do sulco gengival.
- Camada interposta entre o biofilme aderido e o não aderido: é frouxamente organizada e os micro-organismos flutuam no exsudato gengival.

ANÁLISE DO BIOFILME



Kilian *et al.*, 2016. The oral microbiome – an update for oral healthcare professionals.

Com o avanço da tecnologia, métodos mais arcaicos e menos precisos vão sendo deixados de lado e são substituídos por técnicas que supram as necessidades, levando assim ao aumento da precisão e do conhecimento das bactérias que atuam no biofilme subgingival. Uma variedade de métodos convencionais tem sido utilizada para analisar a composição da microbiota oral, incluindo a microscopia, a técnica de cultura, ensaios enzimáticos, ensaios imunológicos, como também análise genética (ZARCO *et al.*, 2012).

A detecção de micro-organismos melhorou muito através do advento dos métodos independentes de cultura, os quais permitem fazer uma análise detalhada e diferenciada, com a maioria se baseando na análise da microbiota através do gene 16S do RNA ribossômico. Esse gene está presente em todos os procariontes e contém regiões variáveis que são exclusivas entre micro-organismos e que pode então ser usado como meio de identificação (HOMD, 2016). Porém, há métodos que são mais baratos, como o NGS (Next Generation Sequencing) que permitem um sequenciamento de 27 milhões de genes em uma única

corrida, sendo mais vantajoso que o método anterior e levando assim a uma enorme geração de dados, aumentando consideravelmente o conhecimento e compreensão da microbiota oral (SALTER *et al.*, 2014).

COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DA MICROBIOTA SUBGENGIVAL

Na região subgengival são encontrados micro-organismos extremamente diferentes da região supragengival. Essa peculiaridade se deve pela pequena oferta de oxigênio (1-2%) e nutrientes advindos do fluido crevicular gengival. O fluido crevicular gengival é parecido com o exsudato inflamatório, rico em glicoproteínas cuja excreção se dá pelo epitélio juncional da região. O biofilme subgengival então consiste em bactérias em uma matriz extracelular composta principalmente de polímeros extracelulares de origem bacteriana, proteínas, polissacarídeos, DNA extracelular e produtos de exsudato gengival e/ou saliva (SILVA *et al.*, 2013).

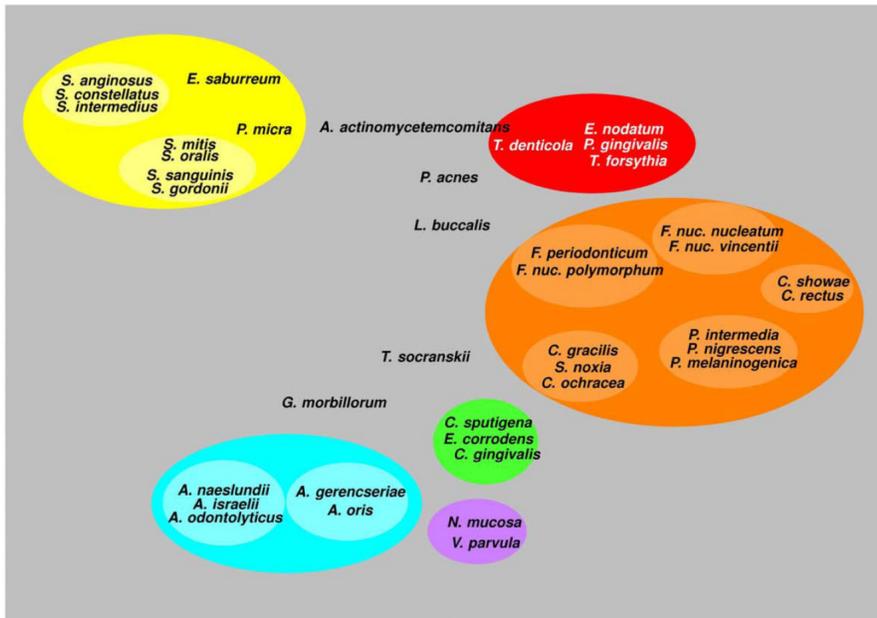
A formação dessa colonização, principalmente bacteriana, na região subgengival e sua contínua adaptação às mudanças das condições ambientais são regidas pelo equilíbrio dinâmico entre os micro-organismos, as defesas celular e humoral do hospedeiro, e a uma infinidade de produtos anabólicos e catabólicos e fatores de sinalização produzidos pela microbiota e pelos tecidos periodontais.

COMPOSIÇÃO BACTERIANA DO BIOFILME SUBGENGIVAL

A complexidade da microbiota bucal tem sido reconhecida desde o primeiro exame microscópico deste sítio realizado por Van Leeuwenhoek em 1683, quando observou “animálculos” presentes no material coletado da cavidade bucal. Numerosos estudos posteriores, que avaliaram o biofilme através de tecnologias mais avançadas, observaram que a microbiota é composta por uma grande mistura complexa de espécies bacterianas, sendo estimado que 400 ou mais espécies residam nesta área biológica (SLOTS, 1977; SOCRANSKY, 1977; SOCRANSKY *et al.*, 1998; SOCRANSKY & HAFFAJEE, 2005). Atualmente, sabe-se que podemos encontrar mais de 700 espécies na cavidade bucal. O biofilme subgengival é caracterizado por uma zona de bactérias gram-negativas e/ou espécies móveis localizadas ao lado do epitélio da bolsa, enquanto gram-positivas, bastões e cocos formam uma banda de organismos firmemente aderida à superfície do esmalte ou da raiz (LISTGARTEN, 1994).

Análises culturais realizadas mostram que esse biofilme pode abrigar até 10^9 bactérias e mais de 100 espécies diferentes em um único sítio. Algumas espécies como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Tannerella forsythia*, destacam-se pela maior prevalência, porém, outras espécies são igualmente importantes para o biofilme subgengival, merecendo uma investigação mais aprofundada, como as espiroquetas, responsáveis por até 50% da microbiota subgengival microscopicamente detectável. As bactérias que colonizam o biofilme subgengival, após diversos trabalhos, foram divididas em alguns grupos.

Essa divisão, realizada por Socransky e Haffajee em 2008, se baseia nas suas características e na sua afinidade com os outros integrantes da microbiota. Temos os grupos vermelho, laranja, amarelo, verde, azul e roxo.



(TELES *et al.*, 2013) Representação diagramática das relações entre as espécies dentro dos complexos microbianos e entre os complexos microbianos em amostras de biofilme supragengival (Esse diagrama é baseado no resultado da análise de ordenação de 9 cluster e 2 comunidades usando dados iniciais de 187 indivíduos).

O grupo vermelho consiste nas bactérias *P. gingivalis*, *T. forsythia* e *T. Denticola* e *E. Nodatum*. O grupo laranja, por sua vez, é integrado pelas subespécies da bactéria *F. nucleatum*, *F. nuc. vincentii*, pelas bactérias *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *P. melaninogenica*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter showae*, *Campylobacter gracilis*, *C. ochracea*, *S. noxia*, *F. peiodonticum* e *F. nuc. polymorphum*. As 3 espécies de bactéria *C. sputigena*, *C. gingivalis* e *E. corrodens* integram o grupo verde; enquanto um grupo de *Streptococcus* compõe o grupo amarelo: *S. mitis*, *S. sanguinis*, *S. gordonii*

e *S. oralis*, assim como *S. anginosus*, *S. constellatus*, *S. intermedius*, *E. saburreum* e *P. micra*. O grupo roxo é composto, então, por *N. mucosa* e *V. parvula*. Já o grupo azul é integrado por *A. naeslundii*, *A. israelii*, *A. odontolyticus*, *A. gerencseriae* e *A. oris*. As duas genoespécies de *P. acnes*, *L. buccalis*, *G. morbillorum*, *T. socranskii* e sorotipo B da *A. actinomycetemcomitans* não se agrupam a outras espécies.

Os integrantes do complexo laranja precedem a colonização por espécies do complexo vermelho e são associados a infecções em locais não-periodontais. Da mesma maneira, todas as espécies do complexo laranja estão associadas significativamente com o aumento da profundidade da bolsa periodontal, como exemplificado por *P. Intermedia* e *F. Nucleatum* (SOCRANSKY *et al.*, 1998).

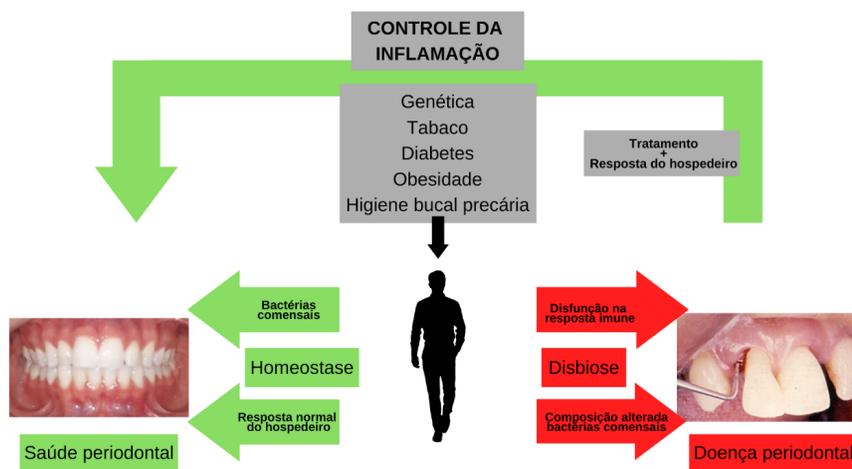
Os membros do complexo vermelho são encontrados em grande número em lesões de periodontite em adultos, exibindo uma relação muito forte com os parâmetros clínicos mais significativos no diagnóstico periodontal: profundidade da bolsa e sangramento à sondagem (HOSAKA *et al.*, 1994; UMEDA *et al.*, 1996).

ALTERAÇÕES PATOLÓGICAS PROVOCADAS PELO BIOFILME SUBGENGIVAL

O biofilme em condições de saúde é dominado pelos estreptococos gram-positivos. Entretanto, sem medidas de controle desse biofilme, o mesmo irá aumentar em espessura e tamanho. Esse acúmulo de biofilme poderá levar a inflamação dos tecidos periodontais como demonstrado por Løe em seu clássico estudo de Gengivite Experimen-

tal no Homem (LÖE, 1965). Com a inflamação da gengiva, teremos um aumento de seu volume e aumento no exsudato do fluido crevicular, que é rico em proteínas. Em 1-2 semanas, teremos um biofilme maduro, com uma complexidade microbiana maior, com a presença de cocos e bastonetes gram-positivos e de bastonetes gram-negativos de diferentes tamanhos, dos quais muitos gêneros e espécies são anaeróbicos (MARSH, 2015).

Atualmente é reconhecido que complexas interações entre mediadores da resposta imune e o biofilme são requeridos para levar a progressão da gengivite para a periodontite (MAYLE & CHAPLE, 2015). Além disso, fatores genéticos, hábito de fumar, diabetes, obesidade são fatores que modulam a doença periodontal.



Adaptado de Roberts and Darveau (2000).

A presença do biofilme está intimamente relacionada com as doenças periodontais mais comuns: gengivite e periodontite, correspondendo ao aparecimento de inflamação na gengiva devido à presença de bactérias em

contato com o tecido. Atualmente sabemos que bactérias historicamente consideradas patógenas orais podem ser encontradas em baixos números em sítios saudáveis, e que a doença ocorre por uma mudança deletéria no balanço natural da microbiota (MARSH *et al.*, 2015). É importante ressaltar que essas doenças não são causadas por um micro-organismo exógeno, mas sim por bactérias do próprio biofilme do hospedeiro após uma desregulação na homeostasia do meio (VALM, 2019).

A gengivite é caracterizada pela inflamação na gengiva marginal (periodonto de proteção) causando edema, vermelhidão e sangramento. A gengivite é causada pelo biofilme supragengival. Caso não haja o tratamento da gengivite, ela pode evoluir para a periodontite, em indivíduos suscetíveis, ocorrendo a inflamação no periodonto de sustentação e posterior perda de inserção (LINDHE *et al.*, 2010). O processo inflamatório irá acarretar uma modificação no microambiente do sulco gengival, e permitirá a modificação dos micro-organismos presentes nesse sítio.

Décadas de investigações têm demonstrado que as comunidades microbianas associadas com a periodontite diferem daquelas associadas com saúde (SLOTS, 1977; SOCRANSKY, 1977; SOCRANSKY *et al.*, 1998; SOCRANSKY & HAFFAJEE, 2005). Estudos usando técnicas de hibridização de DNA-DNA (checkerboard DNA-DNA hybridization) mostraram que as contagens de 14 espécies estão geralmente em números maiores na doença do que na saúde, e que as proporções também são diferentes entre a saúde e a doença (SOCRANSKY *et al.*, 1991, 1998).

Estudos utilizando novas metodologias têm mostrado diferenças na abundância relativa de certas espécies, confirmando a associação da *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola* com periodontite e revelando novas espécies, como o *Filifactor alocis* que têm sido fortemente associado com a doença (GRIFFEN *et al.*, 2011).

Estudo de Perez, Chaparro e outros autores (2017) mostrou uma forte associação entre conhecidos patógenos periodontais e periodontite e de algumas espécies benéficas com saúde periodontal. Alguns micro-organismos estão associados aos estágios iniciais da doença periodontal, tais como *Chloroflexi* e *Spirochaetes*. Outras espécies como *Fretibacterium*, *Eubacterium*, *Desulfobulbus*, *Peptostreptococcaceae*, *Bacteroidetes*, *Bacteroidaceae* e outras espécies que normalmente não são associadas com doença como *Filifactor alocis*, *Fretibacterium fastidiosum*, *Johnsonella sp*, *Peptostreptococcaceae sp*, *Porphyromonas endodontalis* e *Treponema sp* estão associados com bolsas profundas. Por outro lado, *Streptococcus*, *Corynebacterium* e *Bergeyella* estão mais correlacionados com saúde periodontal (PEREZ CHAPARRO, 2017).

Devemos ter em mente que as doenças ocorrem devido a um desequilíbrio nas proporções de micro-organismos que fazem parte da nossa microbiota normal, e são moduladas por fatores ambientais e do hospedeiro. Ainda não sabemos todos os mecanismos e micro-organismos envolvidos na doença periodontal, mas com os novos métodos de análise disponíveis novas descobertas irão aumentar nosso conhecimento na área da microbiologia da doença periodontal.

REFERÊNCIAS

DARVEAU, R. P.; ANNE, T.; PAGE, R. C. The microbial challenge in periodontitis. **Periodontology** 2000, vol. 14, p. 12-32, 1997. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.1997.tb00190.x>>. Acesso em: 20 nov. 2020.

FEJERSKOV, O. **Cárie dentária: a doença e seu tratamento clínico**, GEN- Grupo editorial. São Paulo: Santos, 2011.

GRIFFEN, A. L.; BEALL, C. J.; CAMPBELL, J. H.; FIRESTONE, N. D.; KUMAR, P. S.; YANG, Z. K. *et al.* Distinct and complex bacterial profiles in human periodontitis and health revealed by 16S pyrosequencing. **ISME J**, 6, 1176-1185, 2011.

HAFFAJEE, A. D.; SOCRANSKY, S. S.; PATEL, M. R.; SONG, X. Microbial complexes in supragingival plaque. **Oral Microbiology and Immunology**, vol. 23, p. 196-205, 2008.

HOSAKA, Y.; SAITO, A.; NAKAGAWA, T.; SEIDA, K.; YAMADA, S.; OKUDA, K. Effect of initial therapy on dynamics of immunoglobulin G levels to some periodontopathic bacteria in serum and gingival crevicular fluid. **Bulletin of Tokyo Dental College**, vol. 35, p. 207-216, 1994.

Human Oral Microbiome Database (HOMD). 2016. Disponível em: <<http://www.homd.org/>>. Acesso em maio de 2019.

JORGE, A. O. C. **Microbiologia e Imunologia Oral**. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2012.

KINANE, D. F.; MOMBELLI, A.: **Periodontal Disease**. Front Oral Biol. Basel, Karger, vol. 15, p. 1-16, 2012.

LAMONT, R. J.; KOO, H.; HAJISHENGALLIS, G. The oral microbiota: dynamic communities and host interactions. **Nature Reviews Microbiology**, vol 16, p. 745-759, 2018.

LINDHE, J. **Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

LISTGARTEN, M. A. Structure of the microbial flora associated with periodontal health and disease in man. **Journal of periodontology**, 1994, vol. 4, p. 1-18.

LÖE, H.; THEILADE, E.; JENSEN, S. B. Experimental gingivitis in man. **Journal of Periodontology**, 36, p. 177-187, 1965.

- MARSH, P. D.; HEAD, D. A.; DEVINE, D. A. Ecological approaches to oral biofilms: control without killing. **Caries Res**, 49 (Suppl 1), p. 46-54, 2015.
- MEYLE, J.; CHAPPLE, I. Molecular aspects of the pathogenesis of periodontitis. **Periodontology 2000**, 69, p. 7-17, 2015.
- NEWMAN, H. N. The apical border of plaque in chronic inflammatory periodontal disease. **Brazilian Dental Journal**, vol. 141, p. 105-113, 1976.
- PÉREZ-CHAPARRO, P. J.; MCCULLOCH, J. A.; MAMIZUKA, E. M.; MORAES, A. C. L.; FAVERI, M.; FIGUEIREDO, L. C.; DUARTE, P. M.; FERES, M. Do different probing depths exhibit striking differences in microbial profiles? **J Clin Periodontol**. 45(1), p. 26-37, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/jcpe.12811>>. Acesso em: 20 nov. 2020.
- ROBERTS, F. A.; DARVEAU, R. P. Microbial Protection and Virulence in Periodontal Tissue as a Function of Polymicrobial Communities: Symbiosis and Dysbiosis. **Periodontology 2000**, 69(1), p. 18-27, 2015.
- SALTER, S. J.; COX, M. J.; TUREK, E. M. *et al.* Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses. **BMC Biology**, vol. 87, p. 12-19, 2014.
- SILVA, N. L.; BEZERRA, R. A.; COSTA, F. N.; ROCHA, M. M. N. P.; PEREIRA, S. S. Avaliação do efeito do extrato da casca do cajueiro sobre microrganismos de biofilme subgingival: estudo experimental *in vitro*. **Brazilian Journal of Periodontology**, vol 23, p. 26-30, 2013.
- SLOTS, J. Microflora in the healthy gingival sulcus in man. **Scand J Dent Res**, 85, p. 247-254, 1977a. [PubMed: 17152]
- SLOTS, J. The predominant cultivable microflora of advanced periodontitis. **Scand J Dent Res**, 85, p. 114-121, 1977b. [PubMed: 320648]
- SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D.; CUGINI, M. A.; SMITH, C.; KENT, R. L. Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. **J Clin Periodontol**, 25, p. 134-144, 1998.
- SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D.; CUGINI, M. A.; SMITH, C.; KENT, R. L. Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. **J Clin Periodontol**, 25, p. 134-144, 1998. [PubMed: 9495612]
- SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D.; SMITH, C.; DIBART, S. Relation of counts of microbial species to clinical status at the sampled site. 199; **J Clin Periodontol**, 18, p. 766-775, 2009.

SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D. Evidence of bacterial etiology: a historical perspective. **Periodontology** 2000, 5, p. 7-25, 1994. [PubMed: 9673160]

SOCRANSKY, S. S. Microbiology of periodontal disease – present status and future considerations. **J Periodontol**, 48, p; 497-504, 1977. [PubMed: 333085]

SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D.; CUGINI, M. A.; SMITH, C.; KENT, R. L. Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. **Journal of Clinical Periodontology**, vol. 2, p. 134-144, 1998.

TELES, R.; TELES, F.; FRIAS-LOPEZ, J.; PASTER, B.; HAFFAJEE, A. Lessons learned and unlearned in periodontal microbiology. **Periodontology** 2000, 62(1), p. 95-162, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/prd.12010>> Acesso em: 20 nov. 2020.

UMEDA, M.; TOMINAGA, Y.; HE, T.; YANO, K.; WALANABE, H.; ISHIKAWA, I. Microbial flora in the acute phase of periodontitis and the effect of local administration of minocycline. **Journal of Periodontology**, vol. 67, p. 422-427, 1996.

VALM, A, M. The Structure of Dental Plaque Microbial Communities in the Transition from Health to Dental Caries and Periodontal Disease. **Journal of Molecular Biology**, vol. 431, p. 2957-2969, 2019.

ZARCO, M. F.; VESS, T. J.; GINSBURG, G. S. The oral microbiome in health and disease and the potential impact on personalized dental medicine. **Oral Diseases**, vol. 18, p. 109-120, 2012.

ZIJNGE, V.; VAN LEEUWEN, M. B. M.; DEGENER, J. E.; ABBAS, F.; THURNHEER, T. *et al.* Oral Biofilm Architecture on Natural Teeth. **PLoS ONE**, e9321, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009321>>. Acesso em: 20 nov. 2020.

8

Biofilme Cariogênico

Rodrigo Alex Arthur

Sandra Liana Henz

Lina Naomi Hashizume

A cárie dental é uma doença multifatorial e biofilme-açúcar dependente. Nesse contexto, considera-se que a cárie dental se desenvolve na dependência da relação entre o biofilme dental bacteriano e fatores biológicos e sócio-econômicos. A presença de bactérias na superfície dental é considerada como *fator etiológico* primário, já que é indispensável para o aparecimento da doença. *Fatores determinantes* podem contribuir ou não para o desenvolvimento da cárie dental, dentre eles, a composição da placa dental e da saliva, capacidade tampão da saliva, fluxo salivar, composição e frequência da dieta, presença de fluoretos. Ainda, os *fatores modificadores*, como nível sócio-econômico, comportamento, conhecimento e atitude também estão envolvidos com a progressão da lesão de cárie. Em conjunto com a higiene bucal e outras medidas preventivas, como uso de flúor, o controle da dieta contribui de forma relevante para o controle da doença cárie.

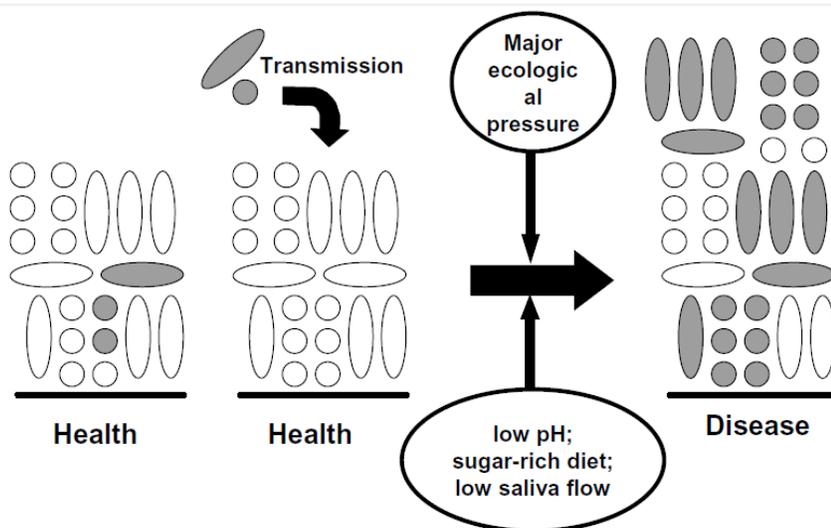
EVIDÊNCIAS HISTÓRICAS E ESTUDOS CONTROLADOS SOBRE CONSUMO DE AÇÚCAR E CÁRIE DENTAL

Existem muitas evidências que relacionam o frequente consumo de carboidratos fermentáveis e a prevalência da doença cárie. Em tempos remotos, quando a dieta consistia apenas de sementes cruas, grãos, raízes e ervas, a prevalência de cárie dental era muito baixa (HARDWICK, 1960). Entretanto, a incorporação de carboidratos fermentáveis na dieta alterou a prevalência de cárie na população. Um dos exemplos referentes ao papel da dieta na prevalência de cárie se refere ao estudo da popula-

ção da ilha de *Tristão da Cunha* (FISHER, 1968). Até a década de 30, com uma dieta baseada em vegetais, batatas, carne e peixe, a prevalência de cárie era muito baixa. Entretanto, após a década de 40, quando foram introduzidos carboidratos fermentáveis na dieta, a prevalência de cárie aumentou. As restrições dietéticas consequentes da *Segunda Guerra Mundial* provocaram uma expressiva redução na prevalência de cárie na Europa e no Japão, correspondentes à redução na ingestão de carboidratos fermentáveis (TOVERUD, 1957; TAKEUCHI, 1961). Em um estudo longitudinal com crianças de 6 a 13 anos, chamado de estudo do orfanato de *Hopewood House* (HARRIS, 1963), baixa prevalência de cárie foi encontrada nas crianças que viviam no orfanato com dieta lactovegetariana, mantidas com quantidades mínimas de açúcar, quando comparado a um grupo controle que tinha acesso aos carboidratos. Quando essas crianças deixaram a instituição, e a supervisão da dieta não estava mais presente, a prevalência de cárie aumentou. Além disso, indivíduos com *intolerância hereditária à frutose*, incapazes de ingerir frutose e sacarose, apresentaram baixa prevalência de cárie quando comparados aos indivíduos cuja dieta se baseava num alto consumo de carboidratos fermentáveis (MARTHALER, 1967; NEWBRUN *et al.*, 1980).

Experimentalmente, a relação entre dieta e cárie dental foi demonstrada pelo *estudo de Vipeholm* (GUSTAFSSON *et al.*, 1954). Esse estudo experimental demonstra uma relação entre consumo de açúcar e tipo de ingestão com o desenvolvimento de cárie. Nesse estudo, um grupo de deficientes mentais residentes no hospital de Vipeholm foi dividido em grupos de acordo com a disponibilidade e frequência de ingestão de carboidratos fermentáveis na dieta. Um grupo controle recebia dieta

com baixos níveis de carboidratos fermentáveis. Um dos grupos recebia carboidratos fermentáveis apenas nas refeições. Em outros grupos, os carboidratos fermentáveis eram oferecidos entre as refeições e com diferentes consistências (pegajosos e não-pegajosos). De forma geral, houve um aumento na experiência de cárie em todos os grupos, porém menos intensa no grupo que consumia o açúcar durante as refeições. Quanto mais frequente a ingestão de açúcares e quanto mais pegajosos os alimentos, maior a experiência de cárie observada. Esse estudo demonstrou a relação entre frequente ingestão de açúcares e consistência da alimentação e cárie dental. O *estudo de Turku* (SCHEININ & MÄKINEN, 1975), investigou o papel de substitutos do açúcar na prevalência de cárie. Esse estudo foi longitudinal e controlado, onde grupos de indivíduos consumiram uma dieta adoçada com sacarose, frutose ou xilitol. Sacarose e frutose foram cariogênicos, mas a completa substituição da sacarose por xilitol resultou numa substancial redução na incidência de cárie dental. A cariogenicidade relativa do amido em relação à sacarose também foi investigada num grupo de estudantes durante 2 anos de estudo. O grupo que possuía alta ingestão de amido e baixa ingestão de sacarose apresentou um menor incremento de cárie quando comparado ao grupo que possuía alta ingestão de sacarose e baixa ingestão de amido (RUGG-GUNN *et al.*, 1987).



(MARSH, 2003) Esquema ilustrativo de fatores que podem atuar sobre o biofilme dental na forma de pressões ecológicas e que promovem a transição do biofilme compatível com saúde para um biofilme compatível com doença. Observe o papel da dieta rica em açúcares nesse processo.

Do ponto de vista de desenvolvimento de cárie dental, tanto a **quantidade** de açúcar nos alimentos, a **frequência** de ingestão de alimentos ricos em carboidratos fermentáveis, quanto a **consistência** dos alimentos estão relacionadas ao potencial cariogênico desses alimentos (RUGG-GUNN, 1993). Trabalho *in situ* avaliou o efeito de diferentes concentrações de sacarose composição bioquímica do biofilme dental e na desmineralização do esmalte dental. Exposição à sacarose 20%, 8/dia durante 14 dias, produziu maior desmineralização dental quando comparada à exposição à sacarose em menores concentrações (AIRES *et al.*, 2006). Frequência se refere ao número de vezes que um alimento contendo açúcares fermentáveis é ingerido. Considerando a curva de queda de pH de Stephan, quanto maior a frequência de in-

gestão de carboidratos fermentáveis, mais frequentes serão as quedas de pH e durante mais tempo o dente estará numa condição na qual o pH está abaixo do crítico, potencializando a desmineralização dental. A consistência determinará a duração do tempo em que os dentes estarão expostos aos carboidratos fermentáveis. Alimentos líquidos são eliminados mais rapidamente que alimentos pegajosos ou aderentes. O **padrão** de ingestão dos alimentos também é muito relevante: o amido pode aumentar as propriedades de cariogenicidade da sacarose se forem consumidos ao mesmo tempo (RIBEIRO *et al.*, 2005). A adesividade do amido industrializado aumenta o tempo de retenção do açúcar na cavidade bucal, bem como reduz a taxa de limpeza salivar, resultando numa diminuição prolongada do pH.

COMPONENTES DOS ALIMENTOS INDUTORES DE CÁRIE

O potencial cariogênico dos alimentos está relacionado ao conteúdo de vários açúcares (glicose, frutose, sacarose, maltose, lactose e amido). Todos podem ser fermentados a ácidos, influenciando a quantidade e qualidade e também a cariogenicidade dos agregados bacterianos na superfície dental.

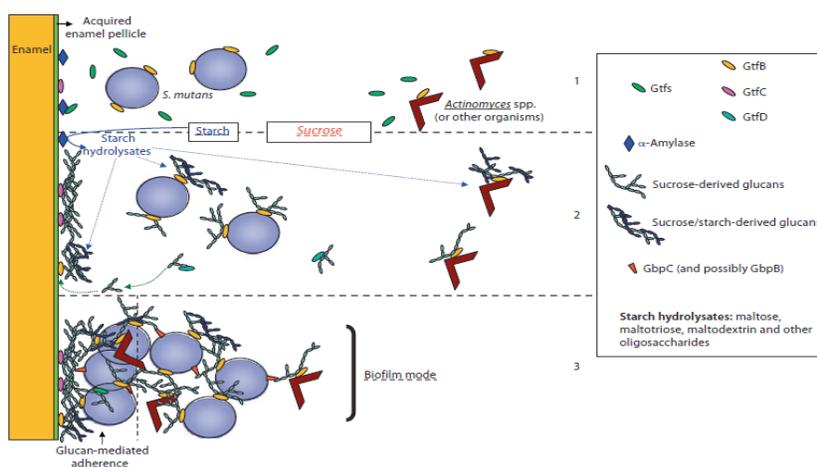
Sacarose

Todos os açúcares da dieta se difundem rapidamente pela placa dental e são fermentados até ácido e podem também ser armazenados como polissacarídeos intracelulares pelas bactérias.

Nesse contexto, cabe ressaltar que, diferentemente dos demais carboidratos fermentáveis, a sacarose se comporta de maneira distinta. Enquanto os demais carboidratos são apenas fermentáveis pelas bactérias, resultando em produção de ácidos, a sacarose, além de ser fermentável como seus monossacarídeos constituintes glicose e frutose, é substrato para a síntese de polissacarídeos extracelulares insolúveis (NEWBRUN, 1969). Esses polissacarídeos são sintetizados pela ação enzimática de glicosiltransferases produzidas por *Streptococcus mutans* (HAMADA & SLADE, 1980; LÖESCHE, 1986), que hidrolizam as moléculas de sacarose e polimerizam moléculas de glicose, formando glicanos insolúveis com ligação α 1-3 (RÖLLA, 1989). Três tipos de glicosiltransferases são produzidas pelos *Streptococcus mutans*: *gtfB*, que sintetiza polissacarídeos extracelulares insolúveis, *gtfC*, que sintetiza polissacarídeos solúveis e insolúveis e *gtfD*, que sintetiza polissacarídeos extracelulares solúveis (KURAMITSU, 1993). Esses polissacarídeos insolúveis desempenham papel fundamental no desenvolvimento do biofilme cariogênico, promovendo a aderência dos *Streptococcus mutans* à superfície dental e agregação bacteriana (RÖLLA *et al.*, 1985; RÖLLA, 1989; SCHILING & BOWEN, 1992), resultando num grande acúmulo de biofilme (CARLSSON & EGELBERG, 1965; SCHILING & BOWEN, 1992). Em acréscimo, a relação direta entre presença de polis-

sacarídeo extracelular insolúvel no biofilme dental e desenvolvimento de cárie dental tem sido experimentalmente demonstrada (PECHARKI *et al.*, 2005; RIBEIRO *et al.*, 2005; AIRES *et al.*, 2006).

Esses polissacarídeos extracelulares, principalmente os insolúveis, tornam o biofilme dental mais poroso (DIBDIN & SHELLIS, 1988), facilitando a difusão de substratos pelo biofilme, o que acarreta em maiores e mais prolongadas quedas de pH na superfície dental (ZERO *et al.*, 1986, 1992). Além disso, esses polissacarídeos extracelulares podem atuar como “colas” biológicas, viabilizando a aderência de bactérias à superfície dental (SCHILLING & BOWEN, 1992), viabilizando a formação e o acúmulo de placa. Além disso, menores concentrações de íons cálcio, fosfato e flúor têm sido encontrados no biofilme formado na presença de sacarose (CURY *et al.*, 1997; 2000). Esses íons são responsáveis pelo equilíbrio de solubilidade do dente e suas concentrações determinarão se o esmalte ou dentina desmineralizam quando ocorre queda de pH (PEARCE, 1998). Todas essas alterações contribuem para que a sacarose seja considerado o carboidrato mais cariogênico da dieta.



(BOWEN & KOO, 2011) Esquema ilustrativo do papel dos polissacarídeos extracelulares na formação do biofilme dental.

Sacarose x outros açúcares da dieta

Independente da diferença no potencial cariogênico entre sacarose e outros açúcares da dieta, todos os monossacarídeos (glicose, frutose) e dissacarídeos (lactose) da nossa dieta são cariogênicos. Todos são rapidamente fermentados pela placa dental, sendo obtidas curvas idênticas para a queda de pH da placa com glicose e frutose (encontradas nas frutas e no mel), maltose (derivada da hidrólise do amido) e sacarose, ao passo que a queda de pH com lactose é um pouco menor (NEFF, 1967). Apesar de glicose, frutose e sacarose serem rapidamente fermentadas a ácidos pelos micro-organismos da placa dental, estudos *in situ* compararam a cariogenicidade da sacarose com uma mistura de seus monossacarídeos constituintes, glicose e frutose. Em vista do que já foi relatado em relação às características do biofilme formado na presença de sacarose, maior desmineralização foi encontrada na presença de sacarose (CURY *et al.*, 2000; VALE *et al.*, 2007). Além disso, mesmo que a lactose seja menos acidogênica que os demais carboidratos, ela pode ser cariogênica para dentina. Estudo *in situ* verificou que exposição à adoçantes contendo lactose, 4x/dia, durante 14 dias, produziram desmineralização em dentina (AIRES *et al.*, 2002).

O amido é o principal carboidrato da nossa dieta porque é o principal armazenador de polissacarídeos das plantas. Está presente na batata, no arroz, no feijão, na mandioca. O amido é um polissacarídeo de glicose e, quando cru, é lentamente atacado pela amilase salivar, pois está numa forma insolúvel e protegido pelas membranas de celulose. Todavia, o aquecimento nas temperaturas utilizadas para cozinhar e assar provoca degradação parcial para uma forma solúvel, que depois pode ser total-

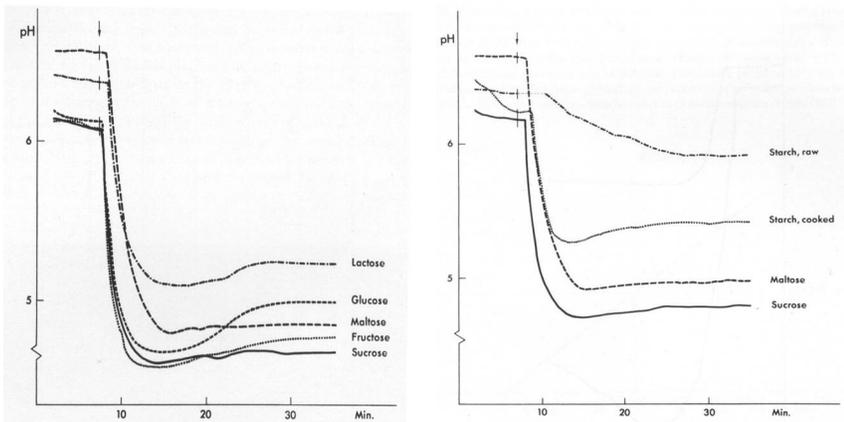
mente dissolvida pela amilase salivar e bacteriana, transformando-se em maltose, maltotriose, dextrina e pequenas quantidades de glicose. Como as moléculas de polissacarídeos são muito grandes para se difundirem na placa, o pH da placa cai muito pouco após o consumo de amido cru. Por sua vez, os carboidratos com baixo peso molecular ficam mais disponíveis para a fermentação bacteriana, e o amido solúvel ou cozido provocam quedas de pH um pouco menores do que os outros açúcares.

Pelo fato do amido cru ser lentamente atacado pelas enzimas salivares e induzir pequenas quedas de pH na placa dental, ele é considerado como não cariogênico ou com baixo potencial cariogênico quando utilizado como única fonte de carboidratos (LINGSTRÖM *et al.*, 1994). Entretanto, a sacarose pode ter seu potencial cariogênico aumentado quando consumida associada ao amido. Num estudo *in situ*, blocos de esmalte dental decíduo foram expostos à sacarose e amido separados ou em associação, 8x/dia, durante 14 dias. Maior desmineralização foi encontrada na presença da associação entre amido e sacarose (RIBEIRO *et al.*, 2005).

Polímeros de glicose, do tipo xarope de glicose ou de maltodextrinas, têm sido frequentemente adicionados aos alimentos para aumentar seu conteúdo energético. Não possuem gosto nem odor, e por isso não alteram o gosto nem o odor dos alimentos. Como esses oligossacarídeos são passíveis de hidrólise pela amilase salivar, eles são potencialmente cariogênicos. Estão presentes em bebidas doces, bebidas para infantes, doces, suplementos energéticos. Os isomalto-oligossacarídeos são comercialmente produzidos pela transglicosilação do amido ou da sacarose. Alguns estudos sugerem que esses oligossacarídeos são menos acidogênicos

que glicose ou sacarose e que podem até inibir a síntese de glucanos insolúveis a partir da sacarose. O xarope de milho, muito utilizado nos Estados Unidos, devido motivos tecnológicos e econômicos, possui pequenas vantagens do ponto de vista cariológico.

Os açúcares presentes nos medicamentos também apresentam uma ameaça à saúde oral. Alguns medicamentos têm que ser tomados várias vezes ao dia e geralmente antes de dormir, o que aumenta o tempo de permanência do açúcar na cavidade bucal, também considerando que durante à noite há redução no fluxo salivar.



(NEFF, 1967) Curvas de queda de pH do biofilme dental após exposição a diferentes açúcares.

CONCLUSÃO

Tendo visto o que foi exposto nos parágrafos anteriores, o padrão dietético do paciente deve ser avaliado durante a análise clínica e nutricional pois possibilitará ao profissional identificar a cariogenicidade da dieta e sua relação com a saúde bucal do paciente. Além disso, a análise da dieta for-

nece subsídios para a elaboração de um plano de tratamento adequado. O cirurgião-dentista e o nutricionista devem alertar o paciente quando o consumo de carboidratos fermentáveis estiver excedido e, juntamente com o paciente, esses profissionais devem propor mudanças para uma alimentação mais racional (carboidratos ingeridos nas principais refeições; redução na ingestão entre as refeições e de alimentos pegajosos).

É importante ter em mente que, em uma doença multifatorial como é a cárie dental, não se pode atribuir o seu desenvolvimento exclusivamente a uma única causa, como a dieta, por exemplo. Porém, o paciente deve ser alertado em relação ao papel desempenhado pela dieta no desenvolvimento da cárie dental. No entanto, há que relacionar a dieta a outros fatores, tais como a eficiência da remoção da placa dental e o uso de fluoretos numa abordagem mais completa em relação à prevenção da cárie dental.

REFERÊNCIAS

Livros e capítulos de livro

KIDD, E. A. M. Diet and caries. *In*: KIDD, E. A. M. **Essentials of dental caries**. 3rd edition. Oxford: Oxford University press, 2005. Cap. 5. p. 88-109.

ZERO, D. T.; MOYNIHAN, P.; LINGSTRÖM, P.; BIRKHED, D. The role of dietary control. *In*: FEJERSKOV, O.; KIDD, E. **Dental caries: The disease and its clinical management**. Second edition. Oxford: Blackwell-Munksgaard, 2008. Chapter 19. p. 329-352.

Artigos científicos

AIRES, C. P.; TABCHOURY, C. P. M.; DEL BEL CURY, A. A.; CURY, J. A. Effect of lactose-containing sweetener on root dentine demineralization in situ. **Caries Res**, 36, p. 167-169, 2002.

- AIRES, C. P.; TABCHOURY, C. P. M.; DEL BEL CURY, A. A.; KOO, H.; CURY, J. A. Effect of sucrose concentration on dental biofilm formed *in situ* and enamel demineralization. **Caries Res**, 40, p. 28-32, 2006.
- BOWEN, W. H.; KOO, H. Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. **Caries Res**, 45, p. 69-86, 2011.
- CARLSSON, J.; EGELBERG, J. Effect of diet on early plaque formation in man. **Odontol Revy**, 16, p. 112-125, 1965.
- CURY, J. A.; REBELLO, M. A. B.; DEL BEL CURY, A. A. *In situ* relationship between sucrose exposure and the composition of dental plaque. **Caries Res**, 31, p. 356-360, 1997.
- CURY, J. A.; REBELO, M. A. B.; DEL BEL CURY, A. A.; DERBYSHIRE, M. T. V. C.; TABCHOURY, C. P. M. Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in the presence of sucrose or glucose and fructose. **Caries Res**, 34, p. 491-497, 2000.
- DIBDIN, G. H.; SHELLIS, R. P. Physical and biochemical studies of *Streptococcus mutans* sediments suggest new factors linking cariogenicity of plaque with its extracellular polysaccharide content. **J Dent Res**, 67(6), p. 890-895, 1988.
- FISHER, F. J. A field survey of dental caries, periodontal disease and enamel defects in Tristan da Cunha. Methods and results. **Br Dent J**, 125, p. 447-453, 1968.
- GUSTAFSSON, B. E.; QUENSEL, C. E.; SWENANDER, L. L.; LUNDQVIST, C.; GRAHNÉN, H.; BONOW, B. E.; KRASSE, B. The Vipeholm dental caries study. **Acta Odontol Scand**, 11, p. 232-364, 1954.
- HAMADA, S.; SLADE, D. Biology, immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. **Microbiol Rev**, 44, p. 331-384, 1980.
- HARDWICK, J. L. The incidence and distribution of caries throughout the ages in relation to the Englishman's diet. **Br Dent J**, 108, p. 9-17, 1960.
- HARRIS, R. Biology of the children of Hopewood House, Bowral, Australia. Observations of dental caries experience extending over five years (1957-1961). **J Dent Res**, 42, p. 1367-99, 1963.
- LINGSTRÖM, P.; BIRKHED, D.; RUBEN, J.; ARENDS, J. Effect of frequent consumption of starchy food items on enamel and dentin demineralization and on plaque pH *in situ*. **J Dent Res**, 73, p. 652-660, 1994.

- KURAMITSU, H. K. Virulence factors of mutans streptococci: role of molecular genetics. **Crit Rev Oral Biol Med**, 4, p. 159-176, 1993.
- LÖESCHE, W. J. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. **Microbiol ver**, 50, p. 353-80, 1986.
- MARTHALER, T. M. Hereditary fructose intolerance. **Br Dent J**, 120, p. 597-599, 1967.
- NEFF, D. Acid production from different carbohydrates sources in human plaque *in situ*. **Caries Res**, 1, p. 78-87, 1967.
- NEWBRUN, E. Sucrose, the arch criminal of dental caries. **J Dent Child**, 36, p. 239-48, 1969.
- NEWBRUN, E.; HOOVER, C.; METTRAUX, G.; GRAF, H. Comparison of dietary habits and dental habits of subjects with hereditary fructose intolerance and control subjects. **J Am Dent Assoc**, 101, p. 619-26, 1980.
- PECHARKI, G. D.; CURY, J. A.; PAES LEME, A. F.; TABCHOURY, C. P. M.; DEL BEL CURY, A. A.; ROSALEN, P. L.; BOWEN, W. H. Effect of sucrose containing iron (II) on dental biofilm and enamel demineralization *in situ*. **Caries Res**, 39, p. 123-129, 2005.
- RIBEIRO, C. C. C.; TABCHOURY, C. P. M.; DEL BEL CURY, A. A.; TENUTA, L. M. A.; ROSALEN, P. L.; CURY, J. A. Effect of starch on the cariogenic potencial of sucrose. **British J Nutr**, 94, p. 44-50, 2005.
- RÖLLA, G.; SCHEIE, A. A.; CIARDI, J. E. Role of sucrose in plaque formation. **Scand J Dent Res**, 93, p. 105-111, 1985.
- RÖLLA, G. Why is sucrose so cariogenic? The role of glucosyltransferase and polysaccharides. **Scand J Dent Res**, 97, p. 115-119, 1989.
- RUGG-GUNN, A. J.; HACKETT, A. F.; APPLETON, D. R. Relative cariogenicity of starch and sugars in a 2-year longitudinal study of 405 English schoolchildren. **Caries Res**, 21, p. 464-473, 1987.
- RUGG-GUNN, A. J. Nutrition, diet and dental public health. **Community Dent Health**, 10, p. 47-56, 1993.
- PEARCE, E. Plaque minerals and dental caries. **N Z Dent J**, 94, p. 12-15, 1998.

SCHILLING, K. M.; BOWEN, W. H. Glucans synthesized *in situ* in experimental salivary pellicle function as specific binding sites for *Streptococcus mutans*. **Infect Immun**, 60(1), p. 284-295, 1992.

SCHEININ, A.; MÄKINEN, K. K.; TAMMISALO, E.; REKOLA, M. Turku sugar studies. XVIII. Incidence of dental caries in relation to 1-year consumption of sucrose and xylitol chewing gum. **Acta Odontol Scand**, 33, p. 269-278, 1975.

STEPHAN, R. M. Changes in hydrogen-ion concentration on tooth surfaces and in carious lesions. **J Am Dent Assoc**, 27, p. 718-723, 1940.

TAKEUCHI, M. Epidemiological study on dental caries in Japanese children before, during and after World War II. **Int Dent J**, 11, p. 443-457, 1961.

TOVERUD, G. The influence of war and post war conditions on the teeth of Norwegian school children II and III. **Millbank Mem Fund Q**, 35, p. 127-196, 1957.

VALE, G. C.; TABCHOURY, C. P.; ARTHUR, R. A.; DEL BEL CURY, A. A.; PAES LEME, A. F.; CURY, J. A. Temporal relationship between sucrose-associated changes in dental biofilm composition and enamel demineralization. **Caries Res**, 41, p. 406-412, 2007.

ZERO, D. T.; VAN HOUTE, J.; RUSSO, J. The intra-oral effect on enamel demineralization of extracellular matrix material synthesized by *Streptococcus mutans*. **J Dent Res**, 65(6), p. 918-923, 1986.

ZERO, D. T.; FU, J.; ANNE, K.; CASSATA, S.; MCCOMARCK, S. M.; GWINNER, L. M. An improved intra-oral enamel demineralization test model for the study of dental caries. **J Dent Res**, 71, p. 871-878, 1992.

9

Desenvolvimento da Lesão de Cárie

Rodrigo Alex Arthur
Lina Naomi Hashizume
Sandra Liana Henz

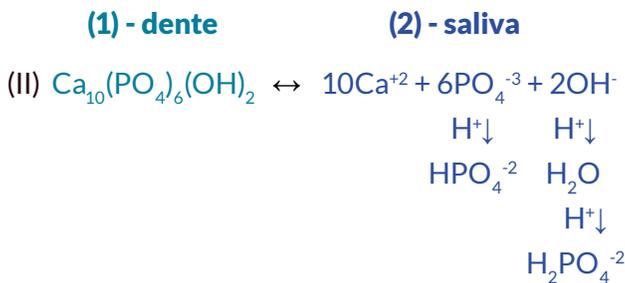
O esmalte dental é um tecido altamente mineralizado (contém apenas 1% do peso seco correspondente a material orgânico), formado por cristais de fosfato de cálcio, semelhantes à hidroxiapatita – $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, que, embora apresentem baixa solubilidade, são solúveis em meio aquoso (DAWES, 2003). Nessa condição, ocorre a dissolução da hidroxiapatita até que os íons que formam esse mineral se acumulem na saliva, havendo um equilíbrio entre a fase sólida (representada pelo dente) e a fase líquida (representada pela saliva). Esse equilíbrio é expresso por uma constante denominada *produto de solubilidade* (Kps), que representa a concentração de íons dissolvidos numa solução de um sólido pouco solúvel quando a dissolução entra em equilíbrio. Nessa condição de equilíbrio, diz-se que a solução está *saturada* em relação à solubilidade da hidroxiapatita. Nesse estágio, ainda existem trocas entre os íons da solução aquosa e o mineral do dente, porém essas trocas são mais lentas. Isso significa que, estando uma solução aquosa a 25°C, a HA se dissolverá até ser atingida na solução uma concentração molar de íons Ca^{+2} , PO_4^{-3} e OH^- na ordem de 10^{-117} , demonstrando a baixa solubilidade da HA em meio aquoso. Quimicamente, essa condição é atingida quando o produto de solubilidade da hidroxiapatita do dente (1) se iguala ao produto da atividade dos íons cálcio, fosfato e hidroxila na saliva (2), e pode ser representada de acordo com a reação I abaixo:



Esse equilíbrio segue o princípio de Le Chatelier (equilíbrio de ação das massas), onde a constante do produto de solubilidade é mantida, seja às custas de dissolução de mais minerais do sólido (dente), seja pela

precipitação no dente do excesso de íons na solução. Dessa forma, como esse equilíbrio é dinâmico, qualquer fator que modifique a concentração de qualquer um dos íons na saliva irá afetar a dissolução da hidroxiapatita. Uma redução na concentração de íons Ca^{+2} , PO_4^{-3} e OH^- no meio aquoso (saliva) deslocará o equilíbrio para o lado direito da equação I, promovendo dissolução da fase sólida até satisfazer novamente o produto de solubilidade da HA. Por sua vez, um aumento na concentração de qualquer um desses íons na solução promoverá a precipitação de mais minerais na fase sólida (dente), deslocando o equilíbrio para o lado esquerdo da equação I, mantendo o seu K_{ps} .

Entre os fatores que provocam o desequilíbrio da solubilidade da HA, a variação do pH no meio bucal é o mais relevante. Sendo assim, na presença de ácidos, há diminuição da concentração de dois dos 3 componentes do lado direito da equação 1, tornando a saliva *subsaturada* em relação à solubilidade da HA. Esses ácidos (representados na reação II pelos íons hidrogênio) se combinarão com os íons fosfato (PO_4^{-3}) e hidroxilas (OH^-) disponíveis na saliva (reação II). Como há redução na concentração dos íons PO_4^{-3} e OH^- na solução, o sólido se dissolve para manter o produto de solubilidade da HA, na medida em que a reação II se desloca no sentido de “dissolução” da hidroxiapatita (2), mobilizando mais íons para a fase aquosa.



Entretanto, quando o pH sobe (retornando aos valores normais – pH em torno de 7,0), há um aumento nas concentrações de PO_4^{-3} e OH^- na solução, tornando a fase aquosa *supersaturada* em relação ao produto de solubilidade da HA. Para manter o produto de solubilidade da HA, há deposição de minerais sobre a fase sólida, deslocando a equação II para o lado esquerdo.

Quando o pH de uma solução supersaturada é gradualmente diminuído, o ponto na qual a solução torna-se apenas saturada em relação ao mineral em questão (no nosso caso, a HA) é chamado de *pH crítico* (DAWES, 2003).

A cárie dental

Como já relatado acima, a integridade físico-química da hidroxiapatita do dente é governada pelo pH, e o dente se comportará da mesma forma que um sólido pouco solúvel dissolvido numa solução (saliva). Nesse contexto, frente a um desafio cariogênico, representado, por exemplo, pela ingestão de açúcares, haverá produção de ácidos devido ao metabolismo bacteriano do biofilme dental, reduzindo o pH na interface biofilme/superfície dental. Essa redução no pH reduz as concentrações de íons fosfato e hidroxila na fase aquosa (saliva, fluido da placa) e o equilíbrio representado pela reação II é deslocado para a direita, ou seja, o mineral do dente se dissolve para manter o produto de solubilidade da HA. Com base nas concentrações fisiológicas de Ca^{+2} , PO_4^{-3} e OH^- na saliva e no fluido do biofilme, estima-se que seja necessário que ocorra no meio ambiente bucal uma queda de pH abaixo de 5,5 para que o meio líquido perca a sua propriedade protetora. Esse é o pH crítico.

tico para desmineralização do esmalte. No caso da dentina, que possui menor conteúdo mineral (80% do peso seco), uma queda de pH abaixo de 6,5 seria suficiente para que houvesse perda de minerais (DAWES, 2003; CURY, 2001; TENUTA & CURY, 2005). Em ambos os casos, o dente sofre um processo de DESMINERALIZAÇÃO. Essa é a condição normalmente encontrada sob superfícies dentais cobertas por biofilme.

Porém, quando o pH sobe (retornando aos valores normais – pH em torno de 7,0), devido à ação do fluxo salivar, promovendo a depuração do açúcar ingerido durante a alimentação, e da capacidade tampão da saliva, neutralizando os ácidos produzidos pelas bactérias do biofilme dental, há um aumento na concentração de íons fosfato e hidroxilas no fluido da placa. Este torna-se supersaturado e o equilíbrio da reação II se desloca para a esquerda, promovendo a precipitação de minerais na superfície do dente. Sendo assim, ocorre a REMINERALIZAÇÃO de parte dos minerais perdidos durante a dissolução. Essa condição é normalmente encontrada na cavidade bucal, uma vez que a saliva e o fluido do biofilme são supersaturados em relação à hidroxiapatita, e por isso possui função remineralizante (reservatório de íons). A remineralização ocorre nos cristais parcialmente dissolvidos. Esses ciclos de desmineralização e de remineralização ocorrem frequentemente em todos os indivíduos, desde que algum acúmulo bacteriano esteja presente sobre os dentes e expostos a algum substrato fermentável. A reposição dos minerais dissolvidos nunca é eficiente para repor todo o mineral perdido, sendo que o desenvolvimento da lesão de cárie ocorre quando há um

desequilíbrio entre os eventos de des- e remineralização dental, com os de desmineralização sendo mais frequentes que os de remineralização dental (TENUTA & CURY, 2005).

Na presença de placa dental sobre o esmalte dental, aliada a uma deficiente remoção mecânica de placa e também aliada a uma dieta cariogênica, o esmalte dental, que quando hígido possui uma superfície brilhante e translúcida, adquire características branco-opaca, rugosa e porosa, típicas de uma lesão de mancha branca ativa. A falta de brilho na superfície se deve à perda de minerais e a aparência esbranquiçada reflete o aumento na porosidade interna da lesão devido a desmineralização. Essa dissolução dos minerais aumenta a porosidade do esmalte, permitindo com que a lesão de cárie seja detectada clinicamente. Com a dissolução dos cristais, há aumento no volume dos poros, que se tornam preenchidos por água. Quando a superfície do esmalte é seca com jato de ar, toda a água entre os cristais é removida e preenchida por ar. Existe uma diferença entre o índice de refração do ar (1,0), da água (1,3) e da hidroxiapatita (1,6). Como o índice da água é mais próximo do da hidroxiapatita, quando os poros estão preenchidos por água, pouca diferença é encontrada na translucidez do esmalte. Entretanto, quando a superfície é seca com jato de ar, e como o ar possui um índice de refração muito menor do que o da hidroxiapatita, o esmalte perde a sua translucidez e a região de desmineralização é observada como uma área branco-opaca, e devido à perda de minerais essa região também apresenta-se rugosa. Lesões pouco desmineralizadas necessitam de um tempo maior de secagem para serem observadas, ao passo que lesões mais desmineralizadas são facilmente identificadas, mesmo sem secagem da superfície.

Na medida em que a lesão progride no esmalte e atinge a dentina, essa também apresenta-se clinicamente como uma área amarelo-castanho claro, úmida e de tecido amolecido, características de lesão cariosa dentinária ativa. A completa paralisação da produção de ácidos na superfície resulta em gradual retorno ao pH neutro na parte interna da lesão, havendo difusão de prótons em direção à superfície externa, e, gradualmente, os fluidos do esmalte retornam ao estado de supersaturação em relação às apatitas. Isso implica dizer que a remoção mecânica de placa, associada ao controle de ingestão de carboidratos fermentáveis, são fatores necessários para o controle da doença cárie.

Composição química do esmalte e relação com a solubilidade da hidroxiapatita

Como já relatado, o esmalte dental é um tecido acelular e altamente mineralizado, formado por minerais do tipo hidroxiapatita. Possui 99% do peso seco correspondente a minerais e apenas 1% a conteúdo orgânico. Do conteúdo mineral, 37% é de cálcio, 52% é de fosfato e 3% é de hidroxila. Apesar de seu alto conteúdo mineral, o esmalte dental é um sólido poroso, devido à presença de proteínas e água, permitindo que essa estrutura mineralizada seja permeável e troque matéria com o meio ambiente. Além desses íons mais prevalentes na estrutura do cristal, a hidroxiapatita permite a inclusão de íons contaminante em locais normalmente reservados para íons cálcio, fosfato e hidroxilas. Zinco e Chumbo são encontrados mais nas camadas superficiais. Sódio e magnésio são encontrados nas camadas mais profundas. Das substi-

tuições, talvez as mais importantes sejam a substituição do fosfato por carbonato (cujas concentrações aumentam em profundidade) e de hidroxila por flúor (mais concentrados nas camadas mais superficiais). Há um limite de quantos carbonatos podem ser acomodados nos cristais de hidroxiapatita sem romper o cristal. Também, pode ocorrer 100% de substituição das hidroxilas por flúor (formando cristal de fluorapatita). Porém, essa condição não está presente nos tecidos biológicos. A substituição parcial das hidroxilas por flúor é compatível com a formação de um cristal do tipo fluorhidroxiapatita. As substituições iônicas influenciam as propriedades físicas e químicas do mineral, e o ponto mais importante é a alteração na sua solubilidade. A inclusão de carbonato na hidroxiapatita torna-a mais solúvel. Isso explicaria o porquê da cárie progredir mais rápido na dentina do que no esmalte, nos dentes decíduos e nos dentes recém-erupcionados.

REFERÊNCIAS

CURY, J. A. Uso do flúor e controle da cárie como doença. *In*: BARATIERI, L. N. et al. **Odontologia restauradora: fundamentos e possibilidades**. São Paulo: Ed. Santos, 2001. Cap 2. p. 31-68

DAWES, C. What is the critical pH and why does a tooth dissolve in acid? **J Can Dent Assoc**, 69, p. 722-724, 2003.

TENUTA, L. M. A.; CURY, J. A. Fluoreto na prática de promoção de saúde individual e coletiva. **Cadernos da ABOPREV IV**, Rio de Janeiro, p. 2-7, 2005.

10

Erosão Dentária

Lina Naomi Hashizume

Rodrigo Alex Arthur

Sandra Liana Henz

O termo erosão dentária é usado para descrever o resultado físico de uma perda patológica, crônica, localizada e indolor de tecido dental mineralizado submetido quimicamente ao ataque ácido, sem o envolvimento de bactérias.

A erosão difere da cárie dentária porque é uma perda irreversível de tecido dentário mineralizado por meio de processo químico que não envolve bactérias. Ao contrário da cárie, a erosão ocorre em locais onde não há biofilme dentário.

FATORES ETIOLÓGICOS DA EROSÃO DENTÁRIA

A erosão dentária não é um fenômeno novo, mas tem recebido crescente atenção devido ao aumento de sua prevalência observado por modificações nos hábitos das populações. Além disso, o aumento da longevidade dos dentes na cavidade bucal faz com que os dentes estejam expostos por mais tempo aos efeitos clinicamente deletérios da erosão dentária. A fisiopatologia da erosão dentária é modulada por múltiplos fatores incluindo o comportamento do hospedeiro, fluxo salivar, película adquirida e o microambiente que cerca o dente. Como resultado desta dependência multifatorial, a erosão pode apresentar uma alta prevalência e uma evolução potencialmente rápida e destrutiva.

Evidências indicam que o desenvolvimento das erosões dentárias está associado a um agente causal, seja ele de origem intrínseca ou extrínseca, que é o componente ácido. O acesso ao flúor e as medidas preventivas de combate às caries resultaram em um aumento significativo do número médio de dentes por indivíduo, inclusive entre as faixas

etárias mais elevadas da população. Há uma percepção geral de que os desgastes dentários, como abrasão, atrição e erosão, estão aumentando devido à associação entre a permanência dos dentes em boca por períodos mais prolongados e os componentes da dieta moderna, como os ácidos utilizados na constituição e conservação de alimentos industrializados. Mas, mesmo a importância da dieta na etiologia dos desgastes dentários sendo reconhecida, é pouco compreendida. Um desgaste dentário severo pode impor restrições dietéticas com consequências na ingestão de alimentos e no status nutricional dos indivíduos afetados, sendo este um problema de crescente preocupação.

PATOGÊNESE DAS EROSÕES DENTÁRIAS

Quando a superfície de esmalte é exposta a uma solução subsaturada em relação à hidroxiapatita e à fluorapatita, a fluoridroxiapatita do esmalte é dissolvida sem formar fluorapatita no esmalte da superfície, e nenhuma camada superficial permanece para cobrir o corpo da lesão debaixo da superfície. Ao contrário, o esmalte é dissolvido camada por camada e a lesão tem as características de erosão.

As bebidas ácidas, portanto, são diretamente relacionadas com o processo erosivo na medida que são frequentemente subsaturados em relação a hidróxi e a fluorapatita.

Como característica micromorfológica de erosão no esmalte dentário, observam-se claramente as zonas de união entre os prismas quando é exposto a ácidos. Já as erosões na dentina iniciam-se nas áreas peritubulares densamente mineralizadas, que são preferencialmente dissolvidas

pelo contato com ácidos. Após apenas 5 minutos de exposição *in vitro* de dentes humanos a ácido cítrico 1%, já se observam, por meio de microscopia eletrônica de varredura, mudanças na superfície do esmalte. Com o aumento do tempo de exposição ao ácido, aumentam as mudanças na superfície do esmalte, tornando-se visíveis áreas de estrutura prismática devido à perda da camada de esmalte aprismático superficial. Essas mudanças progridem gradualmente, até que toda a camada de esmalte aprismático superficial do dente seja removida pela ação do ácido.

Etiologia das erosões dentárias

A erosão dentária pode ser classificada de várias formas. Todavia, a classificação mais comum é aquela feita de acordo com a etiologia, em que a erosão é denominada extrínseca, intrínseca ou idiopática, uma vez que os ácidos que produzem o desgaste dental podem ser exógenos, endógenos ou de origem desconhecida.

Erosão extrínseca

As erosões extrínsecas são resultado de ácidos exógenos. Estes podem ser ácidos que contaminam o ar ambiente, resultado do uso de medicamentos, ou ácidos oriundos da dieta. Os alimentos ácidos mais consumidos são as frutas cítricas e outras frutas frescas que contém ácido fosfórico, suco de frutas, além de refrigerantes e bebidas ácidas em geral. Mais recentemente, o ácido ascórbico (vitamina C), presente nas mais variadas bebidas, além de bebidas isotônicas e doces, colutórios e aspirina em pó, entre outros, foi identificado como agente cau-

sal significativo de erosão dentária. A erosão extrínseca pode também decorrer de contaminantes ácidos trazidos pelo ar do ambiente de trabalho, às vezes chamados ácidos industriais, ou pela água ácida de piscinas, um efeito colateral da adição de cloro nestas águas.

Erosão intrínseca

As erosões intrínsecas são resultados de ácidos endógenos, como os que compõem o suco gástrico. Estes, quando em contato com os dentes, devido a vômito recorrente, regurgitação ou refluxo, causam erosões dentárias. Entre as causas mais comuns da regurgitação ou vômitos estão as desordens alimentares de origem psicossomática como anorexia e bulimia; e as causas de origem somática como gravidez, alcoolismo, tratamento para alcoolismo, e desordens gastrointestinais.

Erosão idiopática

As erosões idiopáticas são resultado da ação de ácidos de origem desconhecida, isto é, uma patologia semelhante à erosão, em que nem os testes nem a anamnese são capazes de oferecer uma explicação etiológica.

Evidências obtidas a partir de experimentos de erosão dentária *in vitro*

Estudos *in vitro* examinaram a associação entre diferentes fatores causais e erosão do esmalte por meio de diferentes métodos como: microdureza superficial, microscopia eletrônica de varredura, perfilo-

metria e estereomicroscopia. De modo geral, os resultados destes experimentos indicam que os componentes da dieta (entre os quais já foram identificados: sucos naturais e industrializados de laranja, limão, maçã, toranja; sucos em pó de limão; refrigerante de limão, laranja e cola; bebidas alcoólicas como o vinho; bebidas isotônicas; colutórios; e aspirina entre outros) são capazes de provocar erosão nos modelos testados.

Evidências obtidas a partir de experimentos de erosão dentária em roedores

Alguns estudos, a partir da primeira metade do século XX, utilizaram roedores como modelo para investigação do potencial erosivo de alimentos ácidos. Os métodos utilizados para avaliação consistiam na atribuição de escores de destruição pré-definidas aos dentes dos animais testados. Entretanto, o uso e a interpretação de seus resultados são limitados pela qualidade do dado que fornecem.

Um estudo mais recente, realizado em ratos, avaliou o efeito de bebidas isotônicas sobre cárie e erosão dentária nas faces linguais dos molares mandibulares dos animais e que a adição de flúor a estas resultou em efeito preventivo tanto no desenvolvimento de cárie como no de erosão dentária (SORVARI *et al.*, 1996). Utilizando o mesmo protocolo de pesquisa, os mesmos autores avaliaram os molares de ratos por meio de microscopia eletrônica de varredura. Os resultados deste experimento são similares aos do anterior, dando suporte ao papel erosivo de bebidas esportivas e do potencial de proteção proporcionado pelo flúor, neste modelo experimental.

O potencial erosivo de um refrigerante de laranja, e suco de maçã foi avaliado por Mistry e Grenby (1993) em um estudo experimental com ratos. Os pesquisadores observaram que as áreas de erosão dentária dos animais que consumiram os sucos ou o refrigerante por seis semanas foram significativamente maiores que faziam parte de um grupo controle, indicando o potencial erosivo das bebidas testadas nesse modelo.

Evidências obtidas a partir de relatos de casos e estudos observacionais de erosão dentária

Em diversos relatos de casos clínicos onde havia diagnóstico de erosões dentárias, este foi associado ao consumo de quantidades expressivas de produtos de baixo pH como suco de frutas cítricas como, por exemplo, laranja e limão, vitamina C mastigável, e bebidas alcoólicas como o vinho.

Em uma série de casos, ocorre quando associada ao consumo excessivo de frutas e suco de frutas. Num estudo de frequência, indivíduos cuja dieta era composta por 95% ou mais de alimentos crus apresentaram um número significativamente maior de erosões dentárias do que voluntários de um grupo controle, indicando que o consumo de alimentos crus está associado a uma maior chance de erosões dentárias quando comparado ao consumo de uma dieta convencional.

Em outro estudo observacional, a frequência de erosões em indivíduos cuja dieta era lacto vegetariana foi significativamente maior do que em indivíduos de um grupo controle. Nesse estudo, a regressão

linear revelou que os principais fatores que afetaram as erosões dentárias foram o fluxo salivar e o consumo de vinagre, de conservas de vinagre, e de frutas silvestres ácidas.

A prevalência de erosões dentárias foi examinada em um estudo suíço, como uma amostra de indivíduos selecionados aleatoriamente e separados em dois grupos de diferentes faixas etárias. As faces dentárias foram utilizadas como unidade de análise. Foi observada uma prevalência maior de erosões para todas essas faces dentárias examinadas no estudo no grupo de faixa etária mais elevada. Neste mesmo grupo foram observados um número significativamente maior de dentes afetados por pessoa e uma maior severidade das erosões, com mais dentes apresentando dentina exposta do que no grupo de indivíduos mais jovens. Observou-se também que o consumo da dieta ácida influenciou significativamente a presença de lesões de face vestibular. Já nas faces linguais as erosões estavam associadas com vômitos crônicos. Nas faces oclusais, as variáveis associadas foram idade, consumo de frutas cítricas e suco de frutas.

Em outro estudo de prevalência de erosões dentárias mostravam-se um risco ocupacional. A prevalência de erosões dentárias nesses indivíduos foi muito alta devido à frequência com que são expostos aos vinhos. A severidade observada foi associada ao número de anos que os indivíduos estavam empregados como provadores de vinhos e com a presença de um baixo fluxo salivar não estimulado.

Os fatores de risco para erosão dentária foram investigados por Jarvinen *et al.* (1991), que enfatizavam a contribuição quantitativa de cada um dos fatores avaliados no desenvolvimento de erosões dentárias. Neste estudo, o risco para desenvolvimento de erosões dentárias

foi associado ao consumo de frutas cítricas mais de duas vezes por dia, consumo de refrigerantes uma vez por dia ou mais, o consumo diário de bebidas esportivas. O risco de erosão também foi alto quando havia sintomas gástricos, vômitos crônicos e naqueles onde o fluxo de saliva estimulado era baixo.

O papel da saliva na erosão dentária

A saliva apresenta muitas propriedades que podem servir como funções protetoras contra a erosão dentária. Dentre elas estão:

- a) Diluição e capacidade de limpeza salivar para agentes potencialmente erosivos;
- b) Neutralização e tamponamento de ácidos da dieta;
- c) Manutenção do estado de supersaturação próximo à superfície dentária devido à presença de cálcio e fosfato da saliva;
- d) Formação da película adquirida pela adsorção de proteínas e glicoproteínas salivares, que tem a habilidade de proteger a superfície de esmalte da desmineralização causada por ácidos da dieta;
- e) Fornecimento de cálcio, fosfato e possivelmente o flúor necessário para a remineralização.

Estudos clínicos com pacientes que apresentavam alterações no fluxo salivar mostraram que o baixo fluxo salivar e a baixa capacidade tampão foram associados com uma prevalência e severidade maior de lesões de erosão dentária.

Estudos têm demonstrado que uma dieta ácida tem uma forte influência no fluxo salivar, através de uma salivação antecipatória ao evento. Uma hipersalivação pode ocorrer também após episódios de vômitos e pode ser observada em indivíduos que sofrem de anorexia e bulimia nervosa, ruminação e alcoolismo crônico. Tem sido sugerido que isto poderia minimizar a erosão causada pelo suco gástrico. Entretanto, parece que o tempo e a quantidade de saliva produzida não são suficientes para que esta exerça o seu papel protetor. Pacientes que sofrem de doença do refluxo gastroesofágico não apresentam aumento de fluxo salivar, pois neste caso a resposta é involuntária e não coordenada pelo sistema nervoso autônomo.

O fluxo salivar também pode estar reduzido em casos de exercícios vigorosos devido à desidratação que pode induzir a um aumento na eliminação de fluidos corporais. Esse evento, associado ao alto consumo de bebidas isotônicas, pode explicar a prevalência de erosão dentária em esportistas.

O processo pelo qual as substâncias são removidas da cavidade bucal pela saliva é denominado de taxa de limpeza salivar. Esta taxa é influenciada diretamente pelo ato de deglutir e pelo fluxo salivar. Quando substâncias da dieta como açúcares ou ácidos são ingeridos, eles estimulam o fluxo salivar se eles estiverem concentrados acima do limiar do paladar. Parece haver correlação entre o fluxo salivar reduzido e a taxa de limpeza salivar.

A composição da saliva é considerada muito importante no processo de erosão. Este fluido é constituído por uma série de componentes inorgânicos e orgânicos. Dentre os inorgânicos, o bicarbonato está

relacionado com a capacidade tampão salivar, ao passo que o cálcio e o fosfato permitem a manutenção da integridade dos tecidos mineralizados do dente.

Na composição orgânica da saliva existe uma série de proteínas e glicoproteínas que podem influenciar vários aspectos da saúde bucal, além de concentrar os minerais como cálcio e fosfato na superfície dentária promovendo a remineralização e inibindo a desmineralização. A película salivar adquirida é um filme orgânico, livre de bactérias, que recobre tecidos duros e moles da cavidade bucal. Ela é composta de mucinas, glicoproteínas e proteínas, incluindo diversas enzimas. A eficiência protetora da película adquirida contra a erosão dentária é dependente de suas propriedades físicas, incluindo a sua composição, espessura e o seu tempo de maturação. A película adquirida exerce seu efeito protetor sobre a superfície dentária contra a erosão atuando como uma barreira de difusão ou uma membrana de permeabilidade seletiva, prevenindo o contato direto entre os ácidos e a superfície dentária. Como resultado é observado uma redução nas taxas de difusão de íons fosfato e cálcio para o meio bucal após exposição a condições ácidas, diminuindo a desmineralização. A película adquirida inibe significativamente a perda da microdureza superficial e o aumento da rugosidade superficial em esmalte dentário que ocorre como resultado de uma exposição a ácidos orgânicos. As mucinas têm sido relatadas por contribuir em larga extensão para o efeito protetor da película adquirida contra a erosão do esmalte dentário. Um estudo *in vitro* demonstrou que blocos de esmalte cobertos por película salivar formada em indivíduos sem erosão apresentaram menor perda mineral frente a soluções ácidas compara-

dos aqueles cobertos por película salivar formada em indivíduos com erosão dentária. Os autores sugerem que diferenças na composição da película salivar formada entre os dois grupos poderiam explicar uma maior ou menor proteção contra ácidos. A espessura da película adquirida varia grandemente na cavidade oral. Ela é mais espessa nas superfícies linguais de dentes inferiores, pois esta região está constantemente banhada pela saliva excretada pelas glândulas submandibulares e sublinguais. Estas variações na espessura da película salivar adquirida nos arcos dentários podem ser responsáveis pelos diferentes padrões de distribuição das lesões de erosão entre os indivíduos. Porém, pouco se conhece sobre o papel protetor da película adquirida formada sobre dentina na redução do desafio erosivo.

Tempo e erosão dentária

Alguns estudos *in vitro* examinaram o papel do tempo no desenvolvimento de erosões dentárias. Um experimento onde se avaliou a erosão do esmalte por meio da perfilometria revelou que há um padrão linear de perda mineral com o passar do tempo em espécimes de esmalte atacados por ácido. Zhang *et al.* (2000), também utilizando perfilometria como método, avaliaram longitudinalmente as modificações da superfície do esmalte desmineralizado com ácido acético por um período de 5 dias. Os resultados deste estudo também mostram um padrão linear de erosão dentária com o passar do tempo, com um aumento linear na rugosidade do esmalte dentário até aproximadamente 70 horas de

exposição ao ácido, período após o qual a desmineralização progrediu de maneira errática. Na dentina, também há indicações de que, com o tempo há uma progressão linear na desmineralização.

A prevalência e a severidade das erosões dentárias foram analisadas em um estudo realizado com provadores de vinhos suecos. Num outro estudo de prevalência onde os indivíduos foram divididos em grupos de duas faixas etárias, foi observada uma maior prevalência entre aqueles que estavam no grupo cuja idade era maior. Estes estudos observacionais dão suporte para o papel do tempo na frequência/prevalência e severidade de erosões dentárias.

Abordagem clínica das erosões dentárias

Em um estudo de mais de 500 casos, foram elencados seis grandes grupos de pacientes em risco para desenvolvimento de erosões dentárias severas, que são:

1. Indivíduos ativos e saudáveis cuja desidratação, devido ao ambiente de trabalho ou atividade esportiva, reduz a proteção dos dentes pela saliva contra ácidos de isotônicos e refrigerantes, e naqueles com adição de cafeína, como nos refrigerantes tipo cola;
2. Indivíduos portadores de estados de ansiedade, depressão, anorexia, bulimia ou consumindo medicação tranquilizante ou antidepressiva que tenha como efeito secundário diminuição da secreção salivar e sialodenoese reversível. A medicação resulta em perda de proteção salivar contra refrigerantes ácidos e contra vômitos intrínsecos;

3. Indivíduos com esofagite por refluxo gastroesofágico, algumas vezes associado ao alcoolismo. O álcool é uma droga que provoca desidratação, que tem efeitos de longo prazo sobre as glândulas salivares. A erosão é, nesses casos, produzida tanto pelos ácidos de vinhos ou bebidas fortes, quanto por ácidos intrínsecos do refluxo gastroesofágico;

4. Portadores de asma, em risco tanto pela acidez dos medicamentos como pela redução do fluxo salivar induzido por esses medicamentos;

5. Portadores de diabete e de doenças cardiovasculares que padecem de uma proteção reduzida dos dentes pela saliva como resultado de suas condições ou de medicação anti-hipertensiva e diurética;

6. Indivíduos com síndromes que podem ser genéticas, epigenéticas, ou iatrogênicas e que os colocam em risco de erosão por afetarem a salivação.

As lesões de erosão dentária se desenvolvem em forma de cálice nos ápices das cúspides, bordas incisais e arestas marginais; e lesões rasas, nas regiões cervicais dos dentes, e na ausência de abrasão e atrição. Entre as localizações frequentes das lesões em forma de cálice, estão as faces oclusais dos segundos pré-molares e molares mandibulares. As faces vestibulares e palatinas dos incisivos e caninos e primeiros pré-molares superiores são as localizações mais comuns das lesões cervicais.

Atenção especial deve ser dada a estes indivíduos em risco para desenvolvimento de erosões dentárias, incluindo-se os seguintes aspectos referentes ao seu histórico clínico: hábitos de dieta, distúrbios

gástricos, influência de fármacos, radioterapia e disfunção das glândulas salivares, exposição a ácidos no ambiente de trabalho e hábitos de dieta e uso crônico de medicamentos:

Os elementos-chave na prevenção das lesões de erosão dentária, independente de sua etiologia incluem medidas como:

1. Diminuição da frequência e severidade do desafio ácido (dieta);
2. Aumento dos mecanismos de defesa do corpo como fluxo salivar e formação da película salivar;
3. Aumento da resistência aos ácidos e remineralização das superfícies dentárias;
4. Prover proteção química (flúor);
5. Reduzir influências abrasivas (dentifrícios branqueadores, escovas de cerdas duras);
6. Promover proteção mecânica (protetores bucais, materiais odontológicos e restauradores).

Já os pacientes portadores de erosão dentária originada dos ácidos da dieta devem receber as seguintes recomendações:

1. Manter sua rotina de consultas odontológicas regulares;
2. Regular a frequência do consumo de alimentos e bebidas ácidas;
3. Restringir os alimentos ácidos às refeições principais;
4. Finalizar as refeições com alimentos neutros, como queijo;
5. Ao beber líquidos ácidos, não sorver ou bochechar;

6. Usar escova de cerdas macias e dentifrício pouco abrasivo;
7. Não escovar imediatamente após a ingestão de bebidas ácidas;
8. Fazer bochecho de flúor diariamente;
9. Usar goma de mascar sem açúcar para estimular o fluxo salivar.

É consenso entre os pesquisadores da área que as erosões dentárias são lesões cada vez mais frequentes, principalmente devido à retenção dos dentes em boca por períodos cada vez mais prolongados. É, portanto, de fundamental importância para o clínico compreender a etiopatogênese destas lesões, identificar os indivíduos em risco estabelecendo metas de prevenção, diagnosticar e tratar alterações encontradas, pois lesões severas podem tanto ter impacto importante sobre o estado dentário, como impor restrições dietéticas que podem repercutir significativamente sobre o status nutricional.

REFERÊNCIAS

- BARATIERI, L. N. Lesões não cariosas. *In*: BARATIERI, L. N. **Odontologia Restauradora**: fundamentos e possibilidades. São Paulo: Quintessense, 2006.
- HASHIZUME, L. N.; ARTHUR, R. A.; MALTZ, M. Erosão dentária. *In*: **Cariologia**: conceitos básicos, diagnóstico e tratamento não restaurador. São Paulo: Artes Médicas, p. 112-127, 2016.
- HUGO, F. N.; PADILHA, D. M. Erosão dentária – etiopatogênese, diagnóstico e tratamento. **Rev Med PUCRS**, 13(1), p. 83-89, 2003.
- LUSSI, A.; SCHLUETER, N.; RAKHMATULLINA, E.; GANSS, C. Dental erosion-an overview with emphasis on chemical and histopathological aspects. **Caries Res**, 45(Suppl 1), p. 2-12, 2011.

LUSSI, A. Dental erosion clinical diagnosis and case history taking. **Eur J Oral Sci**, 104(2 (Pt 2)), p. 191-198, 1996.

ZERO, D. T.; LUSI, A. Erosion-chemical and biological factors of importance to the dental practitioner. **Int Dent J**, 55(4 Suppl 1), p. 285-290, 2005.

11

Introdução ao Estudo do Flúor

Lina Naomi Hashizume

Rodrigo Alex Arthur

Sandra Liana Henz

A Odontologia passou por grandes mudanças conceituais no século XX. Entre elas, uma das mais significativas em termos de saúde foi o entendimento da cárie dentária como uma doença, o seu tratamento e a sua prevenção.

Sendo o desenvolvimento da cárie dentária decorrente do acúmulo de bactérias sobre os dentes e da ingestão frequente de açúcar, as medidas primárias para o seu controle seriam a desorganização periódica do biofilme dentário e o consumo racional de carboidratos fermentáveis.

Entretanto a medida de maior impacto para o controle do desenvolvimento da cárie tem sido o uso disseminado do flúor. Embora o seu uso isolado não impeça o desenvolvimento da cárie, apenas reduza a sua progressão, o declínio mundial da manifestação desta doença tem sido atribuído ao uso disseminado de uma ou mais formas de utilização do flúor.

Flúor é um termo utilizado para designar as formas iônicas, ionizáveis e não ionizáveis do elemento químico flúor. Esse elemento é um halogênio altamente reativo, considerado o elemento mais eletronegativo da natureza. Existem diversas fontes de flúor presentes no ambiente, como o solo (na crosta terrestre), as águas (em rios, lagos e mares, próximos a montanhas, rochas vulcânicas ou regiões de resíduos industriais), o ar (nos gases provenientes da atividade vulcânica, da queima de carvão e da produção industrial) e os alimentos (em alimentos marinhos, plantas, chás e vegetais).

Devido a sua elevada eletronegatividade, o flúor raramente é encontrado na sua forma pura. Geralmente, é encontrado na forma de compostos, tais como o HF, que consegue penetrar nas membranas celulares e agir no organismo, onde sofre processos de absorção e ex-

creção. Também, no organismo, o flúor atua na prevenção da cárie dentária, visto que inibe a desmineralização e ativa a remineralização. Entretanto, em grandes quantidades, pode ser tóxico.

Na Europa, a importância do Flúor na odontologia data do final do século XIX, utilizado de forma empírica. McKay foi o primeiro a relacionar o flúor à cárie dentária de forma científica ao observar que em Colorado Springs a maioria das crianças apresentava esmalte manchado (fluorose dentária) e pequena prevalência de cárie. Seu mérito foi perceber que as crianças de certas áreas não apresentavam dentes manchados mas, nelas, a prevalência de cárie era tão alta quanto em outras regiões dos Estados Unidos. McKay analisou as condições climáticas e os hábitos alimentares e percebeu que a água ingerida por ambos os grupos era a única diferença entre eles (alguns grupos eram abastecidos por água proveniente de poços rasos; outros grupos serviam-se de água retirada de poços profundos – estes apresentavam dentes manchados). Supôs, então, que algum elemento químico existente na água seria responsável pela diferença. A formulação dessa hipótese fez com que se iniciassem estudos sobre a água em algumas localidades onde a população apresentava dentes manchados.

A hipótese de McKay seria confirmada por Churchill (1931). Pesquisando a água de Bauxite, Arkansas, através de exame espectrográfico, o químico detectou 13,7 ppm de flúor: em 1909 a população havia passado a ser abastecida com água de um poço profundo recém perfurado – e, a partir de então, as crianças começaram a apresentar dentes manchados. O poço foi abandonado em 1927, antes mesmo que Churchill concluísse sua investigação em 1930. Sabendo dessa pesquisa, McKay

enviou a Churchill amostras de águas de algumas regiões do Colorado onde observara fluorose endêmica: foram encontrados altos níveis de flúor (2,0 a 12,0 ppm).

A hipótese de McKay foi confirmada e, a partir desses achados, o rumo das investigações foi o de estabelecer uma concentração de flúor nas águas que fosse capaz de produzir o máximo benefício de prevenção de cáries e o mínimo de prejuízo (fluorose) nas populações expostas.

Dean, que propôs a denominação fluorose dentária para os dentes manchados, chegou ao valor ideal de 1 ppm, admitindo variações segundo as características ambientais, após comparar dados sobre prevalência de fluorose dentária e cárie nos EUA. Ele também realizou estudos sobre a relação flúor-cárie-fluorose em 21 cidades americanas. Com base em seus estudos científicos, verificou-se que uma adequada concentração de flúor na água de abastecimento é capaz de reduzir a prevalência de cárie em aproximadamente 60%. Esse poder preventivo do flúor seria confirmado em centenas de estudos realizados posteriormente em todo o mundo.

O significado dessa descoberta levou Cox (1939) a propor que a American Dental Association (ADA) recomendasse oficialmente a fluoretação da água de abastecimento nos EUA. Isso viria a ocorrer em 1950, quando já estavam bem consolidados os resultados das primeiras experiências de fluoretação artificial da água de abastecimento.

Em 1942, verificou-se que havia uma importante correlação diretamente proporcional entre a prevalência de fluorose dentária e concentração de íon flúor na água de consumo e, também, uma importante correlação e, esta inversamente proporcional, entre a presença de íon

flúor e a prevalência de cárie dentária. Desde então, ficou estabelecido que o flúor presente na água de abastecimento público em uma concentração em torno de 1 mg/L promoveria a máxima redução no índice CPO-D, e que quando o teor excedia 1,5 mg/L, não havia melhora significativa no índice e, no entanto, predispunha a um aumento na ocorrência e na severidade de fluorose. A constatação da fluorose dentária precedeu a adoção da fluoretação da água de abastecimento público como medida benéfica à saúde bucal. Da observação de tais efeitos e do desejo de investigá-los, desencadeou-se uma série de estudos, que resultaram na descoberta da fluoretação da água de abastecimento público como medida de controle de cárie dentária.

Em 1945, começaram os primeiros estudos de fluoretação artificial da água, e a primeira cidade a ter suas águas de abastecimento fluoretadas foi Grand Rapids, nos EUA, adicionando 1 ppm de flúor na água. A medida reduziu em 50% a incidência de cáries.

No Brasil, oito anos após os estudos em Grand Rapids terem sido iniciados, a Fundação Serviços de Saúde Pública (FSESP), do Ministério da Saúde, implantou em 31 de outubro de 1953, o primeiro sistema de fluoretação de águas no Brasil. O primeiro município brasileiro a adicionar flúor nas águas de abastecimento público foi Baixo Guandu, no Espírito Santo. O teor de flúor natural da água era de 0,15 mg/L e teor ótimo final foi estabelecido em 0,8 ppm. A implantação da fluoretação ocorreu um ano após a recomendação da mesma no X Congresso Brasileiro de Higiene. Mantido como piloto, foi o pioneiro a comprovar os benefícios obtidos em outros

países na redução da cárie dentária. O índice CPO-D, das crianças na faixa etária de 6 a 12 anos de idade, em 1967, após catorze anos de iniciada a fluoretação das águas, apresentou uma redução de 67%.

Vários outros municípios brasileiros, posteriormente, passaram a adotar a fluoretação das águas de abastecimento público; em 1956, Marília iniciou a fluoretação e a primeira capital de Estado do país a fluoretar suas águas foi Curitiba, no Paraná, em 1958.

A partir de 1974, a fluoretação da água de abastecimento público passa a ser obrigatória no Brasil, onde existe Estação de Tratamento de Água (ETA), e é regulamentada por meio de legislação. A Lei Federal N° 6.050, de 24 de maio de 1974, dispõe sobre a fluoretação da água em sistemas públicos de abastecimento, sendo devidamente regulamentada pelo Decreto Federal n° 76.872, de 22 de dezembro de 1975, que dispõe sobre a obrigatoriedade da fluoretação, estabelecendo que “os projetos destinados à construção ou ampliação de sistemas públicos de abastecimento de água, onde haja estação de tratamento, devem incluir previsões e planos relativos à fluoretação de água”. Por sua vez, a Portaria do Ministério da Saúde n° 635/BSB, de 26 de dezembro de 1975, aprova e determina normas e padrões a serem seguidos, desde a concentração do íon flúor a ser utilizado, de acordo com as médias das temperaturas máximas anuais de cada região, até os compostos recomendados, para a correta implantação da fluoretação das águas de abastecimento.

A Organização Mundial da Saúde, a Organização Pan-Americana da Saúde, o Ministério da Saúde e todas as entidades nacionais representativas da área odontológica no Brasil recomendam a fluoretação

das águas de abastecimento público nos locais onde há indicação técnica para aplicação. O Brasil dispõe do segundo maior sistema de fluoretação de águas de abastecimento público de todo o mundo.

REFERÊNCIAS

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Guia de recomendações para o uso de fluoretos no Brasil / Ministério da Saúde**, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2009.

CARVALHO, R. B. *et al.* Influência de diferentes concentrações de flúor na água em indicadores epidemiológicos de saúde/doença bucal. **Ciênc. saúde coletiva**, Rio de Janeiro, v. 16, n. 8, p. 3509-3518, 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-81232011000900019&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 16 jun. 2015.

CHAVES, M. M.; FRANKEL, J. M.; MELLO, C. Fluoretação de águas de abastecimento público para a prevenção parcial da cárie dentária. **Rev Assoc Paul Cirurg Dent**, 7, p. 27-33, 1953.

DENTAL ASSOCIATION. Fluoridation in the prevention of dental caries. **Journal of the American Dental Association**, 43(2), p. 16, 1951.

FEJERSKOV, O. & KIDD, E. **Cárie dentária: A doença e seu tratamento clínico**. São Paulo: Santos, 2013.

NARVAI, P. C. Cárie dentária e flúor: uma relação do século XX. **Ciênc. saúde coletiva**, Rio de Janeiro, v. 5, n. 2, p. 381-392, 2000. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-81232000000200011&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 16 jun. 2015.

THYLSTRUP, A. & FEJERSKOV, O. **Tratado de cariologia**. Rio de Janeiro: Cultura médica, 1988.

UNITED STATES OF AMERICA. National Institute of Dental and Craniofacial Research. **The Story of Fluoridation**. Bethesda, MD, 2014. Disponível em: <<http://www.nidcr.nih.gov/oralhealth/Topics/Fluoride/TheStoryofFluoridation.htm>>. Acesso em 16 jun. 2015.

12

Mecanismo de Ação do Flúor

Rodrigo Alex Arthur
Lina Naomi Hashizume
Sandra Liana Henz

Atualmente, sabe-se que um dos principais responsáveis pela queda na prevalência e na velocidade de progressão de cárie dental é o amplo uso do flúor. Esse efeito anticariogênico foi observado em estudos realizados no início do séc. XX, nos quais foi verificado que indivíduos residentes em regiões cuja água de abastecimento continha flúor apresentavam menor prevalência de cárie dental quando comparados aos indivíduos de outras localidades nas quais o flúor estava presente em menores quantidades ou mesmo ausente, como relatam os trabalhos de Dean, McKay e Black. Dessa forma, foi estabelecida uma relação entre uso de flúor e redução na prevalência de cárie.

O primeiro conceito importante é: o mecanismo de ação do íon flúor é sempre o mesmo, independente do meio de utilização. Água fluoretada, dentifrícios, bochechos, produtos para aplicação profissional, materiais odontológicos que liberam fluoreto, todos agem da mesma forma: fornecem íons flúor para a cavidade bucal. Para entender este mecanismo de ação, é necessário mais do que o simples conceito de que o mineral fluorapatita (FA) é menos solúvel do que a hidroxiapatita (HA) da estrutura dental. Quando as primeiras observações de que populações que consumiam água naturalmente fluoretada apresentavam uma menor experiência de cárie foram feitas, acreditou-se que o mineral FA incorporado ao dente seria importante para diminuir a sua solubilidade. Essa idéia perdurou por mais de meio século, e ainda hoje vemos tal descrição em divulgações sobre o mecanismo de ação do flúor. No entanto, mesmo que o dente seja enriquecido com uma grande quantidade de flúor, sabemos que essa concentração não é suficiente para formação de FA (onde 100% das hidroxilas estão substituídas por íons flúor), mas sim

de um mineral do tipo fluorhidroxiapatita (FHA), cuja substituição das hidroxilas por flúor é incompleta. Apesar disso, sabemos que a solubilidade da FHA é menor quando comparada à HA.

De fato, quando o flúor está presente no ambiente bucal (devido por exemplo ao consumo de água fluoretada) ocorre formação de mineral do tipo FHA ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OHF}$), que se dissolve sob as mesmas condições já descritas para os minerais do tipo hidroxiapatita. Quando o pH está abaixo de 5,5 (pH crítico para o esmalte dental), a saliva torna-se subsaturada em relação à hidroxiapatita. Porém, ainda está supersaturada em relação à FHA. Nessa condição, ocorre dissolução do mineral do tipo hidroxiapatita. Entretanto, íons cálcio e fosfato, que foram perdidos devido a dissolução da hidroxiapatita, são depositados sobre a camada superficial do dente na forma de minerais do tipo FHA (TEN CATE *et al.*, 2003), reduzindo, dessa forma, a perda líquida de minerais durante o desafio cariogênico. Essa supersaturação em relação aos minerais do tipo FHA é um dos responsáveis pela manutenção da integridade da camada superficial do esmalte. Assim, ocorre dissolução da hidroxiapatita, que se encontra abaixo da superfície, e deposição de FHA na superfície dental, o que previne a dissolução adicional do corpo da lesão de cárie. Esse evento ocorre até que o pH não seja inferior a 4,5, quando, então, a saliva torna-se subsaturada em relação à FHA, havendo dissolução tanto de mineral do tipo hidroxiapatita, quanto do tipo FHA, causando erosão dental. Além disso, quando o pH estiver maior que o pH crítico para esmalte ou dentina, além de deposição de hidroxiapatita na superfície dental, o meio torna-se altamente supersaturado em relação à FHA, acelerando o processo de preci-

pitação de minerais na superfície dental. Dessa forma, o flúor apresenta papel de **reduzir a desmineralização** e de **ativar a remineralização** dental (CURY, 2001).

O fato de haver deposição de FHA na camada superficial durante os eventos de desmineralização e remineralização é responsável pela manutenção da integridade da camada superficial do esmalte. Essa formação de FHA às custas da HA dissolvida faz com que haja um aumento no conteúdo de apatita fluoretada nas camadas mais externas da lesão cariosa. Quanto maior a supersaturação em relação à FHA, mais grossa e menos desmineralizada a camada superficial permanecerá. Há perda de minerais no corpo da lesão, havendo apenas desmineralização subsuperficial.

Além disso, na presença de flúor há **redução do pH crítico** para desmineralização do esmalte e da dentina. Na presença de flúor, o pH crítico cai de 5,5 para 4,5 para o esmalte, e de 6,5 para 5,5 para a dentina.

Formação de fluoreto de cálcio na superfície dental

Após o uso de produtos contendo elevadas concentrações de flúor (acima de 100 ppm F), como dentifrícios, enxaguatórios, géis e vernizes fluoretados, grande quantidade de flúor se torna disponível na saliva, permitindo a formação de cristais do tipo FHA (como descrito anteriormente) e de glóbulos de fluoreto de cálcio (CaF_2) na superfície dental. Inevitavelmente, esses cristais de fluoreto de cálcio se dissolveriam no meio bucal já que a saliva é subsaturada em relação à solubilidade do fluoreto de cálcio. Porém, esses cristais são cobertos por uma camada de fosfatos provenientes da saliva, retardando a sua dissolução.

Quando há redução no pH da cavidade bucal, essa camada de fosfatos é solubilizada e os cristais de fluoreto de cálcio são dissolvidos, disponibilizando íons flúor para reduzir a desmineralização e ativar a remineralização (CHRISTOFFERSEN *et al.*, 1988; TEN CATE, 1997). Na ocasião do aumento no pH, os cristais remanescentes são novamente recobertos pela camada de fosfato, protegendo esses cristais de fluoreto de cálcio até um próximo evento de queda de pH. Dessa forma, esses cristais de fluoreto de cálcio atuam como um reservatório temporário e de liberação lenta de flúor para o meio bucal, disponibilizando flúor durante as quedas de pH (OGAARD, 2001).

Alguns fatores podem interferir diretamente na formação de fluoreto de cálcio sobre a superfície dental. Primeiramente, forma-se mais fluoreto de cálcio quanto maior a concentração de flúor no meio utilizado (SAXEGAARD & RÖLLA, 1988). Dessa forma, na presença de géis fluoretados (com 9.000 a 12.300 ppm de flúor) e vernizes fluoretados (com 22.600 ppm de flúor), há maior formação de minerais do tipo fluoreto de cálcio do que na presença de dentifrício fluoretado (1100 ppm de flúor). Em pH mais ácido, por exemplo, pH 3 a 4, forma-se mais fluoreto de cálcio do que em pH 7,0, já que a reatividade do flúor com o esmalte dental é função inversa do pH do meio (FRIBERGER, 1975; SAXEGAARD & RÖLLA, 1988; DELBEM & CURY, 2002). Nesse caso, maior quantidade de fluoreto de cálcio é formado na presença de gel fluoretado acidulado do que em na presença do gel neutro. Além disso, por possuírem maior concentração de minerais à base de carbonato (do tipo apatita carbonatada), forma-se mais fluoreto de cálcio na dentina e no dente recém-erupcionado quando comparado ao esmalte dental.

Esses minerais à base de carbonato são mais solúveis, e, quando dissolvidos, disponibilizam íons cálcio para reagir com o flúor. Em acréscimo, mais fluoreto de cálcio é formado no esmalte com lesão de cárie do que no esmalte hígido, o que poderia reduzir a posterior progressão dessa lesão (CURY, 2001).

Atividade antimicrobiana do flúor

Além de inibir a desmineralização e ativar a remineralização, o flúor também possui **atividade antimicrobiana**. Alguns estudos sugerem que o flúor pode se complexar com íons magnésio, que são cofatores para a atividade da enzima enolase. Essa enzima, localizada no interior das bactérias, atua na via glicolítica, ou seja, está envolvida nos processos bioquímicos intracelulares responsáveis pela produção de ácidos e de energia pelas bactérias. Como o cofator necessário para o correto funcionamento dessa enzima torna-se indisponível devido à ligação com o flúor, a atividade enzimática da enolase é inibida, reduzindo, dessa forma, a capacidade das bactérias em produzirem energia e manterem-se vivas (HAMILTON, 1977, 1990). Além disso, o flúor também pode comprometer a viabilidade celular bacteriana, pois inibe a atividade de um componente da membrana celular bacteriana, denominado de bomba F-ATPase, que é responsável pela manutenção do pH intracelular bacteriano em condições ótimas (SUTTON *et al.*, 1987). Essa bomba transporta íons hidrogênio para fora das bactérias evitando a acidificação do meio intracelular, o que comprometeria a atividade de enzimas ácido-sensíveis, e, conseqüentemente, o metabolismo bacteriano. Ape-

sar desses efeitos, ainda existem dúvidas se os efeitos antimicrobianos do flúor trazem contribuição efetiva para prevenção de cárie (VAN LOVEREN, 2001), uma vez que tais efeitos foram observados somente em estudos laboratoriais e utilizando concentrações de flúor não compatíveis com uma condição clínica.

Didaticamente, os meios de uso de flúor foram classificados como SISTÊMICOS e TÓPICOS.

Meios sistêmicos x meios tópicos

Meio Sistêmico

Durante muito tempo, preconizou-se que o flúor seria importante apenas no período pré-eruptivo e que, para desempenhar o seu papel, o flúor deveria ser ingerido. Isso justificava o termo “sistêmico” atribuído a alguns métodos. Naquela época, preconizava-se ainda ingestão de suplementos e comprimidos contendo flúor para crianças e gestantes. Essa crença baseava-se no fato de que o produto de solubilidade da FA é menor do que da HA, e por isso pensava-se que se houvesse flúor na estrutura mineral do dente este teria menor solubilidade e seria mais resistente aos ácidos bacterianos. Acreditava-se, que, uma vez incorporada ao dente em formação, a FA garantiria “proteção” anti-cárie durante toda a vida do indivíduo. Esse conceito perdurou por mais de meio século. Entretanto, hoje sabe-se que o mineral formado não é FA, mas

sim FHA (como discutido acima). Por isso, a necessidade de ingerir flúor (por meio de suplementos ou comprimidos fluoretados) não é uma medida racional de uso de flúor.

Meio Tópico

Nos meios tópicos, por sua vez, o flúor estaria prontamente disponível e exerceria seu efeito anticárie atuando diretamente sobre a superfície dental. Por isso, faziam parte desse grupo os enxaguatórios, os vernizes, os géis e os dentifrícios fluoretados considerando os glóbulos de fluoreto de cálcio formados na superfície dental.

Porém, o conhecimento que hoje se tem sobre o mecanismo de ação do flúor nos diz que independente do método utilizado (água fluoretada, dentifrícios, enxaguatórios, géis ou vernizes fluoretados), o efeito será sempre tópico. Por isso, não é necessário incorporar flúor no dente em formação para que ele tenha efeito anti-cárie, mas sim garantir sua presença em níveis baixos constantemente na cavidade bucal. Dessa forma, o principal efeito do fluoreto na prevenção da cárie dental deve ser atribuído à sua ação no meio bucal, durante os processos de desmineralização e de remineralização que o esmalte e dentina estão sujeitos. Por isso, o efeito preventivo do flúor independe da idade do indivíduo e do meio de usar flúor. Ele deve estar presente no local correto (cavidade bucal) no momento correto (exposição a carboidratos fermentáveis) para interferir com os eventos de desmineralização e de remineralização.

Dessa forma, o que diferencia os meios sistêmicos dos meios tópicos é a forma como o flúor é distribuído na saliva e mantido constantemente no meio bucal. Nos meios sistêmicos, após a ingestão do flúor (por exemplo, água fluoretada), esse é absorvido no trato gastrointestinal, distribuído pelo sangue aos tecidos e, então, uma parte será excretada na saliva pelas glândulas salivares, sendo que os níveis de flúor na saliva são mantidos pelo equilíbrio em relação ao flúor presente no osso lábil. Nos meios “tópicos”, o flúor já está prontamente disponível na cavidade bucal no momento do uso desses meios, permitindo a formação de glóbulos de fluoreto de cálcio. Além disso, os depósitos de fluoreto de cálcio se dissolvem fornecendo flúor para o meio bucal. Por isso, o efeito anti-cárie desses meios depende da capacidade de “armazenamento” de flúor nesses reservatórios. Independente do meio utilizado (sistêmico ou tópico), as concentrações de flúor na cavidade bucal são mantidas devido à frequência de uso desses métodos, uma vez que não existe homeostasia na concentração de flúor na cavidade bucal.

Para evitar, então, uma interpretação errônea que os termos “sistêmicos” e “tópicos” poderiam dar, uma nova classificação foi proposta para os meios de uso de flúor. Sendo assim, a nova classificação (TENUTA & CURY, 2005; 2010) divide os meios de uso de flúor de acordo com sua abrangência e modo de aplicação em: comunitários (água fluoretada), individuais de auto-uso (dentifrícios, enxaguatórios) e individuais de uso profissional (géis e vernizes).

Como sugerido nos parágrafos anteriores, um dos principais fatores responsáveis pelo desequilíbrio iônico entre dente e o meio bucal é o acúmulo de bactérias sobre os dentes na forma de biofilme, e também

frequente ingestão de carboidratos fermentáveis. Dessa forma, o flúor exerce o seu papel de reduzir a desmineralização e de ativar a remineralização. Porém, ele não interfere nas causas da doença cárie. Apesar de seu uso estar relacionado à redução na prevalência de cárie e na progressão da lesão. Seu efeito é apenas parcial quando na presença de biofilme e dieta cariogênica. Por isso, os pacientes devem ser educados para a saúde. Esses pacientes devem ser motivados para manterem uma adequada higienização bucal, removendo a placa dental de forma eficiente e em níveis compatíveis com saúde. Além disso, o profissional deve alertar o paciente em relação ao consumo frequente de carboidratos fermentáveis e, juntamente com o paciente, propor mudanças para uma dieta mais saudável e compatível com saúde bucal. Essa abordagem é necessária para que o flúor desempenhe seu máximo efeito protetor. Dentifrício fluoretado (contendo de 1100 a 1500 ppmF) deve ser utilizado diariamente por todos os indivíduos (independente da idade). Enxaguatórios, géis e vernizes fluoretados devem ser indicados apenas para pacientes que apresentem atividade de cárie (lesões ativas de cárie).

REFERÊNCIAS

CHRISTOFFERSEN, J.; CHRISTOFFERSEN, M. R.; KIBALCZYC, W.; PERDOK, W. G. Kinetics of dissolution and growth of calcium fluoride and effects of phosphate. *Acta Odontol Scand*, 46, p. 325-336, 1988.

CURY, J. A. Uso do flúor e controle da cárie como doença, *In*: BARATIERI, L. N. *et al.* **Odontologia restauradora**: fundamentos e possibilidades. São Paulo: Santos, 2001.

DAWES, D. What is the critical pH and why does a tooth dissolve in acid? *J Can Dent Assoc*, 69(11), p. 722-724, 2003.

- DELBEM, A. C. B.; CURY, J. A. Effect of application of APF and NaF gels on microhardness and fluoride uptake of in vitro enamel caries. **Am J Dent**, 15(3), p. 169-172, 2002.
- FRIBERGER, P. The effect of pH upon fluoride uptake in intact enamel. **Scand J Dent Res**, 83(6), p. 339-344, 1975.
- HAMILTON, I. R. Biochemical effects of fluoride on oral bacteria. **J Dent Res**, 69, p. 660-667, 1990.
- HAMILTON, I. R. Effects of fluoride on enzymatic regulation of bacterial carbohydrate metabolism. **Caries Res**, 11, p. 262-291, 1977.
- OGAARD, B. CaF₂ formation: cariostatic properties and factors of enhancing the effect. **Caries Res**, 35(suplemento 1), p. 40-44, 2001.
- SAXEGAARD, E. & RÖLLA, G. Fluoride acquisition on and in human enamel during topical applications in vitro. **Scand J Dent Res**, 96(6), p. 523-535, 1988.
- SUTTON, S. V. W.; BENDER, G. R.; MARQUIS, R. E. Fluoride inhibition of proton-translocating ATPases of oral bacteria. **Infect Immun**, 55, p. 2597-2603, 1987.
- TEN CATE, J. M.; LARSEN, M. J.; PEARCE, E. I. F.; FEJERSKOV, O. Chemical interactions between the tooth and oral fluids. In: FEJERSKOV, O. & KIDD, E. A. M. **Dental caries: the disease and its clinical management**. Copenhagen: Blackwell Munksgaard, 2003. p. 49-69.
- TEN CATE, J. M. Review on fluoride, with special emphasis on calcium fluoride mechanisms in caries prevention. **Eur J Oral Sci**, 105, p. 461-465, 1997.
- TENUTA, L. M. A. & CURY, J. A. Fluoreto: da ciência à prática clínica. In: ASSED, S. **Bases científicas para a prática clínica**. São Paulo: Artes Médicas, 2005. Cap 4. p. 113-152.
- VAN LOVEREN, C. Antimicrobial activity of fluoride and its in vivo importance: identification of research questions. **Caries Res**, 35, p. 65-70, 2001.

13

Outros Açúcares e Substitutos da Sacarose

Lina Naomi Hashizume

Sandra Liana Henz

Rodrigo Alex Arthur

SACAROSE E OUTROS TIPOS DE AÇÚCARES DA DIETA

Independente da diferença no potencial cariogênico entre sacarose e outros açúcares da dieta, todos os monossacarídeos (glicose, frutose) e dissacarídeos (lactose) da nossa dieta são altamente cariogênicos. Todos são rapidamente fermentados pela placa dental, sendo obtidas curvas idênticas para a queda de pH da placa com glicose e frutose (encontradas nas frutas e no mel), maltose (derivada da hidrólise do amido) e sacarose, ao passo que a queda de pH com lactose é um pouco menor (JOHANSSON & BIRKED, 1995). Apesar de glicose, frutose e sacarose serem rapidamente fermentadas a ácidos pelos micro-organismos da placa dental, estudos *in situ* compararam a cariogenicidade da sacarose com uma mistura de seus monossacarídeos constituintes, glicose e frutose. Em vista do que já foi relatado em relação às características do biofilme formado na presença de sacarose, maior desmineralização foi encontrada na presença de sacarose (CURY *et al.*, 2000). Além disso, mesmo que a lactose seja menos acidogênica que os demais carboidratos, ela pode ser cariogênica para dentina. Estudo *in situ* verificou que exposição a adoçantes contendo lactose, 4x/dia, durante 14 dias, produziram desmineralização em dentina (AIRES *et al.*, 2002).

O amido é o principal carboidrato da nossa dieta porque é o principal armazenador de polissacarídeos das plantas. Está presente na batata, no arroz, no feijão, na mandioca. O amido é um polissacarídeo de glicose e, quando cru, é lentamente atacado pela amilase salivar, pois está numa forma insolúvel e protegido pelas membranas de celulose. Todavia, o aquecimento nas temperaturas utilizadas para cozinhar e

assar provoca degradação parcial para uma forma solúvel, que depois pode ser totalmente dissolvida pela amilase salivar e bacteriana, transformando-se em maltose, maltotriose, dextrina e pequenas quantidades de glicose. Como as moléculas de polissacarídeos são muito grandes para se difundirem na placa, o pH da placa cai muito pouco após o consumo de amido cru. Por sua vez, os carboidratos com baixo peso molecular ficam mais disponíveis para a fermentação bacteriana, e o amido solúvel ou cozido provoca quedas de pH um pouco menores do que os outros açúcares (THEILADE & BIRKED, 2005).

Pelo fato do amido cru ser lentamente atacado pelas enzimas salivares e induzir pequenas quedas de pH na placa dental, ele é considerado como não cariogênico ou com baixo potencial cariogênico quando utilizado como única fonte de carboidratos (LINGSTRÖM *et al.*, 1994). Entretanto, a sacarose pode ter seu potencial cariogênico aumentado quando consumida associada ao amido. Num estudo *in situ*, blocos de esmalte dental decíduo foram expostos à sacarose e amido separados ou em associação, 8x/dia, durante 14 dias. Maior desmineralização foi encontrada na presença da associação entre amido e sacarose (RIBEIRO *et al.*, 2005).

Polímeros de glicose, do tipo xarope de glicose ou de maltodextrinas, têm sido frequentemente adicionados aos alimentos para aumentar seu conteúdo energético. Não possuem gosto nem odor, e por isso não alteram o gosto nem o odor dos alimentos. Como esses oligossacarídeos são passíveis de hidrólise pela amilase salivar, eles são potencialmente cariogênicos. Estão presentes em bebidas doces, bebidas para infantes, doces, suplementos energéticos. Os isomalto-oligossacarídeos são comercialmente produzidos pela transglicosilação do amido ou da sacarose. Alguns

estudos sugerem que esses oligossacarídeos são menos acidogênicos que glicose ou sacarose e que podem até inibir a síntese de glucanos insolúveis a partir da sacarose. O xarope de milho, muito utilizado nos Estados Unidos, devido motivos tecnológicos e econômicos, possui pequenas vantagens do ponto de vista cariológico (ZERO *et al.*, 2013).

Os açúcares presentes nos medicamentos também apresentam uma ameaça à saúde bucal. Alguns medicamentos têm de ser tomados várias vezes ao dia e geralmente antes de dormir, o que aumenta o tempo de permanência do açúcar na cavidade bucal, também considerando que durante a noite há redução no fluxo salivar (MOYNIHAN *et al.*, 2005).

SUBSTITUTOS DA SACAROSE

Existem evidências na literatura de que o consumo frequente de produtos contendo sacarose na sua composição está associado ao desenvolvimento de lesões cáries. Deve-se, portanto, orientar os pacientes a consumir a sacarose de uma maneira mais racional, isto é, ingerindo os produtos açucarados menos frequentemente. Pode-se também optar pela substituição da sacarose por adoçantes menos cariogênicos, os chamados substitutos da sacarose.

Os substitutos da sacarose são substâncias com grau de doçura menor, igual ou maior à sacarose, mas que possuem um potencial cariogênico menor ou até mesmo nulo. São intensamente utilizados em alimentos e, como na maior parte das vezes possuem um elevado grau de doçura, são exigidos em pequenas quantidades. Frequentemente são misturados a outros açúcares não cariogênicos para dar “corpo” à substância.

Muitas pesquisas estão sendo conduzidas para encontrar os substitutos adequados para a sacarose. A utilidade destes compostos tem de ser avaliada do ponto de vista nutricional, odontológico, toxicológico, econômico e técnico. Existem dois grupos principais de substitutos da sacarose: os adoçantes calóricos e os não calóricos.

ADOÇANTES CALÓRICOS

Açúcares que não sejam a sacarose são atualmente usados em larga escala em muitos itens alimentares. A razão geralmente é de ordem econômica ou tecnológica do produto. Dentre os adoçantes calóricos, pode-se citar: amido, glicose, frutose, lactose, maltose, açúcar invertido, xarope de glicose etc.

Amido

Amido Cru: a amilase salivar não consegue extrair todo amido presentes nas células vegetais. As bactérias presentes na cavidade oral possuirão pouca disponibilidade de moléculas de maltose para a fermentação. Ocorre uma pequena queda de pH.

Amido Cozido: a parede celular das células vegetais está rompida e os grânulos de amido estão dispersos para sofrer ação da amilase salivar. Há presença de uma quantidade significativa de maltose e ocorre uma maior queda de pH.

Maltose: a amilase salivar não precisa quebrar o amido, visto que a maltose já está pronta para sofrer a ação das bactérias. Há uma grande queda de pH.

Sacarose: promove uma queda de pH praticamente igual à da maltose.

Portanto, quanto mais processado for o amido, maior o seu potencial cariogênico.

Quando o amido é associado com a sacarose, sua retenção na cavidade bucal aumenta, tornando esta associação mais cariogênica do que o consumo do amido isoladamente. A queda de pH provocada nesta situação torna-se mais parecida com a da sacarose pura.

Frutose e glicose

Tanto a frutose como a glicose são substratos para os micro-organismos cariogênicos produzirem ácidos. A quantidade de ácidos produzida a partir destes açúcares é equivalente ao daquela produzida a partir da sacarose. Entretanto, a sacarose ainda é o carboidrato mais cariogênico da dieta, pois, a partir dela, os micro-organismos produzem, além dos ácidos, os polissacarídeos extracelulares, que aumentam a cariogenicidade do biofilme dentário.

Mel

É um componente menos cariogênico e mais nutritivo do que a sacarose. Entretanto, é também considerado cariogênico devido à grande presença de açúcar. É composto 85% por açúcar e 15% por nutrientes.

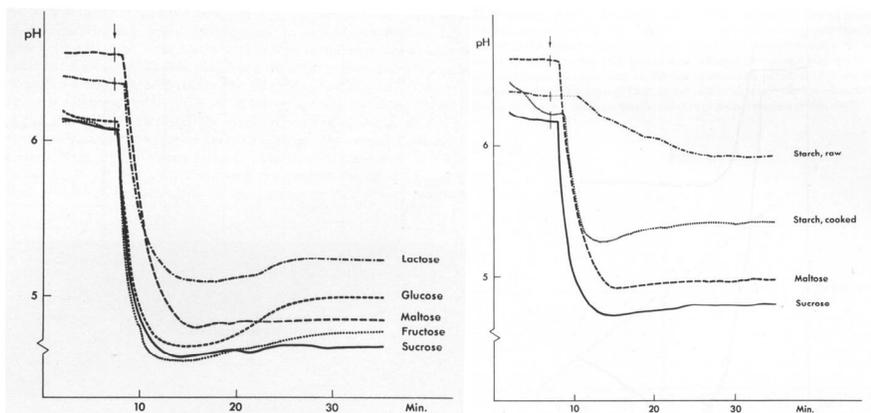


Figura 1. Curvas de pH após exposição do biofilme dentário a diferentes tipos de açúcares.

AÇÚCARES-ÁLCOOIS

Os açúcares-álcoois ou polióis são um dos substitutos mais comuns da sacarose. Dentre os adoçantes calóricos, os polióis tais como sorbitol e xilitol, representam um papel importante devido às boas propriedades tecnológicas (doçura, higroscopia e solubilidade), segurança bem-estabelecida e aceitação regulamentada. São frequentemente usados em doces, gomas de mascar, chocolates, geleias, medicamentos, dentifrícios entre outros. Por serem parcialmente absorvidos no intestino delgado e passarem para o cólon, podem induzir diarreia osmótica se a quantidade diária ingerida for elevada. Portanto não são recomendados para crianças menores de 3 anos, pois podem causar ainda problemas estomacais.

Sorbitol

É um açúcar-álcool de seis carbonos. Não pode ser utilizado pelos micro-organismos que predominam o biofilme dentário. Entretanto a maioria das espécies de *Streptococcus mutans*, lactobacilos e alguns outros micro-organismos orais menos frequentemente encontrados fermentam o sorbitol. Apesar de ele poder ser fermentado, a fermentação ocorre numa velocidade muito lenta e o pH final em culturas microbianas geralmente não alcança os níveis baixos observados com a glicose ou a sacarose.

POLIOL	UTILIZAÇÃO	DOÇURA	CARIOGENICIDADE
Sorbitol	Gomas de mascar, dentifrícios, balas	50%	Fermentação lenta Indivíduos com hipossalivação
Xilitol	Gomas de mascar, pastilhas, balas	100%	Não metabolizado pelos MOs
Manitol	Dentifrícios, enxaguatórios bucais, gomas de mascar	60%	Não metabolizado pelos MOs

Tabela 1. Diferentes polióis, sua utilização, poder de doçura e cariogenicidade. MOs: micro-organismos.

Xilitol

O xilitol é um pentitol, um açúcar-álcool com cinco carbonos. Vários estudos têm mostrado que a maioria dos estreptococos orais e outros micro-organismos não fermentam o xilitol. Em contraste com o sorbitol, o xilitol exerce um efeito bacteriostático sobre os *Streptococcus mutans*. O efeito é devido à entrada do xilitol na célula bacteriana, resultando em acúmulo de xilitol-5-fosfato.

ADOÇANTES NÃO CALÓRICOS

Existem muitos adoçantes não calóricos naturais e quimicamente sintetizados no mercado. Alguns possuem sabor doce muito intenso, milhares de vezes maiores que a sacarose. Os adoçantes não calóricos são empregados em diversos produtos alimentícios como: bebidas, doces, sobremesas, sorvetes, geleias. São também utilizados em dentifrícios e adoçantes em forma de pó ou gotas para adoçar café ou chá. Por razões de segurança, existem regulamentações rígidas sobre o uso dos adoçantes não calóricos, as quais variam entre os países. Entretanto, deve ser apontado que poucos efeitos colaterais desses adoçantes têm sido relatados em humanos. Os adoçantes não calóricos não são metabolizados pelos micro-organismos orais. Portanto, não são cariogênicos. Existem algumas limitações no consumo deste tipo de adoçante como: sabor desagradável, instabilidade e falta de volume entre outros.

ADOÇANTE	DOÇURA	EFEITOS	CARIOGENICIDADE
Aspartame	180x	Sabor residual, instabilidade a temperaturas altas, Fenilalanina	Não metabolizado pelos MOs
Sacarina	300x	Sabor residual, Permissão	Não metabolizado pelos MOs
Esteviosídeo	300x	Estável a altas temperaturas	Não metabolizado pelos MOs
Ciclamato	30x	Sabor residual	Não metabolizado pelos MOs

Tabela 2. Diferentes adoçantes não calóricos, sua doçura, seus efeitos e sua cariogenicidade. MOs: micro-organismos

Em pacientes com atividade de cárie, é sempre dever do cirurgião-dentista o aconselhamento dietético apropriado para cada caso. Portanto, os diferentes adoçantes disponíveis atualmente, tanto calóricos como não calóricos, podem ser utilizados como alternativa pelos pacientes que necessitem reduzir a frequência de consumo de alimentos com sacarose.

REFERÊNCIAS

AIRES, C. P.; DEL BEL CURY, A. A.; TENUTA, L. M. A.; KLEIN, M. I.; KOO, H.; DUARTE, S. *et al.* Effect of starch and sucrose on dental biofilm formation and on root dentine demineralization. **Caries Res**, 42(5), p. 380-386, 2008.

CURY, J. A.; REBELO, M. A. B.; DEL BEL CURY, A. A.; DERBYSHIRE, M. T. V. C.; TABCHOURY, C. P. M. Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in the presence of sucrose or glucose and fructose. **Caries Res**, 34, p. 491-497, 2000.

- JOHANSSON, I. & BIRKHED, D. A dieta e o processo cariogênico. *In: THYLSTRUP, A. & FEJERSKOV, O. Cariologia clínica.* São Paulo: Santos, 1995. p. 283-310.
- LINGSTRÖM, P.; BIRKHED, D.; RUBEN, J.; ARENDS, J. Effect of frequent consumption of starchy food items on enamel and dentin demineralization and on plaque pH in situ. **J Dent Res**, 73, p. 652- 660, 1994.
- MOYNIHAN, P.; LINGSTRÖM, P.; RUGG-GUNN, A. J.; BIRKHED, D. O papel do controle da dieta. *In: FEJERSKOV, O. & KIDD, E. Cárie dentária: a doença e seu tratamento clínico.* São Paulo: Santos, 2005. p. 223-237.
- RIBEIRO, C. C. C.; TABCHOURY, C. P. M.; DEL BEL CURY, A. A.; TENUTA, L. M. A.; ROSALEN, P. L.; CURY, J. A. Effect of starch on the cariogenic potential of sucrose. **Br J Nutr**, 94, p. 44-50, 2005.
- THEILADE, E. & BIRKHED, D. Dieta e cárie. *In: THYLSTRUP, A. & FEJERSKOV, O. Tratado de cariologia.* Rio de Janeiro: Editora Cultura Médica Ltda, 1988. p. 117-154.
- ZERO D. T.; MOYNIHAN, P.; LINGSTRÖM, P.; BIRKHED, D.; O papel do controle da dieta. *In: FEJERSKOV, O. & KIDD, E. Cárie dentária: a doença e seu tratamento clínico.* São Paulo: Santos, 2013. p. 329-352.

14

Infecções Odontogênicas

Deise Ponzoni

Edela Puricelli

INTRODUÇÃO

A cavidade bucal é caracterizada por apresentar uma microbiota diversa e complexa. As infecções que acometem a cavidade bucal podem ser divididas em: não odontogênicas e odontogênicas. Ambos os tipos podem progredir para áreas circunvizinhas da cabeça e pescoço, e, ainda, comprometerem outras áreas anatômicas, podendo estar associadas a complicações potencialmente fatais.

Origem das infecções dentárias

As infecções de origem dentária, conhecidas como infecções odontogênicas, são as mais comuns da região buco-maxilo-facial. Elas se iniciam a partir do comprometimento do órgão dentário e/ou de suas estruturas de suporte (gengiva e osso alveolar). Dessa forma, podem ter uma origem periapical e/ou periodontal, podendo estar associadas.

Situação clínica 1: A polpa dentária necrosada, resultado de cárie profunda, cria uma via para a penetração microbiana nos tecidos periapicais. O tratamento da polpa necrosada (por terapias endodônticas) ou a extração dentária poderão abortar a infecção.

Situação clínica 2: A presença de uma bolsa periodontal profunda pode possibilitar a inoculação de micro-organismos nos tecidos subjacentes. Isso pode ocorrer, mesmo estando o órgão dentário estruturalmente hígido. O tratamento periodontal ou a extração dentária poderão sanar a condição.

Características microbiológicas das infecções odontogênicas

As infecções odontogênicas são predominantemente bacterianas. Caracterizam-se pela presença de múltiplos micro-organismos (polimicrobiana), envolvendo aeróbios e anaeróbios. São causadas por micro-organismos endógenos, ou seja, que fazem parte da microbiota da cavidade bucal. Há o envolvimento, principalmente, de cocos aeróbios gram-positivos, cocos anaeróbios gram-positivos e bastonetes anaeróbios gram-negativos. Esses micro-organismos causam doenças como a cárie, gengivite e periodontite.

No paciente saudável, há um equilíbrio entre a presença microbiana e a resistência do hospedeiro. Entretanto, no hospedeiro sistemicamente comprometido, a infecção pode ocorrer com pouca ou nenhuma alteração nos fatores microbianos.

Características clínicas das infecções odontogênicas

Um quadro infeccioso agride o hospedeiro e desencadeia uma resposta inflamatória, como um mecanismo de defesa. Portanto, as infecções odontogênicas são acompanhadas por sinais inflamatórios locais. O paciente apresentará calor, rubor, tumor (aumento de volume), dor e limitações funcionais.

Clinicamente, as infecções odontogênicas apresentam-se como celulite ou abscesso. A fase de celulite corresponde a um processo agudo, onde o paciente geralmente manifesta dor intensa e há um aumento de volume endurecido. Essa fase representa uma condição de maior

gravidade, uma vez que o processo apresenta limites difusos e não há presença de exsudato purulento. A fase de abscesso caracteriza-se como uma condição crônica mais delimitada. Há sensação de flutuação à palpação, devido à presença de pus. Na fase clínica de celulite, há predominância de micro-organismos aeróbios e na fase de abscesso, micro-organismos anaeróbios.

A disseminação das infecções odontogênicas

Estando os tecidos invadidos por micro-organismos e uma vez estabelecida a infecção, poderá ocorrer a disseminação por contiguidade, por via linfática e via hematogênica, de forma isolada ou associada. A infecção pode seguir o trajeto através do osso esponjoso até encontrar a estrutura óssea cortical. Com o rompimento da cortical óssea, o processo invadirá os tecidos moles ou cavidades naturais (como por exemplo, o seio maxilar). No momento em que há perfuração da lâmina óssea cortical do alvéolo dentário, a infecção aparecerá em localizações anatómicas previsíveis. A espessura do osso que recobre o ápice dentário e a relação do local da perfuração no osso com as inserções musculares na maxila e mandíbula são determinantes para a localização da infecção originada de um órgão dentário. A disseminação poderá ocorrer tanto intrabucal quanto extrabucal, envolvendo os espaços fasciais.

A proximidade das raízes dos molares superiores pode propagar a infecção para o seio maxilar, causando sinusite odontogênica. A progressão pode levar ao envolvimento do seio etmoidal, cavidade orbitária e cavidade craniana. O abscesso cerebral é uma infecção grave e potencialmente fatal.

Os espaços fasciais são espaços potenciais que se manifestam como espaços reais, a partir da distensão tecidual promovida pela presença do exsudato infeccioso inflamatório. Os diretamente envolvidos são conhecidos como espaços fasciais de envolvimento primário da mandíbula (bucal, submandibular, submentoniano, sublingual) e da maxila (canino, bucal, infratemporal).

O envolvimento conjunto de espaços fasciais primários da mandíbula (submandibular, sublingual e submentoniano) caracteriza um quadro conhecido como Angina de Ludwig. A condição foi descrita pela primeira vez em 1836, pelo médico alemão Wilhelm Friedrich von Ludwig. É uma celulite de evolução rápida. Em cerca de 90% dos casos, origina-se de infecção dentária primária ou de uma sequela pós exodontia. Os principais dentes envolvidos são os segundos e terceiros molares inferiores. Outras fontes de infecção, além da dentária, são os abscessos peritonsilares ou parotidites supurativas. Os sinais e sintomas mais comuns incluem febre, calafrios, disfagia, edema, dor e rigidez envolvendo o pescoço. A presença de estridor pode indicar obstrução iminente das vias aéreas.

A extensão das infecções odontogênicas para além dos espaços fasciais de envolvimento primário e secundário (espaços massetérico, pterigomandibular, temporal) é incomum. No entanto, quando esta disseminação ocorre para os espaços cervicais profundos, pode ter sequelas sérias como a obstrução de vias aéreas e mediastinite.

O mediastino é uma das cavidades do tórax. Nele estão localizados o coração, parte dos grandes vasos e de outras estruturas como o esôfago, traqueia, timo, parte do sistema nervoso autônomo e do sistema linfático. A mediastinite descendente necrosante é uma infecção grave e progressiva que envolve o pescoço e tórax e, em cerca de 60 a 70%, tem como origem uma afecção dentária. O diagnóstico tardio, o emprego de fármacos e procedimentos de drenagem inadequados são os principais fatores que contribuem para a alta mortalidade da condição.

A sepse é uma das complicações mais graves associada às infecções odontogênicas. É definida como uma síndrome clínica caracterizada por uma disfunção orgânica secundária a um desequilíbrio na resposta do hospedeiro à infecção. Quanto maior o número de sistemas com disfunções, maior é a gravidade. Fatores de risco (abuso crônico de álcool, tabaco e obesidade) ou comorbidades (imunodeficiência, diabetes, hepatite, cirrose hepática, imunossupressão após transplante de órgãos, lúpus eritematoso) contribuem para esse desfecho, que pode ser fatal.

Princípios de tratamento das infecções odontogênicas

Há uma série de princípios que orientam o tratamento de pacientes com infecções odontogênicas. O cirurgião-dentista deve avaliar a gravidade da infecção, buscando identificar o(s) órgão(s) dentário(s) que originaram o processo e o envolvimento sistêmico do paciente em decorrência da condição. Infecções de rápida progressão associadas a dificuldades de respiração e deglutição, envolvimento de espaços fasciais com alterações dos sinais vitais (como elevação de temperatura, da frequência do pulso e da frequência respiratória) sugerem maior gravidade. Pacientes com esses quadros clínicos deverão ser encaminhados para atendimento especializado em ambiente hospitalar.

O princípio básico de tratamento das infecções odontogênicas consiste na execução de drenagem cirúrgica e remoção da causa. Entende-se como drenagem, por exemplo, a abordagem endodôntica para extirpação da polpa necrosada até procedimentos mais complexos como drenagens que implicam na incisão e desbridamento amplo dos tecidos.

Os antimicrobianos podem ser utilizados no tratamento de infecções odontogênicas, de forma isolada ou associados a terapias cirúrgicas. Esses fármacos constituem terapia específica e não sintomática. O uso de antimicrobianos só deve ser aplicado quando os achados clínicos são compatíveis com o diagnóstico de infecção. Cabe lembrar que num quadro infeccioso são observados sinais e sintomas não exclusivamente associados a essa condição.

Na grande maioria das vezes, o uso de anti-inflamatórios nas infecções odontogênicas é contra indicado uma vez que esses fármacos mascaram a expressão clínica do quadro infeccioso e limitam a defesa do hospedeiro em decorrência da reação inflamatória.

O controle de higiene bucal deve fazer parte do plano terapêutico dos pacientes com infecções odontogênicas. Os procedimentos devem ser adequados à condição clínica do paciente, uma vez que em situações graves, o mesmo poderá estar internado em ambiente de terapia intensiva. Além do controle mecânico de placa, podem ser utilizadas substâncias para o controle químico. Especialmente em pacientes críticos, manter a cavidade bucal limpa promove a redução da colonização da orofaringe e conseqüentemente a contaminação da traqueia, reduzindo a incidência de pneumonia nosocomial.

Exames microbiológicos nas infecções odontogênicas

Não há indicação de coleta de material biológico para realização de exames microbiológicos em todos os pacientes com infecções odontogênicas. A indicação de realização desses exames é restrita aos casos graves. Tal conduta é justificada pelo fato de que as características microbiológicas desse tipo de infecção são conhecidas (polimicrobiana, endógena, envolvimento de micro-organismos aeróbios e anaeróbios).

Diante de casos graves, a coleta de exsudato inflamatório/purulento deverá ser realizada através da técnica de punção aspirativa. A coleta de material com *swab* não é recomendada. A amostra clínica

deve representar o material do verdadeiro local da infecção e deve-se evitar a sua contaminação a partir de tecidos adjacentes. Portanto, o pus emergente não deve ser coletado.

Entre os diversos processos de análise microbiológica estão a caracterização pelo método de Gram e o teste de suscetibilidade aos antimicrobianos (TSA). O TSA contribui para a definição ou adequação de terapias com fármacos antimicrobianos em pacientes com infecções odontogênicas graves.

O estudo molecular para caracterização genotípica de micro-organismos envolvidos nas infecções odontogênicas não é justificado até o momento, devido à grande diversidade da microbiota e dos altos custos associados a esse tipo de análise.

Considerações finais

O cirurgião-dentista tem a reponsabilidade de informar todos os profissionais de saúde envolvidos no atendimento de um paciente com infecção odontogênica sobre o potencial agressor da microbiota bucal. Pacientes com comprometimentos sistêmicos são mais suscetíveis à disseminação das infecções odontogênicas, demandam um maior período de internação para tratamento e apresentam um risco aumentado de complicações que podem ser fatais.

REFERÊNCIAS

- AN, J.; MADEO, J.; SINGHAL, M. Ludwig Angina. [Updated 2019 Jul 3]. In: **StatPearls** [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2020. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482354/>>. Acesso em: 27 nov. 2020.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. **Módulo 4 : Procedimentos Laboratoriais**: da requisição do exame à análise microbiológica e laudo final/Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2013. 95p. 9 volumes.
- DELBET-DUPAS, C.; DEVOIZE, L.; DEPEYRE, A.; MULLIEZ, A.; BARTHÉLÉMY, I.; PHAM DANG, N. Are routine microbiological samplings in acute dental infections justified? Our 10-year real-life experience. **J Stomatol Oral Maxillofac Surg**, 20(5), p. 397-401, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jormas.2019.02.020>>. Acesso em: 27 nov. 2020.
- ESTRERA, A. S.; LANDAY, M. J.; GRISHAM, J. M.; SINN, D. P.; PLATT, M. R. Descending necrotizing mediastinitis. **Surg Gynecol Obstet**, 157(6), p. 545-552, 1983.
- OLIVEIRA, R. L.; RAFFAELE, R. M.; BALDO, M. E.; JARDIM, E. C. G. Brain abscess and odontogenic infection. Abscesso cerebral e infecção odontogênica. **Rev Bras Ter Intensiva**, 32(1), p. 161-162, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.5935/0103-507x.20200025>>. Acesso em: 27 nov. 2020.
- PRADO-CALLEROS, H. M.; JIMÉNEZ-FUENTES, E.; JIMÉNEZ-ESCOBAR, I. Descending necrotizing mediastinitis: Systematic review on its treatment in the last 6 years, 75 years after its description. **Head Neck**, 38 (Suppl 1), p. E2275-E2283, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/hed.24183>>. Acesso em: 27 nov. 2020.
- PURICELLI, E. *et al.* Quimioterapia antimicrobiana em cirurgia e traumatologia bucomaxilofacial. In: **Farmacologia clínica para dentistas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. p. 375-385.
- PURICELLI, E. *et al.* Infecções na cavidade bucal. In: MORAIS, T. M. N. & NASCIMENTO DE MORAIS, A. S. **Fundamentos da odontologia em ambiente hospitalar/UTI**. 1. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015. 401p. ISBN 978-85-352-7792-0.

PURICELLI, E. Técnica anestésica, exodontia e cirurgia dentoalveolar. *In*: MORITA, M. C. **ABENO: Odontologia Essencial, Parte Clínica**. 1. ed. São Paulo: Artes Médicas, 2014. v. 1. 160p. ISBN 987-85-367-0229-2.

PURICELLI, E. Dentes retidos: qual a melhor conduta? *In*: CARDOSO, R. J. A.; GONÇALVES, E. A. N. *et al.* **Periodontia/Cirurgia/Cirurgia para implantes**. São Paulo: Artes Médicas, 2002. Cap. 18, p. 327-350.

RHODES, A.; EVANS, L. E.; ALHAZZANI, W. *et al.* Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. **Intensive Care Med**, 43, p. 304, 2017. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00134-017-4683-6>>. Acesso em: 27 nov. 2020.

SAKAMOTO, H.; AOKI, T.; KISE, Y.; WATANABE, D.; SASAKI, J. Descending necrotizing mediastinitis due to odontogenic infections. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, 89(4), p. 412-419, 2000. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S1079-2104\(00\)70121-1](https://doi.org/10.1016/S1079-2104(00)70121-1)>. Acesso em: 27 nov. 2020.

SINGER, M.; DEUTSCHMAN, C. S.; SEYMOUR, C. W. *et al.* The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). **JAMA**, 315 (8), p. 801-810, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1001/jama.2016.0287>>. Acesso em: 27 nov. 2020.

WEISE, H.; NAROS, A.; WEISE, C.; REINERT, S.; HOEFERT, S. Severe odontogenic infections with septic progress - a constant and increasing challenge: a retrospective analysis. **BMC Oral Health**, 19(1), p. 173, 2019. Disponível em: <<https://bmcoralhealth.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12903-019-0866-6>>. Acesso em: 27 nov. 2020.

15

Infecções Endodônticas: características microbiológicas e suas repercussões clínicas

**Pauline Mastella Lang
Francisco Montagner**

O QUE É ENDODONTIA?

A Endodontia é o ramo da Odontologia que se preocupa com a morfologia, a fisiologia e a patologia da polpa dental humana e dos tecidos perirradiculares. Seu estudo e prática englobam as ciências básicas e clínicas, incluindo a biologia da polpa normal e a etiologia, diagnóstico, prevenção e tratamento de doenças e lesões da polpa e condições perirradiculares associadas (Associação Americana de Endodontia – AAE, 2015).

COMO ACONTECE A INFECÇÃO ENDODÔNTICA?

A polpa dentária é um tecido conjuntivo com algumas características específicas, uma vez que está confinada em uma cavidade sólida e mineralizada, chamada de cavidade pulpar, que não permite expansão durante a vasodilatação, que ocorre no processo inflamatório (KIM, 1985). Os componentes do tecido pulpar são tecidos nervoso e vascular, fibras, substância fundamental, fluido intersticial, odontoblastos, fibroblastos e componentes celulares menores. O volume sanguíneo total no sistema de canais radiculares não pode ser aumentado, embora mudanças de volume recíprocas podem ocorrer entre arteríolas e vênulas (KIM, 1985). Assim, esse sistema de microcirculação necessita de um sistema colateral e de uma cuidadosa regulação do fluxo sanguíneo para a sobrevivência da polpa (KIM, 1985).

Os micro-organismos e seus subprodutos são os principais responsáveis pelas alterações que ocorrem na polpa dentária (BERGENHOLTZ, 1977). A exposição direta da câmara pulpar à cavidade bucal, aos túbulos dentiná-

rios e aos canais laterais é um meio de entrada para os micro-organismos no espaço endodôntico (HAHN *et al.*, 1991; HOSHINO *et al.*, 1992; RICUCCI; SIQUEIRA, 2010). Ao alcançar esse espaço, os micro-organismos atraem leucócitos, os quais contribuem para a fagocitose bacteriana e destruição do tecido pulpar (BERGENHOLTZ, 1981). Microabscessos são formados, promovendo mudanças irreversíveis no tecido pulpar, e consequentemente ocasionando a necrose pulpar quando não há intervenção por parte do profissional (RICUCCI *et al.*, 2014; RICUCCI *et al.*, 2019).

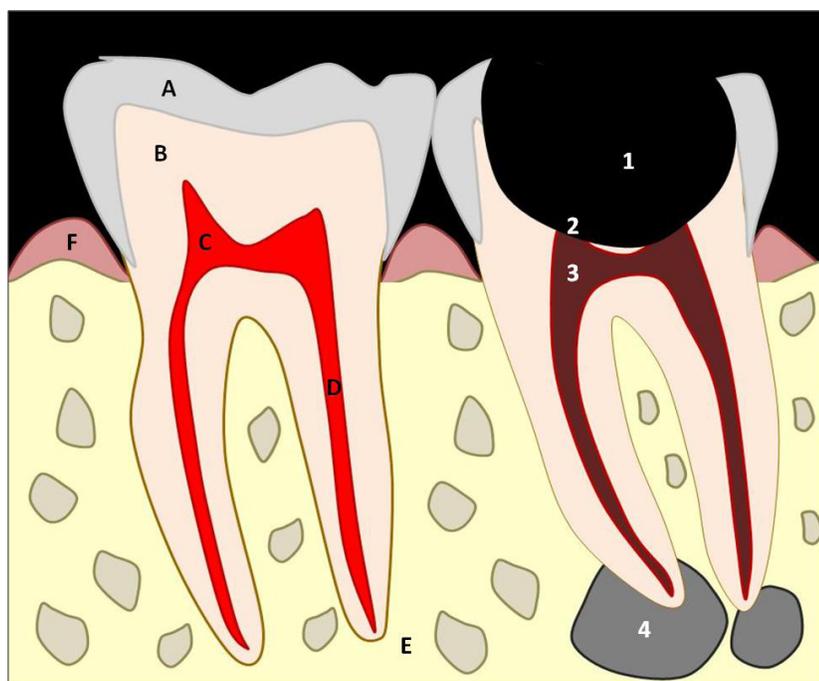


Figura 1 – Principal via de contaminação do sistema de canais radiculares. A – Esmalte; B – Dentina; C – Polpa Coronária; D – Polpa Radicular; E – Osso Alveolar; F – Gengiva; 1 – Cárie; 2 – Comunicação da Lesão de Cárie com a Câmara Pulpar; 3 – Necrose Pulpar; 4 – Lesão Periapical.

Quando o tecido pulpar necrosa e colapsa, o sistema de canais radiculares passa a ser um reservatório para micro-organismos e seus produtos metabólicos específicos, uma vez que o ambiente passa a fornecer condições para a sua sobrevivência e para o seu crescimento (SIQUEIRA, 2002). Além disso, a falta de circulação sanguínea dentro do tecido pulpar necrótico faz com que os micro-organismos não sejam alcançados pela resposta imune sistêmica e local (SIQUEIRA, 2002).

Em canais radiculares infectados, os micro-organismos e seus subprodutos estão presentes em todas as partes do sistema de canais radiculares incluindo áreas de achatamento (chamadas de istmos) ou anastomoses (NAIR, 1987; HORIBA *et al.*, 1990; TANOMARU *et al.*, 2008; SIQUEIRA *et al.*, 2002). As bactérias e seus subprodutos podem ser encontrados também no interior dos túbulos dentinários, atingindo profundidades próximas a 300 μm (HORIBA *et al.*, 1990; SIQUEIRA *et al.*, 2002). Segundo Love (1996), devido a características anatômicas, a presença de contaminação microbiana é mais intensa na região cervical do canal radicular, seguida das regiões média e apical.

Estruturalmente, a população microbiana encontra-se suspensa no lúmen do canal radicular, na forma planctônica, com uma variedade imensa de tipos morfológicos consistindo em cocos, bacilos e formas filamentosas, além de serem observados também na forma de densos agregados bacterianos aderidos às paredes do canal radicular (biofilmes) (NAIR, 1987).

Os micro-organismos, no entanto, não limitam a sua colonização apenas à luz do conduto ou à profundidade dos túbulos dentinários. Alguns desses micro-organismos, que possuem capacidade de superar

as respostas do mecanismo de defesa do hospedeiro, ultrapassam o forame apical ou os canais laterais, e espalham-se para os tecidos periapicais, juntamente com os seus produtos metabólicos tóxicos (SIQUEIRA, 2002), ocasionando defeitos localizados (NAIR, 1987).

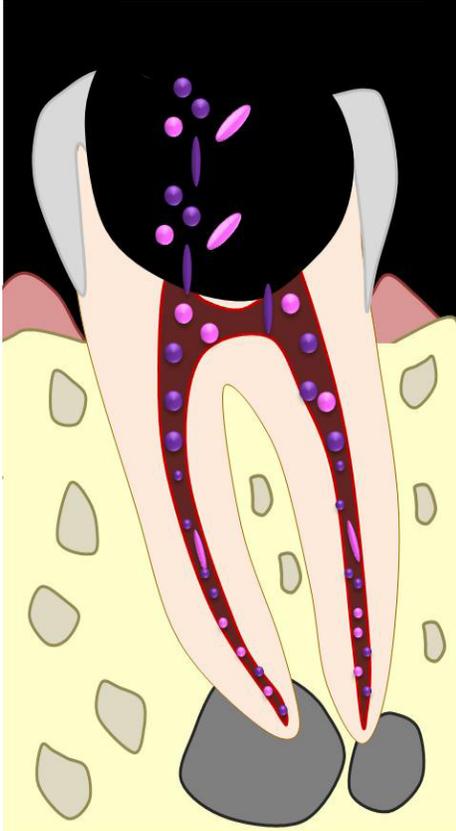


Figura 2 - Micro-organismos colonizando o canal radicular e induzindo alterações na região periapical.

Assim como outras infecções endógenas humanas, sabe-se que as infecções endodônticas, não são causadas por um único patógeno, mas por um conjunto de espécies geralmente organizadas em comu-

nidades. Assim, micro-organismos individuais proliferam no ambiente, originando populações, que por sua vez interagem entre si para formar uma comunidade. Portanto, quando o sistema de canais radiculares é infectado, ele passa a abrigar uma comunidade microbiana, a qual é composta por várias populações (SIQUEIRA; RÔÇAS, 2009a), e cujo perfil é influenciado pela localização geográfica (RÔÇAS *et al.*, 2011; MACHADO DE OLIVEIRA *et al.*, 2017), e pela variabilidade interindividual em relação ao hospedeiro (MONTAGNER *et al.*, 2010).

QUAIS SÃO OS MÉTODOS UTILIZADOS NO ESTUDO DA INFECÇÃO ENDODÔNTICA?

A diversidade microbiana em canais radiculares infectados tem sido amplamente explorada pelo método de cultura e por métodos moleculares. O método de cultura envolve o cultivo de micro-organismos em laboratório a partir de amostras clínicas (SIQUEIRA; RÔÇAS, 2005a). Após o crescimento inicial, as colônias são identificadas fenotipicamente e subcultivadas para a obtenção da cultura pura. Determina-se então o requerimento gasoso das colônias, com testes de identificação presuntiva como a coloração de Gram, e procedimentos de identificação que são realizados por meio de testes bioquímicos, de testes de reações enzimáticas ou cromatografia gás líquida (SUMMANEN, 1993).

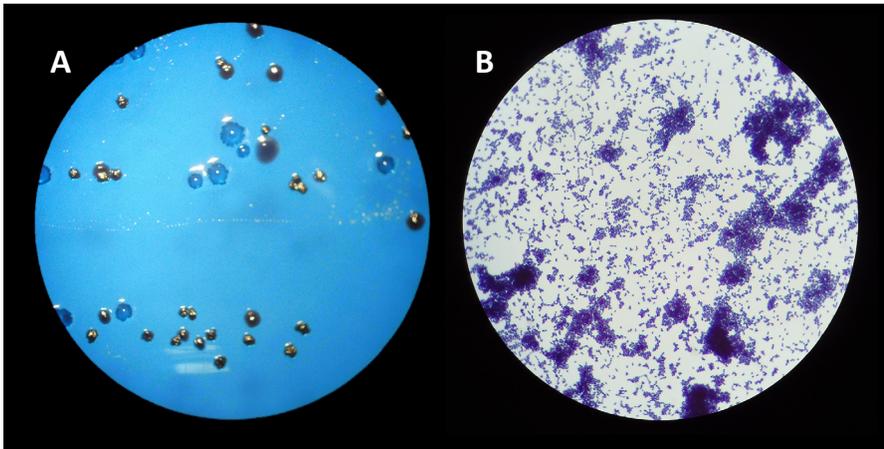


Figura 3 - (A) Cultura mista de *Streptococcus* spp. em Mitis Salivarius Ágar; (B) Coloração de Gram (coco Gram-Positivo).

Para Siqueira e Rôças (2005a) as vantagens do método de cultura são: permitir o crescimento de espécies variadas de forma não seletiva; fornecer cepas para a realização de testes de susceptibilidade aos agentes antimicrobianos; permitir o estudo da fisiologia da patogenicidade microbiana. Contudo, muitas espécies microbianas presentes em infecções endodônticas são de difícil cultivo ou ainda não cultiváveis, não sendo identificadas pelos métodos baseados em cultura (SIQUEIRA; RÔÇAS, 2005b). Além disso, esse método envolve procedimentos dispendiosos e demorados, e durante os procedimentos de coleta e processamento há possibilidade de ocorrência de contaminação (WALTON, 1999).

Por sua vez, os métodos moleculares possibilitam a detecção de espécies cultiváveis e de espécies de difícil cultivo; possuem alta especificidade na detecção de espécies com fenótipos similares; permitem a detecção direta de espécies sem a necessidade de cultivo laboratorial; têm alta sensibilidade; possuem maior rapidez; fornecem diagnósticos

rápidos; e possibilitam que as técnicas de coleta e transporte sejam menos críticas quanto à manutenção da anaerobiose (SIQUEIRA; RÔÇAS, 2005b). Além disso, esses métodos podem ser empregados para a caracterização de comunidades microbianas.

Dentre os métodos moleculares utilizados para estudar as infecções endodônticas destacam-se: o método da reação em cadeia da enzima polimerase (polymerase chain reaction – PCR) e suas variações (Nested-PCR, Multiplex PCR, Real-Time Quantitative PCR), Hibridização DNA-DNA (Checkerboard), Eletroforese em Gel de Gradiente de Desnaturação (DGGE), Técnica da Análise do Polimorfismo do Comprimento de Fragmentos Terminais de Restrição (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism - TRFLP), Clonagem, Sequenciamento do fragmento que codifica o RNA ribossomal 16S e Sequenciamento de alto rendimento. O alvo de estudo dessas técnicas é o gene 16S rRNA presente no DNA de células bacterianas, responsável pelo armazenamento das informações genéticas que garante a síntese da subunidade 16S do RNA ribossomal (DAHLLÖF, 2002).

COMO SÃO CLASSIFICADAS AS INFECÇÕES ENDODÔNTICAS?

As infecções endodônticas são causadas por micro-organismos que são capazes de invadir a cavidade pulpar ou de sobreviver no sistema de canais radiculares após tratamento endodôntico (DAHLEN, 2009). A diversidade dos micro-organismos presentes nas infecções endodônticas é

dependente do tipo de infecção (SIQUEIRA; RÔÇAS, 2009b), e embora haja uma abundância de bactérias, fungos, vírus e archea também têm sido encontrados (SIQUEIRA; SEM, 2003; VIANA *et al.*, 2006).

De acordo com Siqueira (2002), as infecções endodônticas podem ser classificadas em: infecção intrarradicular primária; infecção intrarradicular secundária ou persistente; e infecção extrarradicular.

Infecção Intrarradicular Primária

A infecção endodôntica intrarradicular primária é causada por micro-organismos que colonizam o tecido pulpar necrosado, ou seja, o canal radicular não recebeu intervenção. As comunidades microbianas envolvidas neste tipo de infecção são mistas, com uma maior abundância de micro-organismos anaeróbios estritos (MUNSON *et al.*, 2002; GOMES *et al.*, 2004; SIQUEIRA; RÔÇAS, 2005a; SIQUEIRA; RÔÇAS, 2009b) e de representantes do filo *Bacteroidetes* e *Firmicutes* (HONG *et al.*, 2013; TZANETAKIS *et al.*, 2015). Todavia, a composição específica das comunidades microbianas pode estar relacionada à presença ou não de sintomatologia pelo hospedeiro (GOMES *et al.*, 1996; JACINTO *et al.*, 2003; SAKAMOTO *et al.*, 2009). Segundo Tzanetakis *et al.* (2015) há uma maior diversidade de micro-organismos em infecções endodônticas primárias sintomáticas.

A ocorrência ou não de sintomatologia dolorosa espontânea depende da virulência do patógeno envolvido, da presença de espécies bacterianas sinérgicas, do número de células bacterianas, e da resistên-

cia do hospedeiro (SIQUEIRA, 2002). Além disso, componentes celulares bacterianos como as endotoxinas podem potencializar a sintomatologia dolorosa, uma vez que levam à liberação de diferentes mediadores inflamatórios, incluindo interleucina 1-beta (IL-1 β), prostaglandina E2 (PGE2) e fatores de necrose tumoral alfa (TNF- α), que podem sensibilizar nociceptores (MARTINHO *et al.*, 2017). São exemplos de infecções intrarradiculares primárias sintomáticas a Periodontite Apical Aguda ou Sintomática e o Abscesso Apical Agudo. Por sua vez, a Periodontite Apical Crônica ou Assintomática e o Abscesso Apical Crônico são exemplos de infecções intrarradiculares assintomáticas.

A periodontite apical é definida como uma inflamação dos tecidos periapicais (AAE, 2015), geralmente causada por micro-organismos, especialmente bactérias, que colonizam o sistema de canais radiculares. A periodontite apical aguda ou sintomática (PAA ou PAS) é caracterizada por sintomas clínicos agudos, que incluem uma resposta dolorosa à mastigação e/ou percussão, mas sem evidências radiolúcidas de alterações periapicais, com exceção de um leve espessamento do ligamento periodontal (GUTMANN *et al.*, 2009). A PAA precede o AAA, o qual é caracterizado clinicamente por apresentar início rápido, dor espontânea, sensibilidade do dente à pressão, e formação de pus e edema nos tecidos periapicais (GUTMANN *et al.* 2009; AAE, 2015). A progressão da infecção intrarradicular para a região periapical, por meio da exacerbação da resposta inflamatória por parte do hospedeiro devido à formação da coleção purulenta, faz com que o AAA também seja citado como um exemplo clássico de infecção extrarradicular (SIQUEIRA, 2002).

As espécies bacterianas mais abundantes em canais radiculares com PAA ou PAS são *Streptococcus* spp., *Porphyromonas endodontalis*, *Dialister invisus*, *Propionibacterium acne*, *Solibacterium moorei* (RÔÇAS *et al.*, 2011). Por sua vez, as espécies mais abundantes em casos de AAA são as pertencentes aos gêneros *Prevotella* e *Fusobacterium* (HSIAO *et al.*, 2012). Diante disso, pode-se inferir que durante a progressão da infecção, no que diz respeito à exacerbação dos sintomas, ocorre uma sucessão microbiana em virtude das condições ambientais, na qual micro-organismos anaeróbios estritos altamente virulentos aumentam em termo de números. Todavia, vale ressaltar que as infecções endodônticas são polimicrobianas. Assim, outras espécies bacterianas estão presentes nos casos de PAS e AAA, mas em menor abundância como *Treponema* spp., *Filifactor alocis*, *Peptrostreptococcus* spp., *Tannarella forsythia* (SIQUEIRA; RÔÇAS, 2009b; MONTAGNER *et al.*, 2012).

Já a periodontite apical crônica (PAC) ou assintomática é caracterizada pela ausência de sintomatologia dolorosa espontânea e pela presença de radiolucência periapical (AAE, 2015). As espécies bacterianas mais abundantes em canais radiculares com PAC são *Dialister invisus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella* spp., *Propionibacterium* spp. e *Pyramidobacter* spp. (RÔÇAS *et al.*, 2011; HONG *et al.*, 2013). A PAC difere do Abscesso Apical Crônica (AAC), pelo fato do AAC apresentar secreção intermitente de pus através de um trajeto fistuloso (GUTMANN *et al.*, 2009; AAE, 2015). Em relação às espécies bacterianas mais abundantes em casos de AAC, pode-se citar *Dialister invisus*, *Parvimonas micra*, *Solobacterium moorei*, *Porphyromonas endodontalis* (RÔÇAS *et al.*, 2011). Contudo, assim como ocorre nas infecções sintomáticas,

outras espécies têm sido isoladas de infecções endodônticas primárias assintomáticas como: *Actinobacteria* spp., *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp., *Treponema* spp. (TZANETAKIS *et al.*, 2015).

Infecção Intrarradicular Secundária/Persistente

As infecções intrarradiculares secundárias são causadas por micro-organismos que não estavam presentes na infecção primária e penetraram no sistema de canais radiculares durante o tratamento endodôntico, entre as sessões, ou após a conclusão do tratamento endodôntico (SIQUEIRA, 1997). Por sua vez, as infecções intrarradiculares persistentes são causadas por micro-organismos que resistiram aos procedimentos endodônticos de desinfecção (SIQUEIRA, 2002). As infecções intrarradiculares secundárias/persistentes estão associadas ao insucesso do tratamento endodôntico e requerem procedimentos que envolvem a re-intervenção no canal radicular.

Segundo Sundqvist *et al.* (1998), as espécies bacterianas isoladas de casos de retratamento estão provavelmente relacionadas à qualidade do tratamento endodôntico inicial. Dentes com tratamento endodônticos inadequados (dentes com obturações muito aquém do ápice ou com falhas) abrigam comunidades microbianas similares às aquelas encontradas nos dentes não tratados (SUNDQVIST *et al.*, 1998). Por sua vez, os micro-organismos presentes em canais radiculares com tratamentos endodônticos radiograficamente bem obturados, mas com insucesso

do tratamento endodôntico diferem daqueles encontrados em dentes necrosados (SUNDQVIST *et al.*, 1998; GOMES *et al.*, 2004; HONG *et al.*, 2013; TZANETAKIS *et al.*, 2015).

Acreditava-se que os casos de infecções intrarradiculares persistentes apresentavam uma diversidade microbiana menor quando comparados aos casos de infecções intrarradiculares primárias. Contudo, devido ao avanço das técnicas de estudo para micro-organismos, hoje se tem sugerido que as infecções persistentes possuem uma diversidade microbiana igual (HONG *et al.*, 2013) ou até mesmo maior que as infecções primárias (TZANETAKIS *et al.*, 2015). Além disso, a diversidade microbiana em casos de infecção persistentes assintomáticas é maior quando comparada aos casos de infecções primárias assintomáticas (TZANETAKIS *et al.*, 2015).

As espécies bacterianas mais abundantes em infecções endodônticas persistentes pertencem aos gêneros *Fusobacterium*, *Bacteroidaceae_unclassified*, *Prevotella* e *Prophyromonas* (HONG *et al.*, 2013; TZANETAKIS *et al.*, 2015). Ademais se observa um enriquecimento de espécies de *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Sphingomonas* e *Rlastonia* (TZANETAKIS *et al.*, 2015). No que diz respeito à abundância de *Enterococcus faecalis* nos casos de infecções endodônticas persistentes, os novos métodos de estudo pra micro-organismos mostram uma baixa abundância desses micro-organismos em dentes com selamento coronário adequado (HONG *et al.*, 2013).

A maior presença de bactérias anaeróbias facultativas pode estar relacionada ao fato dessas espécies serem mais resistentes à atividade antimicrobiana e por permanecerem em uma fase latente, com baixa atividade metabólica por um longo período, em que mudanças nas con-

dições ambientais podem ativar o seu crescimento (MOLANDER *et al.*, 1998). A complexidade anatômica dos canais radiculares, como presença de istmos, ramificações apicais (RICUCCI *et al.*, 2009), parece servir como “abrigo” para tais micro-organismos, uma vez que essas áreas são muitas vezes inacessíveis durante o preparo químico-mecânico (ANTUNES *et al.*, 2015).

Além de espécies bacterianas já citadas, fungos também têm sido detectados com certa frequência nas infecções endodônticas, com maior frequência em casos de insucesso do tratamento endodôntico, em especial a *Cândida albicans* (SIQUEIRA; SEM, 2003). Os fungos possuem fatores de virulência, incluindo adaptabilidade a uma variedade de condições ambientais, adesão a uma variedade de superfícies, a produção de enzimas hidrolíticas, transição morfológica, formação de biofilme e evasão e imunomodulação da defesa do hospedeiro. Esses fatores podem fazer com que esses micro-organismos desempenhem um papel na patogênese das doenças perirradiculares (SIQUEIRA; SEM, 2003).

Infecção Extrarradicular

A causa das infecções extrarradiculares é usualmente a infecção intrarradicular. A sobrevivência de micro-organismos na região periapical, onde as defesas do hospedeiro têm maior acesso ao agente infeccioso; somente é possível para os micro-organismos dotados da capacidade de anulá-las (SIQUEIRA, 1997). São exemplos desse tipo de infecção a coleção purulenta associada ao abscesso apical agudo que

se encontra nos tecidos periapicais, os biofilmes extrarradiculares e a actinomicose apical associados geralmente aos casos de insucesso do tratamento endodôntico.

A presença de edema no AAA indica difusão da infecção através do osso e pode resultar em risco de vida se o tratamento imediato não for realizado (FLYNN *et al.*, 2006). De acordo com Leonardo (2008), o AAA pode ser clinicamente dividido em três fases: fase clínica inicial, fase clínica em evolução e a fase clínica evoluído. Na fase clínica inicial, os sinais e sintomas predominantes são dor espontânea intensa, localizada e pulsátil. O dente apresenta mobilidade acentuada, dor ao simples toque e a região apical torna-se extremamente sensível à palpação. A fase clínica em evolução é caracterizada pela alteração do volume facial, onde o paciente apresenta um inchaço firme (duro) e aquecido, onde não se diferencia um ponto de flutuação. Soma-se a essas condições a possível presença de febre, trismo, cefaleia e prostração. Na fase evoluída, o paciente apresenta uma regressão nos sintomas e o inchaço difuso duro e aquecido; agora apresenta uma área definida caracterizada pela concentração de pus com ponto de flutuação. As espécies bacterianas mais abundantes em casos de AAA são pertencentes aos gêneros *Streptococcus* spp., *Prevotella* spp., *Fusobacterium* spp., *Actinomyces* spp., *Veillonella* spp. (HSIAO *et al.*, 2012). Cabe aqui salientar que embora não haja diferença entre os gêneros bacterianos presentes no interior do canal radicular e na coleção purulenta extrarradicular de casos de AAA, a distribuição desses gêneros diferem nos diferentes sítios (HSIAO *et al.*, 2012). Já nos casos de reagudecimento de lesões crônicas ou abscesso fênix pode-se observar uma maior abundância de espécies pertencentes aos gêneros *Fusobacterium* spp., *Atopo-*

bium spp., *Parvimonas* spp., *Dialister* spp., *Eubacterium* spp., *Porphyromonas* spp., *Prevotella* spp., *Mogibacterium* spp., *Pseudoramibacter* spp., *Filifactor* spp., *Peptostreptococcus* spp. (SANTOS *et al.*, 2011).

Em relação à infecção extrarradicular persistente, a literatura descreve dois mecanismos bacterianos de evasão às defesas do hospedeiro: actinomicose periapical, que é caracterizada pela presença de espécies de *Actinomyces* spp. (SUNDQVIST; REUTERVING, 1980; NAIR; SCHROEDER, 1984; SJÖGREN *et al.*, 1997); e o arranjo em biofilme, o qual se caracteriza por ser uma população de micro-organismos envolvidos por uma camada polissacarídica externa, e que está aderido ao cimento e/ou à dentina na porção apical da raiz ou presente no interior das lesões periapicais (PALMER; WHITE, 1997; SUBRAMANIAN; MICKEL, 2009). Em 2009, Subramanian e Mickel verificaram a composição da comunidade microbiana presente em casos de lesões persistentes. Amostras foram coletadas da porção final da raiz e das lesões periapicais após apicetomia. De acordo com os resultados, houve um predomínio de *Enterococcus faecalis* e *Burkholderia cepacia* em ambos os sítios. Contudo, *Campylobacter gracilis* e *Streptococcus gordonii* foram associadas à porção final da raiz, enquanto *Atopobium rimaie*, *Peptostreptococcus micros*, *Streptococcus genomospecies* C8, *Dialister* sp E2_20 E1, e *Eubacterium* strain A35MT foram associadas com as lesões perirradiculares.

Diante do que foi exposto, em uma análise ampla, constata-se que independente do tipo de infecção as comunidades microbianas são poli-microbianas (com predomínio de bactérias — já cultivadas ou não), mistas (com proporções diferentes de anaeróbios facultativos e estritos, sejam eles Gram-positivos e Gram-negativos).

O CONTROLE DA INFECÇÃO ENDODÔNTICA

O controle das infecções orofaciais de origem endodôntica consiste na eliminação da origem da contaminação por meio de medidas locais (tratamento endodôntico, retratamento endodôntico, cirurgia apical ou drenagem cirúrgica), ou por meio da combinação das medidas locais e sistêmicas (antibioticoterapia).

TRATAMENTO ENDODÔNTICO

O tratamento endodôntico de dentes com necrose pulpar e infecção consiste em: diagnóstico, por meio de exames subjetivos, objetivos e complementares; anestesia; abertura coronária; localização do(s) canal(is) radicular(es); isolamento absoluto do campo operatório; exploração e neutralização do(s) canal(is) radicular(es) por terços; odontometria; preparo químico mecânico; uso de medicação intracanal; cronometria; obturação; selamento coronário e preservação. Todavia, previamente e durante a realização das etapas operatórias algumas medidas devem ser tomadas para o controle da infecção. Dentre elas podemos citar:

- a) Lesões de cárie, placa dental, cálculos dentários, restaurações defeituosas, hiperplasias gengivais devem ser rigorosamente removidas do dente a ser tratado, evitando a contaminação dos canais radiculares e região apical e periapical por meio de tecidos contaminados (LEONARDO, 2008).

b) Preparo e esterilização do material e instrumental: gaze, algodão e pontas de papel absorvente devem ser esterilizados por meio de calor úmido (autoclave), enquanto pontas de guta-percha devem ser desinfetadas com soluções de hipoclorito de sódio (LEONARDO, 2008). Todo o instrumental endodôntico deve ser limpo, embalado, esterilizado, e mantido nas suas embalagens até a sua utilização. A parte ativa das limas endodônticas jamais deve sofrer contato manual direto enquanto estiverem sendo utilizadas, recomendando-se o uso de gaze esterilizada para a realização do pré-curvamento (LEONARDO, 2008).

c) Isolamento absoluto do campo operatório: o campo operatório deve ser isolado de forma absoluta, de forma que o dique de borracha esteja bem adaptado ao elemento dentário, impedindo infiltração de saliva para o campo operatório (LEONARDO, 2008).

d) Abertura coronária: é o ato operatório pelo qual se abre (se expõe) a câmara pulpar (LEONARDO, 2008). Consiste da remoção de todo o teto da câmara pulpar para a retirada dos remanescentes pulpares e exposição dos orifícios de entrada dos canais (LOPES; SIQUEIRA, 2011).

e) Preparo químico-mecânico: tem como objetivo a limpeza e a modelagem dos canais radiculares. As limas endodônticas promovem a modelagem e remoção mecânica de micro-organismos, seus produtos e tecidos degenerados, auxiliadas por uma substância química que, além de maximizar a remoção de detritos através da ação mecânica do fluxo e refluxo, também pode exercer um efeito químico significativo, desde que possua ação antimicrobiana e solvente de matéria orgânica.

f) Medicação intracanal: a medicação tópica entre sessões (“curativo de demora”) tem por objetivo tornar o sistema de canais radiculares de dentes com polpa necrosada e infectada, num meio impróprio ao desenvolvimento bacteriano (LEONARDO, 2008). Assim, o medicamento para o uso endodôntico deve possuir ação antimicrobiana, tendo o potencial de destruir micro-organismos remanescentes que sobreviveram aos efeitos do preparo químico-mecânico (LOPES; SIQUEIRA, 2011).

g) Obturação: selamento de toda a extensão da cavidade endodôntica, desde a sua abertura coronária até o seu término apical (LOPES; SIQUEIRA, 2011).

h) Selamento coronário: restauração coronária que tem como objetivo prevenir que bactérias orais reinfetem o sistema de canais radiculares.

Reintervenção endodôntica não cirúrgica

Em casos de falhas no tratamento endodôntico, o tratamento de primeira escolha é a reintervenção endodôntica não cirúrgica. O procedimento geralmente consiste basicamente na realização das mesmas etapas descritas para o tratamento endodôntico de dentes com necrose pulpar e infecção, a não ser pela remoção do material obturador do tratamento endodôntico prévio, antes da odontometria. O objetivo da reintervenção é corrigir alterações produzidas pelo tratamento anterior, permitindo o adequado reparo dos tecidos periapicais.

Reintervenção endodôntica cirúrgica

A segunda opção de tratamento em casos de falhas no tratamento endodôntico são as cirurgias apicais ou parendônticas. O procedimento cirúrgico consiste em: anestesia adequada, realização de retalho cirúrgico com mínimo traumatismo aos tecidos, remoção do osso sobrejacente à lesão, modalidade cirúrgica (curetagem apical, apicetomia, retro-preparo e retro-obturação), reposi o do retalho cirúrgico, sutura, radiografia pós-operatória e recomenda o dos cuidados pós-operatórios (SOCIEDADE EUROPEIA DE ENDODONTIA, 2006).

Drenagem cirúrgica

O objetivo da realiza o da drenagem cirúrgica   liberar exsudato que está preso dentro do tecido e não pode ser drenado pelo canal radicular ou como tratamento de emergência com casos de edema com ponto de flutua o. O procedimento consiste em: anestesia, incisi o e drenagem, por meio da coloca o de um dreno. O dente   então, ou logo depois, isolado e o(s) canal (is) radicular (es) são preparados (SOCIEDADE EUROPEIA DE ENDODONTIA, 2006).

Antibioticoterapia

Em 2017, a Sociedade Europeia de Endodontia (ESE – European Society of Endodontology) estabeleceu um consenso em rela o ao uso de antibióticos em Endodontia (SEGURA-EGEA *et al.*, 2017). De acordo com o posicionamento da ESE, o tratamento sist mico com antibióticos em

Endodontia está indicado como tratamento coadjuvante ao tratamento local para os seguintes casos: abscesso apical agudo em pacientes sistemicamente comprometidos; abscesso apical agudo em pacientes que manifestarem envolvimento sistêmico (febre, linfadenopatia, mal-estar, edema difuso); progressão rápida da infecção; reimplante de dentes avulsionados; lesão de tecidos moles como debridamentos e suturas.

O consenso recomenda como primeira opção o uso de antibióticos betalactâmicos (penicilina VK e amoxicilina). No caso de pacientes alérgicos a penicilinas, a clindamicina, a claritromicina e a azitromicina podem ser utilizadas como alternativa. Por sua vez, caso o paciente não responda a terapia inicial, após 48 ou 72 horas, o metronidazol pode ser associado à penicilina VK, ou a amoxicilina pode ser substituída pela associação de amoxicilina e ácido clavulânico ou pela clindamicina.

REFERÊNCIAS

AMERICAN ASSOCIATION OF ENDODONTISTS. **Glossary of Endodontic Terms**. 10th edition [Internet]. Chicago: American Association of Endodontists, 2020. Disponível em: <<https://www.aae.org/specialty/download/glossary-of-endodontic-terms/>>. Acesso em: 20 nov. 2020.

ANTUNES, H. S.; RÔÇAS, I. N.; ALVES, F. R.; SIQUEIRA JR., J. F. Total and Specific Bacterial Levels in the Apical Root Canal System of Teeth with Post-treatment Apical Periodontitis. **J Endod**, 41, p. 1037-1042, 2015.

BERGENHOLTZ, G. Effect of Bacterial Products on inflammatory reactions in the dental pulp. **Scand J Dent Res**, 85, p. 122-129, 1977.

BERGENHOLTZ, G. Inflammatory response of the dental pulp to bacterial irritation. **J Endod**, 7, p. 100-104, 1981.

DAHLLÖF, I. Molecular community analysis of microbial diversity. **Curr Opin Biotechnol**, 13, p. 213-217, 2002.

DAHLEN, G. Culture-based analysis of endodontic infections. In: FOUAD, A. F. **Endodontic microbiology**. 1st ed. Ames: Wiley-Blackwell, 2009. p. 225-241.

FLYNN, T. R.; SHANTI, R. M.; LEVI, M. H.; ADAMO, A. K.; KRAUT, R. A.; TRIEGER, N. Severe odontogenic infections, part I: prospective report. **J Oral Maxillofac Surg**, 64, p. 1093-1103, 2006.

GOMES, B. P.; LILLEY, J. D.; DRUCKER, D. B. Clinical significance of dental root canal microflora. **J Dent**, 24, p. 47-55, 1996.

GOMES, B. P. *et al.* Microbiological examination of infected dental root canals. **Oral Microbiol Immunol**, 19, p. 71-76, 2004.

GUTMANN, J. L. *et al.* Identify and define all diagnostic terms for periapical/periradicular health and disease states. **J Endod**, 35, p. 1658-74, 2009.

HAHN, C.-L.; FALKLER JR., W. A.; MINAH, G. E. Microbiological studies of carious dentine from human teeth with irreversible pulpitis. **Arch Oral Biol**, 36, p. 147-153, 1991.

HORIBA, N.; MAEKAWA, Y.; MATSUMOTO, T.; NAKAMURA, H. A study of the distribution of endotoxin in the dentinal wall of infected root canals. **J Endod**, 16, p. 331-334, 1990.

HOSHINO, E. *et al.* Bacterial invasion of non-exposed dental pulp. **Int Endod J**, 25, p. 2-5, 1992.

JACINTO, R. C. *et al.* Microbiological analysis of infected root canals from symptomatic and asymptomatic teeth with periapical periodontitis and the antimicrobial susceptibility of some isolated anaerobic bacteria. **Oral Microbiol Immunol**, 18, p. 285-292, 2003.

KIM, S. Microcirculation of the dental pulp in health and disease. **J Endod**, 11, p. 465-471, 1985.

LOPES, H. P. & SIQUEIRA JR., J. F. **Endodontia – Biologia e Técnica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

LOVE, R. M. Regional variation of root dentinal tubule infection by *Streptococcus gordonii*. **J Endod**, 22, p. 290-293, 1996.

MACHADO DE OLIVEIRA, J. C. *et al.* Bacterial community profiles of endodontic abscesses from Brazilian and USA subjects as compared by denaturing gradient gel electrophoresis analysis. **Oral Microbiol Immunol**, 22, p. 14-18, 2007.

- MARTINHO, F. C. *et al.* Participation of endotoxin in root canal infections: a systematic review and meta-analysis. **Eur J Dent**, 11, p. 398-406, 2017.
- MOLANDER, A.; REIT, C.; DAHLÉN, G.; KVIST, T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. **Int Endo J**, 31, p. 1-7, 1998.
- MONTAGNER, F. *et al.* Molecular fingerprinting reveals the presence of unique communities associated with paired samples of root canals and acute apical abscess. **J Endod**, 36, p. 1475-1479, 2010.
- MONTAGNER, F.; JACINTO, R. C.; SIGNORETTI, F. G.; SANCHES, P. F.; GOMES, B. P. Clustering Behavior in Microbial Communities from Acute Endodontic Infections. **J Endod**, 38, p. 158-162, 2012.
- MUNSON, M. A. *et al.* Molecular and cultural analysis of the microflora associated with endodontic infections. **J Dent Res**, 81, p. 761-766, 2002.
- NAIR, P. N. Light and Electron Microscopic Studies of Root Canal Flora and Periapical Lesions. **J Endod**, 13, p. 29-39, 1987.
- NAIR, P. N. & SCHROEDER, H. E. Periapical Actinomycosis. **J Endod**, 10, p. 567-570, 1984.
- PALMER, R. J.; WHITE, D. C. Developmental biology of biofilms: implications for treatment and control. **Trends Microbiol**, 5, p. 435-440, 1997.
- RICUCCI, D. & SIQUEIRA JR., J. F. Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. **J Endod**, 36, p. 1277-1288, 2010.
- RICUCCI, D. *et al.* Histologic investigation of root canal-treated teeth with apical periodontitis: a retrospective study from twenty-four patients. **J Endod**, 35, p. 493-502, 2009.
- RICUCCI, D.; LOGHIN, S.; SIQUEIRA JR., J. F. Correlation between clinical and histologic pulp diagnoses. **J Endod**, 40, p. 1932-1939, 2014.
- RICUCCI, D. *et al.* Vital pulp therapy: histopathology and histobacteriology-based guidelines to treat teeth with deep caries and pulp exposure. **J Dent**, 86, p. 41-52, 2019.
- RÔÇAS, I. N.; SIQUEIRA JR., J. F.; DEBELIAN, G. J. Analysis of symptomatic and asymptomatic primary root canal infections in adult Norwegian patients. **J Endod**, 34, p. 1291-1301, 2011.

SAKAMOTO, M. *et al.* Diversity of Spirochetes in Endodontic Infections. **J Clin Microbiol**, 47, p. 1352-1357, 2009.

SANTOS, A. L. *et al.* Comparing the bacterial diversity of acute and chronic dental root canal infections. **PLoS One**, 6, p. e28088, 2011.

SEGURA-EGEA, J. J. *et al.* European Society of Endodontology position statement: the use of antibiotics in endodontics. **Int Endod**, 26, p. 255-273, 2017.

SIQUEIRA JR., J. F. **Tratamento das infecções endodônticas**. Rio de Janeiro, Brasil: Medsi, 1997.

SIQUEIRA JR., J. F. Endodontic infections: concepts, paradigms, and perspectives. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, 94, p. 281-293, 2002.

SIQUEIRA JR., J. F.; RÔÇAS, I. N.; LOPES, H. P. Patterns of microbial colonization in primary root canal infections. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, 93, p. 174-178, 2002.

SIQUEIRA JR., J. F. & SEM, B. H. Fungi in endodontic infections. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, 97, p. 632-641, 2003.

SIQUEIRA JR., J. F. & RÔÇAS, I. N. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 1 – Current Molecular Technologies for microbiological diagnosis. **J Endod**, 31, p. 411-423, 2005a.

SIQUEIRA JR., J. F. & RÔÇAS, I. N. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 2 – redefining the endodontic microbiota. **J Endod**, 31, p. 488-498, 2005b.

SIQUEIRA JR., J. F. & RÔÇAS, I. N. Community as the unit pathogenicity: An emerging concept as to the microbial pathogenesis of apical periodontitis. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, 107, p. 870-878, 2009a.

SIQUEIRA JR., J. F. & RÔÇAS, I. N. Diversity of endodontic microbiota revisited. **J Dent Res**, 88, p. 969-981, 2009b.

SJÖGREN, U.; FIGDOR, D.; PERSSON, S.; SUNDQVIST, G. Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. **Int Endod J**, 30, p. 297-306, 1997.

SOCIEDADE EUROPEIA DE ENDODONTIA (ESE). Quality guidelines for endodontic treatment: consensus report of the European Society of Endodontology. **IEJ**, 39, p. 921-930, 2006.

SUBRAMANIAN, K. & MICKEL, A. K. Molecular analysis of persistent periradicular lesions and root ends reveals a diverse microbial profile. **J Endod**, 35, p. 950-957, 2009.

SUMMANEN, P. **Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual**. 5. ed. California: Star Publishing Company, 1993.

SUNDQVIST, G. & REUTERVING, C. O. Isolation of *actinomyces israelii* from periapical lesion. **J Endod**, 6, p. 602-606, 1980.

SUNDQVIST, G.; FIDGOR, D.; SJÖRGREN, U. Microbiologic analyses of teeth with endodontic treatment and the outcome of conservative retreatment. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, 85, p. 86-93, 1998.

TANOMARU, J. M. G. *et al.* Microbial distribution in the root canal system after periapical lesion induction using different methods. **Braz Dent J**, 19, p. 124-129, 2008.

VIANA, M. E. *et al.* Identification and quantification of archaea involved in primary endodontic infections. **J Clin Microbiol**, 44, p. 1274-1282, 2006.

WALTON, R. E. Culturing the exsudate of an odontogenic infection – a useful procedure? **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, 88, p. 525, 1999.

16

Controle Químico do Biofilme Dental

Sandra Liana Henz
Luisa Weber Mercado
Eduardo Toschi
Liliane Cardoso Hilgert

A cavidade bucal tem várias superfícies sólidas como o esmalte, cimento, dentina, implantes, próteses e restaurações que podem propiciar o desenvolvimento de biofilmes. Miller, em 1880, reconheceu que a cárie é uma doença causada por bactérias. Entretanto, o papel indispensável dos micro-organismos na cárie dentária só foi demonstrado após as investigações com animais germ-free realizadas por Orland *et al.* (1954).

A placa dental (biofilme dental) pode ser definida como uma comunidade diversa de micro-organismos encontrada na superfície dos dentes, embebidas em uma matriz de polímeros extracelulares de origem bacteriana e do hospedeiro, comportando-se como um biofilme (MARSH, 2004). Os biofilmes expressam propriedades que não são exibidas pelos micro-organismos quando estes crescem em culturas líquidas (planctônicas). Além disso, como as bactérias da placa dental estão organizadas em um biofilme, isso confere às mesmas um aumento na resistência aos antimicrobianos (GILBERT *et al.*, 1997; 2002).

A relação da placa dental supragengival com a etiologia das doenças periodontais ficou estabelecida a partir do trabalho de Gengivite Experimental em Humanos (LÖE *et al.*, 1965). Posteriormente, ficou comprovado que a placa supragengival é indispensável para o estabelecimento da placa subgengival, que está intimamente associada às lesões avançadas das doenças periodontais crônicas (LINDHE, 1986; LÖE, 1986).

Como a cárie e a gengivite são decorrentes do acúmulo de placa supragengival, o controle desse biofilme é necessário para manter a saúde dos dentes e de suas estruturas de proteção e sustentação.

O método mais acessível para remoção rotineira de placa nas superfícies dentais é o controle mecânico que é realizado principalmente através do uso de escovas e fio dental. Entretanto, para um controle de placa efetivo pelo paciente, muitas vezes é necessária uma mudança de hábitos já estabelecidos (WESTFELD, 1996). Estudos têm mostrado que um adequado controle mecânico de placa pelos indivíduos é difícil de obter (AXELSSON *et al.*, 2002; 2004; VAN DER WEIJDEN *et al.*, 2005). Ainda assim, o controle mecânico é indispensável na desestabilização da placa dental.

Com o intuito de melhorar o controle de placa, sem depender exclusivamente do controle mecânico, várias classes de agentes químicos para o controle da placa supragengival foram propostos e testados, tais como enzimas, antibióticos, sais de íons metálicos e antissépticos de diferentes naturezas (FINE, 1995). Os agentes químicos podem ser utilizados como coadjuvantes ou substitutivos ao controle mecânico de placa.

O controle químico da placa supragengival tem sido assunto de extensa pesquisa, utilizando metodologias científicas há aproximadamente 40 anos.

Para que uma substância possa ser utilizada de uma maneira eficaz no controle químico da placa supragengival, ela deve ter algumas características (LOESCHE, 1976), tais como:

Substantividade: É a capacidade que a substância tem de ficar retida na cavidade bucal, possibilitando ao agente químico tempo de contato suficiente para atuar sobre as bactérias;

Eficácia: Atuar contra as bactérias responsáveis pela inflamação gengival;

Segurança: para ser utilizado no controle da placa bacteriana deve ser testado previamente em laboratório e clinicamente em animais;

Estabilidade: Necessita ser estável à temperatura ambiente por períodos de tempo prolongado.

Atualmente, existe no mercado uma ampla variedade de agentes químicos para controle de placa veiculados na forma de dentifrícios, soluções para bochecho, géis e vernizes (MALTZ; ALVES; ZENKNER, 2017), sendo necessário conhecimento para orientar na escolha e na prescrição correta desses agentes. Entre as classes de produtos utilizados temos as moléculas orgânicas catiônicas, os compostos metálicos, os compostos fenólicos sem carga, os detergentes, as enzimas, os peróxidos, os agentes modificadores de superfície e os antibióticos (TORRES, 2000).

1 SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS

1.1 Moléculas Orgânicas Catiônicas

1.1.1 Clorexidina

Características

A clorexidina é uma bisguanidina, disponível nas formas de gluconato, digluconato, acetato e cloridrato. Os sais de gluconato e digluconato são os mais utilizados nas formulações. A clorexidina (CHX) é uma molécula dicatiônica, que em altas concentrações é bactericida (pro-

voca a perda dos constituintes citoplasmáticos) e em baixas concentrações é bacteriostática (inibe enzimas importantes para o metabolismo bacteriano) (VAN DER HOEVEN *et al.*, 1993; JONES *et al.*, 1997).

Mecanismo de Ação

Possui um amplo espectro de ação, atua sobre bactérias gram-positivas, gram-negativas, fungos, alguns vírus e leveduras (JONES *et al.*, 1997; JAMES *et al.*, 2017; HAYDARI *et al.*, 2017). A molécula catiônica da clorexidina tem a capacidade de se unir a compostos aniônicos como glicoproteínas salivares, radicais fosfatados e radicais carboxílicos, interferindo na formação da película adquirida (RÖLLA & MELSEN, 1975).

Substantividade

A clorexidina apresenta uma alta substantividade que se deve a sua carga catiônica. Essa carga catiônica permite a ligação com vários sítios na cavidade bucal que são negativamente carregados, levando a uma lenta liberação do antisséptico das superfícies, prolongando seu efeito antimicrobiano (BONESVOLL *et al.*, 1974; HAYDARI *et al.*, 2017).

A clorexidina é considerada o padrão ouro para o controle químico da placa supragengival, sendo utilizada também como controle positivo em estudos que testam outras substâncias para controle de placa (JONES *et al.*, 1997; KAMATH *et al.*, 2019; LEIVA-CALA *et al.*, 2019; NISHAD *et al.*, 2017). A clorexidina em suas diferentes apresentações pode ser utilizada de maneira substitutiva ou coadjuvante ao controle mecânico de placa.

Efetividade

Existe uma vasta literatura demonstrando o efeito antiplaca e antigengivite da clorexidina. A evidência mais recente mostra que o principal efeito da clorexidina usada como adjuvante a escovação por 4 a 6 semanas ou 6 meses é a redução no acúmulo de placa. Em relação à gengivite, há uma redução em pessoas com nível leve da doença. Porém, não há evidência de redução da gengivite em pessoas com nível moderado a severo (JAMES *et al.*, 2017).

Em relação às concentrações dos bochechos (LANG *et al.*, 1982), já foi demonstrado que bochechos de 15 ml de clorexidina duas vezes ao dia, com concentrações de 0,12% e 0,2% previnem o desenvolvimento de placa supragengival e gengivite. Outros autores mostraram que bochechos de 10 mL de uma solução a 0,2% de clorexidina e de 15mL de uma solução a 0,12% de clorexidina tiveram o mesmo efeito, pois o efeito sobre a placa é dose dependente (SEGRETO *et al.*, 1986, BINNEY *et al.*, 1995). Em recente revisão sistemática não foi encontrada diferença na efetividade comparando as concentrações utilizadas em bochechos para redução de placa e gengivite. Com isso, a concentração menor tem sido preferida, pois o paladar é melhor e os efeitos colaterais são menores (JAMES *et al.*, 2017).

Efeitos Colaterais

A clorexidina apresenta efeitos adversos locais, tais como manchamento extrínseco dos dentes (Fig. 1), manchamento da língua (Fig. 2), manchamento de restaurações, próteses, formação de cálculo supra-

gingival (Fig. 3), descamação da mucosa oral, e alteração do paladar (LANG *et al.*, 1982). Efeitos colaterais sistêmicos não têm sido relatados (AZEVEDO *et al.*, 1996).

O manchamento dos dentes tem sido considerado o principal efeito colateral da clorexidina, sendo um fator importante que pode diminuir a adesão dos pacientes ao tratamento. Em função disso, foram testadas formulações com adição de agentes antidescolorantes para diminuir o efeito colateral e foi observado que não afetou significativamente a eficácia da clorexidina em relação ao seu efeito antiplaca e antigengivite (SWAAIJ *et al.*, 2019).



Figura 1. Manchas extrínsecas na superfície dental após a utilização de bochechos de clorexidina 0,12% por um período de 15 dias.



Figura 2. Mancha na superfície da língua após a utilização de bochechos de clorexidina 0,12% por um período de 15 dias.



Figura 3. Manchas extrínsecas e formação de cálculo supragengival na superfície dental após a utilização de bochechos de clorexidina 0,12% por um período de 15 dias.

Meios de Utilização/Produtos

Bochechos

Indicação: Pode ser utilizado de maneira profilática e terapêutica, dependendo das concentrações utilizadas.

Alguns Produtos Comerciais Disponíveis em Soluções

- Periogard ®/ Colgate (gluconato de clorexidina 0,12%).
- Periogard sem álcool ®/ Colgate (gluconato de clorexidina 0,12%).
- Clinexidin®/ Dental Clean, (digluconato de clorexidina 0,12%).
- Noplak ®/ Daudt, (gluconato de clorexidina 0,12%).
- Noplak Max ® /Daudt (gluconato de clorexidina 0,12%).
- Cleanform Enxaguatorios Bucais ®/ Laboratório Fórmula e Ação (digluconato de clorexidina 0,12% e 0,2% com álcool e sem álcool e sem corante para pessoas alérgicas).
- Perio Therapy ®/ Bitufo (clorexidina 0,12%).
- PerioKin enxaguatorio bucal ®/ PharmaKIN (digluconato de clorexidina 0,2%).
- Cariax Gengivas enxaguatorio bucal®/ PharmaKIN (digluconato de clorexidina 0,12% sem álcool).

- Orthokin enxaguatório bucal ®/ PharmaKIN (digluconato de clorexidina 0,06 + acetato de zinco 0,34%).
- Peroxidín Enxaguatório Bucal ®/ Laboratório Gross-Divisão Lacer (clorexidina 0,12% + xilitol 1g sem álcool).

Observação: Muitas formulações utilizam associações de diferentes agentes químicos na sua composição como, por exemplo, a clorexidina associada a cloreto de cetilpiridíneo e/ou fluoretos entre outros.

Gel

Indicação: Pacientes com altas contagens de *S. mutans* e atividade de cárie; Auxiliar no controle mecânico da placa nas regiões anatômicas de difícil acesso.

Protocolo clínico: O gel de clorexidina a 1% em moldeiras individualizadas pode ser utilizado para diminuir as contagens de *Streptococcus mutans* da seguinte maneira segundo Maltz e cols. (MALTZ *et al.*, 1981).

1º dia: 4 aplicações de 5min, com um intervalo de 5min entre cada aplicação;

2º dia: 3 aplicações de 5min, com um intervalo de 5min entre cada aplicação.

Alguns Produtos Comerciais Disponíveis na Forma de Gel

- Noplak Max Gel ®/ Daudt (clorexidina 0,2%).

- Cleanform Gel ®/ Laboratório Fórmula e Ação (digluconato de clorexidina 0,12%).
- Perioxidin Gel Bioadesivo ®/ Laboratório Gross-Divisão Lacer (clorexidina 0,2%).
- PerioKIN gel dental antisséptico ®/ PharmaKIN (digluconato de clorexidina 0,2%).

Observação: Não foram encontradas no mercado nacional formulações comercialmente disponíveis do gel de clorexidina na concentração de 1%, que pode ser manipulado em farmácias.

Vernizes

Indicação: Como auxiliar no controle de placa para pacientes com altas contagens de *Streptococcus mutans* e atividade de cárie e também com gengivite e periodontite.

No mercado internacional existem três vernizes o Chlorzoin®, EC40® e Cervitec® com composições e concentrações diferentes e que têm mostrado resultados promissores no controle da cárie, em pacientes com altas contagens de *Streptococcus mutans* bem como da gengivite e periodontite (PUIG-SILLA *et al.*, 2008).

Alguns Produtos Comerciais Disponíveis na Forma de Verniz

No mercado nacional:

- Verniz com clorexidina e xilitol Barniz®/Laboratório Fórmula e ação no mercado internacional (Tabela 1):

Tabela 1. Vernizes de Clorexidina disponíveis comercialmente

Verniz	Composição	Laboratório
EC40 ®	40% Clorexidina Sandaral Etanol	Explore
Chlorzoin ®	10% Clorexidina Etanol Poliuretano Cloreto de metileno Benzoin Sumatra	Kwwell
Cervitec ®	1% Clorexidina 1% Timol Etanol/etil acetato Polivinil butirato	Vivadent

Adaptado de Matthijs and Adriaens, 2002.

Dentifrícios

Indicação: Os dentifrícios são utilizados como coadjuvantes ao controle mecânico de placa.

Alguns Produtos Comerciais Disponíveis na Forma de Dentifrício

- Cariax Gengivas pasta dentifrícia ®/ PharmaKIN (digluconato de clorexidina 0,12%).

1.1.2 Sais de Amônio Quaternário

Características

São compostos moncatiônicos com uma cadeia alifática. O agente mais comumente encontrado é o cloreto de cetilpiridínio (CPC) em uma concentração de 0,05%. Também encontramos o cloreto de benzalcônio.

Mecanismo de Ação

Atua sobre um largo espectro de bactérias bucais (JENKINS, 1994). O mecanismo de ação sugerido é o rompimento da membrana com extravasamento do conteúdo citoplasmático resultando em um colapso celular (HAPS *et al.*, 2008). Recentemente também tem sido evidenciado efeito antiviral do CPC e sua ação se dá pelo rompimento do envelope lipídico do vírus (MUKHERJEE *et al.*, 2017).

Substantividade

Como é um composto catiônico tal como a clorexidina, liga-se muito bem às estruturas bucais, entretanto, o cloreto de cetilpiridínio é rapidamente liberado dos sítios de ligação. Tem uma capacidade de retenção em torno de 3h, por essa razão sua substantividade é baixa (MORAN *et al.*, 1992).

Efetividade

A eficácia clínica é menor quando comparada com a clorexidina, devido à baixa substantividade (BINNEY *et al.*, 1992). Estudo realizado por Vandekerckhove *et al.*, em 1995, mostrou que bochechos de clorexidina foram mais eficazes quando comparados aos de cloreto de cetilpiridínio na inibição da formação de placa e no desenvolvimento de gengivite.

No intuito de melhorar o desempenho dos colutórios, são adicionadas novas substâncias que podem trazer benefícios relevantes. Em estudo clínico comparando duas formulações de CPC com placebo, foi verificada melhora na efetividade do enxaguatório nos parâmetros de sangramento gengival com adição de 0,28% de lactato de zinco (ROSING *et al.*, 2017). Em outro ensaio clínico randomizado, foi adicionado ácido hialurônico ao bochecho de CPC 0,05%. Foi observado que, após 21 dias de utilização, o colutório teste apresentou resultado similar na prevenção de placa comparado com o bochecho de CHX 0,2% e com menor efeito de manchamento dos dentes (TADAKAMADLA *et al.*, 2019). A melhora na eficácia do colutório associado a menor ocorrência de efeitos adversos podem contribuir para alternativas de tratamentos para pacientes que não possam fazer uso da clorexidina.

Efeitos Colaterais

As reações adversas são semelhantes às que ocorrem com a clorexidina, manchamento dos dentes, manchamento da língua, formação de cálculo supragengival, sensação de queimação e descamação da

mucosa (VANDEKERCKHOVE *et al.*, 1995; JENKINS *et al.*, 1994). Essas reações adversas foram observadas utilizando-se concentrações baixas de cloreto de cetilpiridínio (0,05%).

Meios de Utilização/Produtos

Bochechos

Indicação: Como coadjuvante ao controle mecânico de placa.

Alguns Produtos Comerciais Disponíveis na Forma de Solução/

Bochechos:

- Cepacol ® (cloreto de cetilpiridínio 0,05%).
- Oral B ® (Cloreto de cetilpiridínio 0,07%).
- Plax sem álcool ®/ Colgate (Cloreto de cetilpiridínio 0,075%).

1.1.3 Alcalóides Vegetais

Características

A **Sanguinarina** é um extrato vegetal alcalóide extraído da planta *Sanguinaria canadensis*, cuja utilização para o controle da placa dental e da gengivite tem sido testada em cremes dentais e colutórios.

Mecanismo de Ação

Seu mecanismo de ação ainda não está bem estabelecido. O proposto mecanismo de ação é pela alteração da superfície celular bacteriana, de modo que sua agregação e a adesão são reduzidas (TORRES, 2000).

Substantividade

O produto pode ser catiônico e o grau de substantividade é incerto.

Efetividade

Estudos avaliaram a efetividade da Sanguinarina utilizada na forma de solução (em bochechos) ou em cremes dentais no controle de placa e gengivite, foram observados resultados favoráveis e significativos quando comparados a utilização de placebo. No entanto, quando os estudos começaram a incluir controles positivos no seu desenvolvimento (uso da clorexidina), o efeito clínico desapareceu (HARPER *et al.*, 1990; MORAN *et al.*, 1992).

Efeitos Colaterais

Sensação de queimação. Estudos mostraram que a utilização de enxaguatórios contendo Sanguinarina tem mostrado um aumento de pelo menos dez vezes na probabilidade de lesões pré-cancerígenas, mesmo com a interrupção do uso do enxaguatório (ADDY, 2008).

Indicação

Como coadjuvante ao controle mecânico de placa.

Meios de Utilização/Produtos

Bochechos, Cremes Dentais – Produtos não disponíveis no Brasil.

1.2 Compostos Metálicos

Características

Os íons metálicos estanho (Sn), cobre (Cu) e zinco (Zn) possuem carga positiva e têm sido testados no controle da placa dental. Formulações contendo fluoreto estanhoso, citrato de zinco e sulfato de cobre têm sido avaliadas.

1.2.1 Fluoreto Estanhoso

O fluoreto estanhoso tem sido utilizado em cremes dentais: o seu grande problema é a estabilidade e o possível manchamento dos dentes. Este último pode ser diminuído com a escovação regular.

Efetividade

O fluoreto estanhoso tem sido utilizado em dentifrícios. Em estudo comparativo com dentifrícios contendo triclosan/gantrez e fluoreto de sódio, o fluoreto estanhoso foi significativamente mais eficaz na redução de gengivite e na formação de placa (MCCLANAHAN *et al.*,1997).

Efeitos Colaterais

O fluoreto estanhoso apresenta como efeito adverso o manchamento extrínseco dos dentes. Esse manchamento parece ocorrer pelos mesmos efeitos da clorexidina e outros antissépticos catiônicos, envolvendo a interação com cromógenos presentes na dieta (WATTS & ADDY, 2001).

Indicação

Como coadjuvante ao controle mecânico de placa.

Meios de Utilização/produtos

- Oral B pró saúde®/Oral B (fluoreto estanhoso 0,454%).

O fabricante ainda refere ter incorporado ao creme dental partículas de sílica com baixo grau de abrasividade e 13% de hexametáfosfato de sódio que diminuiria o manchamento dos dentes.

1.2.2 Citrato de Zinco

Efetividade

Estudos mostram que dentifrícios contendo citrato de zinco isoladamente não têm se mostrado tão eficazes no controle da placa dental quanto ao ser associados ao triclosan (BRADSHAW *et al.*,1993). Desta forma o citrato de zinco tem sido utilizado em dentifrícios normalmente associado ao triclosan.

Indicação

O citrato de zinco em associação com triclosan tem sido utilizado nos cremes dentais, como coadjuvante ao controle mecânico de placa.

Meios de Utilização/produtos

Dentifrícios

- Gengilacer®/ Laboratório Gross – Divisão Lacer (Triclosan 0,3%+Citrato de Zinco 0,5%).

1.2.3 Sulfato de Cobre

Efetividade

O sulfato de cobre foi testado como substitutivo ao controle mecânico de placa e mostrou ser tão eficaz quanto à clorexidina na inibição da formação da placa dental (WAERHAUG, 1984). Monteiro *et al.* (1990) testaram o efeito de bochechos de sulfato de cobre a 0,08% comparado com clorexidina a 0,12%, e observou que o sulfato de cobre foi tão efetivo quanto a clorexidina no controle de placa e gengivite, quando todos os métodos de controle mecânico de placa foram suspensos.

Efeitos colaterais

O sulfato de cobre apresenta efeitos colaterais semelhantes à clorexidina, ou seja, manchamento dos dentes, manchamento da língua, perda de paladar e em alguns casos erosão da mucosa. O sulfato de cobre pode, ainda, desencadear reações alérgicas, tem gosto ruim e não tem sido utilizado.

Indicação

O sulfato de cobre pode ser utilizado como substitutivo ao controle mecânico por períodos curtos de tempo.

Meios de Utilização/produtos

O Sulfato de cobre era utilizado em solução na concentração de 0,08%, em bochechos duas vezes ao dia. Não existem soluções comerciais disponíveis, porém pode ser manipulado em farmácias.

1.3 Compostos Fenólicos sem Carga

Nessa categoria temos o triclosan e os óleos essenciais, como o timol, eucaliptol, mentol.

1.3.1 Triclosan

Características

É um derivado fenólico, sintético, não iônico, bisfenólico, lipossolúvel que apresenta propriedades anti-inflamatórias, antimicrobianas e analgésicas.

Mecanismo de Ação

É um agente de amplo espectro contra bactérias gram-negativas, gram-positivas e micobactérias que atua na membrana citoplasmática. Em concentrações bacteriostáticas impede a captação de aminoácidos essenciais, em concentrações bactericidas causa a desorganização da membrana plasmática levando à quebra da célula (PANAGAKOS *et al.*, 2005).

Substantividade

Possui uma moderada substantividade, isso se deve ao fato de sua baixa solubilidade em meios aquosos. Para ser solubilizado necessita de solventes orgânicos.

Efetividade

Dentifrícios

A utilização do triclosan em dentifrícios tem sido associada a outras substâncias, como a copolímeros do ácido maleico e do polivinilmetil éter ou ao gantrez, a fim de aumentar sua substantividade (AFFLITTO *et al.*, 1989; GAFFAR *et al.*, 1990). Também tem sido associado ao citrato de zinco devido ao seu potencial antiplaca e anticálculo (ADDY & RENTON-HARPER, 1996).

Uma revisão sistemática avaliou a efetividade de dentifrícios contendo triclosan/copolímero na redução do acúmulo de placa e gengivite. Os resultados mostraram que houve uma redução de 23% de placa usando o índice de QHI e de 23% de gengivite usando o IG (DAVIES *et al.*, 2004). Em um estudo clínico, foi avaliado o efeito do dentifrício com triclosan/copolímero na placa preexistente e na gengivite e, após 6 meses, o grupo experimental mostrou redução de 34,9% nos níveis de placa e de 25,7% no de gengivite (TRIRATANA *et al.*, 2002). Entretanto, não foi demonstrado nenhum benefício clínico com o uso do dentifrício antimicrobiano em um estudo com 3 anos de acompanhamento, onde se avaliou mudanças clínicas e microbiológicas com o uso de escova elé-

trica e de dentifrício contendo triclosan/copolímero comparado com o uso de escova manual e dentifrício contendo fluoreto (BOGREN *et al.*, 2007). Nesse estudo os participantes recebiam reforço de cuidados bucais e controle profissional a cada 6 meses e talvez por essa razão o efeito do dentifrício com triclosan/copolímero tenha sido mínimo (TELES & TELES, 2008).

Bochechos

Estudos clínicos avaliaram o efeito inibitório na formação de placa de bochechos contendo triclosan, clorexidina, sanguinarina, sanguinarina associada ao zinco, extratos naturais e salina. A clorexidina mostrou resultados mais expressivos, seguida do triclosan quando comparada às outras substâncias (MORAN *et al.*, 1992; RENTON-HARPER *et al.*, 1996).

Efeitos Colaterais

Estudos têm demonstrado efeitos adversos relacionados ao uso do triclosan, tanto para saúde humana quanto a nível de contaminação ambiental e, por esse motivo, seu uso nos dentifrícios e colutórios vem sendo proibido (WEATHERLY & GOSSE, 2017).

Indicação

Como coadjuvante ao controle de placa.

Meios de Utilização/Produtos Comerciais

Dentifrícios

- Colgate Total 12 ® / Colgate (Triclosan 0,3%).
- Gengilacer ®/ Laboratório Gross-Divisão Lacer (Triclosan 0,3%+Citrato de Zinco 0,5%).

Bochechos

- Plax (Triclosan 0,03% + Gantrez 0,2%).
- Gingilacer Enxaguatório Bucal ®/ Laboratório Gross-Divisão Lacer (Triclosan a 0,15%+Cloreto de Zinco 0, 10%).

1.3.2 Óleos Essenciais

Características

É um dos antimicrobianos mais antigos, sendo descrito por Joseph Lister em 1865, que o utilizava para fazer assepsia pré-cirúrgica. Normalmente são utilizados em uma combinação de óleos essenciais naturais como o fenol, timol, eucaliptol, mentol e metil salicilato. Apresenta uma carga elétrica neutra.

Mecanismo de Ação

Tem um largo espectro atuando sobre bactérias gram-positivas, gram-negativas e leveduras. Seu efeito bactericida envolve a ruptura da parede celular e inibição enzimática. Os óleos essenciais também interferem na colonização bacteriana da superfície dental, impedindo a agregação com as espécies gram-positivas pioneiras, diminuindo a multiplicação bacteriana e extraíndo endotoxinas das bactérias gram-negativas (FINE *et al.*, 1996).

Substantividade

Os colutórios contendo óleos essenciais possuem uma substantividade comparável à da clorexidina. Jenkins *et al.* (1994), em um estudo *in vivo* com uma única aplicação de enxaguatório, verificaram redução nas contagens microbianas salivares por períodos de 5 a 7 horas. Esse período foi confirmado em estudo com formação de biofilme *in situ* que demonstrou que os óleos essenciais apresentam efeito antibacteriano imediato, uma capacidade de penetração no biofilme e uma duração de ação de pelo menos 7 horas após sua aplicação (QUINTAS *et al.* 2014).

Efetividade

Estudos que usam corantes fluorescentes para identificar a viabilidade das bactérias (live and dead) foram realizados *in vivo* para avaliar o poder de penetração dos óleos essenciais no biofilme dental. Verificaram que, 30min após o bochecho com óleos essenciais, 78,7% das bactérias das amostras de placa estavam mortas contra 27,9% do placebo

(PAN *et al.*, 2000). Vários estudos clínicos com duração de 6 meses avaliaram o efeito antiplaca e antigengivite de bochechos com óleos essenciais e os resultados mostraram que no índice de placa (QHI) houve uma redução que variou de 20% a 56,1% e no índice gengival modificado (MGI) uma redução que variou de 7,9% a 35,9% (DEPAOLA *et al.*, 1989; OVERHOLSER *et al.*, 1990; CHARLES *et al.*, 2001; SHARMA *et al.*, 2002, 2004; BAUROTH *et al.*, 2003). Em uma recente revisão sistemática, foi encontrado resultado que corrobora os achados destes ensaios clínicos, indicando que os óleos essenciais estão entre os agentes químicos mais eficazes para o controle de placa e gengivite (FIGUEIRÓ *et al.*, 2019).

Efeitos Colaterais

Apesar do alto teor de álcool presente na sua formulação, não existe na literatura suporte para uma associação entre bochechos contendo álcool e câncer na orofaringe (COLE *et al.*, 2003). Devido ao alto conteúdo de álcool pode ocasionar sensação de queimação e manchas nos dentes. Considerando os efeitos colaterais do colutório com álcool, foi realizado estudo clínico randomizado comparando a efetividade de uma solução *sem* álcool e outra *com* álcool e foi observado que o bochecho *sem* álcool teve o mesmo efeito na redução de placa e gengivite que a formulação com álcool após 6 meses de uso (LYNCH *et al.*, 2018).

Indicação

Como coadjuvante ao controle mecânico de placa.

Meios de Utilização/Produtos Comerciais

Bochechos

Listerine® composto por timol (0,064%), mentol (0,042%), eucaliptol (0,092%), metil salicilato (0,06%) diluído em veículo hidroalcoólico a 26,9%. Existem várias apresentações, mas sua composição não varia.

1.4 Detergentes

Características

Os detergentes são responsáveis pela modesta ação de inibição da placa observada nos dentífricos (ADDY *et al.*, 1983). O detergente mais largamente utilizado é o lauril sulfato de sódio nos dentífricos e soluções para bochecho. Isoladamente, demonstrou ter substantividade moderada, em torno de 5 a 7 horas e ação inibitória da placa semelhante à do triclosan (JENKINS *et al.*, 1991).

Indicação

Como coadjuvante ao controle mecânico de placa. Está presente na maioria dos cremes dentais e soluções para bochecho.

1.5 Agentes Oxigenantes

Características

Têm sido utilizados na odontologia para a desinfecção em diferentes especialidades. A utilização de *peróxido de hidrogênio* tem sido proposta em casos de lesões periodontais agudas, onde existe grande quantidade de bactérias anaeróbicas. Seu efeito se daria pela ação do oxigênio liberado. Entretanto, não deve ser utilizado para o controle químico da placa supragengival, pois não é eficaz.

Mecanismo de Ação

Sua ação ocorre basicamente pela liberação do oxigênio um potente radical livre, que atua principalmente sobre as bactérias anaeróbicas.

Efetividade

Os estudos de longo prazo não têm demonstrado vantagens adicionais em sua utilização (WOLFF *et al.*,1989).

Meios de Utilização/Produtos Comerciais

- Peroxyl, que contém peróxido de hidrogênio a 1,5%.

Indicação

Seu uso tem sido contra indicado, pois pode causar lesões nas mucosas orais. As lesões podem ser pequenas ou extensas dependendo da concentração utilizada e do tempo de aplicação.

1.6 Outros Agentes

1.6.1 Arginina

A arginina é um aminoácido que nos últimos anos vem sendo adicionada nos dentifrícios fluoretados como uma alternativa para o controle do desafio cariogênico. Seu modo de ação se baseia na metabolização da arginina pelos micro-organismos liberando amônia, provocando assim uma mudança no pH do biofilme e afetando o equilíbrio das bactérias (MALTZ; ALVES; ZENKNER, 2017). Wierichs *et al.* (2015), através de uma meta-análise revelaram que a adição de arginina a 1,5% em dentifrícios contendo 1400 ppm de flúor foi mais efetiva no combate a lesões de cárie radicular do que outros dentifrícios que não possuíam a arginina. Em contrapartida, um ensaio clínico randomizado, cruzado e duplo-cego, mostrou que um creme dental contendo arginina tem a capacidade de reduzir a produção de ácido láctico de forma significativa, porém a atividade metabólica, a proporção de bactérias tanto vivas como mortas e a massa total de biofilme não foram alteradas (XUE *et al.*, 2017). Evidenciando assim, que mais estudos são necessários sobre o uso de arginina adicionada aos cremes dentais fluoretados.

1.6.2 Delmopinol

O delmopinol, que é um amino-álcool, possui uma ação antibacteriana baseada na interferência da formação da matriz plaquetária, diminuindo assim a aderência das bactérias e interferindo na formação da placa bacteriana (SIMONSSON *et al.* 1991). Pode ser utilizado para o controle químico do biofilme dental e da gengivite (ADDY *et al.*, 2007). Claydon *et al.* (1996) relataram alguns efeitos colaterais pelo uso do delmopinol na cavidade bucal, tais como dormência e pigmentação na língua, alteração no paladar, dor na mucosa e, em alguns casos, erosão na mucosa.

Por outro lado, Hase *et al.* (1998) e Lang *et al.* (1998) relataram apenas a pigmentação dos dentes e da língua. A meta-análise realizada por Addy *et al.* (2004) corroborou esses estudos e concluiu que o delmopinol a 0,2% como enxaguante bucal possui um equilíbrio de benefícios e efeitos adversos no combate à placa dental e à gengivite, se mostrando uma alternativa viável à clorexidina para muitos pacientes.

1.6.3 Iodopovidona

A iodopovidona é apresentada como um enxaguante capaz de diminuir os níveis de placa dental e de gengivite, podendo ser usado como um complemento à higiene oral diária (ADDY, 1977). O mecanismo de ação da iodopovidona se baseia na sua afinidade pela membrana celular das bactérias, fungos, protozoários e vírus, liberando assim iodo livre que irá atuar diretamente na superfície da membrana desses micro-organismos (JAFER *et al.*, 2016). É relatado na literatura, por Ferguson, em 1978, como efeito colateral, que a absorção de iodo em níveis significan-

tes pela cavidade oral pode tornar esse composto insatisfatório. Porém, o estudo feito por Reilly *et al.* (2016) não relata nenhum efeito colateral no uso de curto prazo da iodopovidona 10% associada ao uso do fluoreto de sódio 5% em que houve uma redução no acúmulo de biofilme após a terapia. Seu uso é restrito, pois pode causar reações alérgicas, por isso não é utilizado para o controle do biofilme.

1.6.4 Dextranase

O dextrano é um polissacarídeo sintetizado pelo *Streptococcus* do grupo mutans (JIMENEZ, 2009). Esse açúcar é responsável por manter a integridade estrutural do biofilme, visto que promove o desenvolvimento e proliferação das bactérias (GIBBONS & FITZGERALD, 1969). Já a dextranase é a enzima que degrada o dextrano, sendo um meio viável para remover a placa dentária e para prevenir cárie, já que a degradação do açúcar afeta diretamente o biofilme dental (MAROTTA *et al.*, 2002; KHALIKOVA *et al.*, 2005). No mercado, as dextranases mais encontradas são as fúngicas e são apresentadas em colutórios, porém esse tipo da enzima possui uma faixa de efetividade a temperaturas entre 50 e 60°C, podendo não cumprir seu papel na cavidade bucal que apresenta uma temperatura média de 37°C (SIMONSON *et al.*, 1975; JIAO *et al.*, 2014). Por conta disso, recentemente as dextranases bacterianas estão sendo sugeridas como mais úteis, já que sua temperatura ideal é semelhante à da cavidade bucal (KHALIKOVA *et al.*, 2005; JIAO *et al.*, 2014). Lai *et al.* (2019) evidenciaram que a dextranase tem potencial de aplicação em produtos odontológicos, tais como dentifrícios e enxagua-

tórios, pois inibe efetivamente a formação de biofilme por *Streptococcus mutans* e não possui interferência com fluoreto de sódio, xilitol e benzoato de sódio que são usados em produtos odontológicos.

1.6.5 Própolis

O própolis é uma substância resinosa produzida pelas abelhas a partir de diversas fontes botânicas. Na colmeia, é utilizado principalmente como desinfectante contra agentes invasores (HWU & LIN, 2014). É uma complexa matriz formada de diversos compostos químicos, como resina, bálsamos, cera, pólenes, aminoácidos, minerais, vitaminas A, B e E, fenóis e compostos aromáticos. Os flavonóides são os compostos biologicamente ativos do própolis que são responsáveis pela maioria das propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias e antioxidantes (ABBASI *et al.*, 2018).

O extrato de própolis tem sido largamente usado com intuito de manter a saúde oral devido seus efeitos potenciais. Uma revisão sistemática que avaliou a eficácia de formulações à base de própolis verificou resultado promissor na redução do nível de micro-organismos orais (*Streptococcus mutans* e *Candida albicans*). Em relação ao controle de placa, não foi observada diferença significativa comparada ao placebo. Tais resultados demonstram que são necessários estudos clínicos randomizados adicionais para avaliar a eficácia do própolis no controle de placa e gengivite (HWU & LIN, 2014).

1.6.6 Aloe vera

As plantas medicinais vêm sendo testadas como agentes antiplaca (PARWANI *et al.*, 2013). Além disso, têm potencial efeito anti-inflamatório e propriedades antioxidantes, o que pode trazer benefícios adicionais à saúde gengival (CAI *et al.*, 2020). Produtos fitoterápicos podem ser à base de um único componente natural ou uma mistura de ervas e têm sido utilizados na odontologia em formulações de dentifrícios e colutórios (SAFIAGHDAM *et al.*, 2018).

Dentre os fitoterápicos, destaca-se a *Aloe vera* que é uma planta pertencente à família das Xanthorrhoeaceae e uma das espécies mais estudadas dentro do gênero *Aloe* (SALEHI *et al.*, 2018). O extrato dessa planta é composto principalmente por aloína, aloe-emodina, aloemana, acemanana, aloerida, naftoquinonas, metilcromonas, flavonóides, saponina, esteróis, aminoácidos e vitaminas (KARIM *et al.*, 2014). Seus componentes bioativos são relacionados a efeitos antibacterianos, antivirais, antifúngicos e anti-inflamatórios. Estudos pré-clínicos sugerem que o mecanismo de ação está associado ao estímulo da atividade fagocítica de leucócitos pelos polissacarídeos provenientes de *Aloe* spp. ocasionando a destruição das bactérias, efeitos citotóxicos e inibição da replicação dos vírus (SALEHI *et al.*, 2018).

O extrato de *Aloe vera* tem sido testado em estudos clínicos na odontologia em diversos meios de utilização. Em ensaio clínico randomizado (ECR) utilizando aloe vera em *dentifrício* comparado ao placebo foi observada redução nas contagens microbianas e melhora nos índices de placa e gengivite após 6 meses de utilização e resultado semelhante ao triclosan (PRADEEP *et al.*, 2012). Em um estudo controlado

randomizado avaliando bochecho contendo extrato de 100% de aloe vera, houve uma redução significativa no índice de placa comparada a CHX e sem efeitos adversos reportados (KARIM *et al.*, 2014). Kamath *et al.* (2019), avaliando a eficácia de *enxaguatório* em um ECR, verificaram diminuição no índice de placa e índice gengival após 4 semanas de uso e resultados semelhantes ao bochecho com CHX 0,2%. Em ensaio clínico realizado em pacientes ortodônticos, foi utilizado *gel* de aloe vera comparado a gel de CHX durante 1 mês para tratamento preventivo de úlcera traumática e foi observado resultado superior para aloe vera comparado à clorexidina, sugerindo um efeito protetor do gel de aloe vera para esse desfecho (LEIVA-CAVA *et al.*, 2019).

2 USO PROLONGADO

O uso prolongado de agentes antimicrobianos como adjuvantes ao controle mecânico da placa levanta duas principais preocupações com a segurança: o desenvolvimento de micro-organismos resistentes e o risco de câncer de boca associado ao teor alcoólico dos enxaguatórios.

Os antissépticos orais afetam um amplo espectro de micro-organismos e possuem mecanismos antimicrobianos inespecíficos, que afetam vários alvos diferentes na célula microbiana, inibindo uma variedade de processos celulares. Esse é provavelmente o principal motivo da falta de desenvolvimento de resistência bacteriana aos antissépticos. Mutações pontuais no micro-organismo podem afetar um dos mecanismos de ação de um dado antisséptico, mas raramente resultaria em resistência a todos os mecanismos (SREENIVISAN & GAFFAR, 2002). Diversos

estudos examinaram a segurança microbiológica a longo prazo de dentífrícios e enxaguatórios bucais contendo agentes antiplaca e nenhum deles relatou o desenvolvimento de infecções oportunistas, o crescimento excessivo de bactérias patogênicas ou o desenvolvimento de espécies resistentes (TELES, 2009).

É importante considerar que, por mais que não tenha desenvolvimento importante de espécies resistentes, já foram relatados casos de surtos de soluções contaminadas, o que evidencia a capacidade das bactérias de se adaptarem às substâncias (HAYDARI *et al.*, 2017). Além disso, o uso prolongado de antissépticos pode gerar mudanças irreversíveis no microbioma, uma vez que a exposição a antimicrobianos pode ocorrer não só por via oral, mas também pelo efeito cumulativo do meio ambiente contaminado (WEATHERLY & GOSSI, 2017). Portanto, mesmo que os produtos estejam sendo vendidos sem receita, a prescrição racional e cuidadosa por parte dos dentistas é imprescindível.

Preocupações com o alto teor de álcool em certas formulações de enxaguatórios bucais são justificadas pela associação bem estabelecida entre o consumo elevado de álcool e o risco elevado de desenvolver câncer de orofaringe. No entanto, uma revisão de estudos que sugeriu uma correlação entre enxaguatórios bucais contendo álcool e câncer bucal pela American Dental Association (ADA) e pela Food and Drug Administration (FDA) concluiu que esses estudos apresentaram várias deficiências (CLAFFEY, 2003). Duas análises sobre o tema concluíram que não havia suporte na literatura para uma associação entre enxaguatórios bucais contendo álcool e câncer de orofaringe (ELMORE & HORWITZ, 1995; COLE *et al.*, 2003).

3 CONCLUSÕES

Atualmente existe uma grande quantidade de produtos disponíveis para o controle químico da placa supragengival, ainda assim, o controle mecânico se faz necessário para promover a desorganização da placa dental. O controle químico pode e deve ser utilizado de acordo com a necessidade do indivíduo, seja para restabelecer a saúde bucal ou para atuar profilaticamente associado ao controle mecânico.

A clorexidina ainda é o padrão ouro para o controle da placa bacteriana associada à cárie e à doença periodontal, entretanto, seu uso por períodos prolongados pode acarretar efeitos indesejáveis como manchas e perda do paladar.

Agentes químicos contendo óleos essenciais ou triclosan/copolímero podem ser auxiliares valiosos quando utilizados conjuntamente ao controle mecânico.

É importante que o cirurgião dentista esteja familiarizado com os produtos disponíveis e tenha conhecimento sobre o seu modo de atuação e suas indicações para que possa utilizar os recursos mais apropriados para cada caso.

REFERÊNCIAS

ABBASI, A. J.; MOHAMMADI, F.; BAYAT, M.; GEMA, S. M.; GHADIRIAN, H.; SEIFI, H. ... & BAHRAMI, N. Applications of propolis in dentistry: a review. **Ethiopian Journal of Health Sciences**, 28(4), 2018.

ADDY, M.; GRIFFITHS, C.; ISAAC, R. The effect of povidone iodine on plaque and salivary bacteria. A double-blind crossover trial. **Journal of periodontology**, 48(11), p. 730, 1977.

ADDY M. O & MORAN, J. Comparison of plaque accumulation after topical application and mouth rinsing with chlorhexidine gluconate. **Journal of Clinical Periodontology**, 10, p. 69-71, 1983.

ADDY M. O & MORAN, J. Chemical Supragingival Plaque Control. In: LINDHE, J.; LANG, N.; KÄRRING, T. (org.). **Clinical Periodontology and Implant Dentistry**. 5th edition. Oxford: Blackwell Publishing, 2008. p. 734-765.

ADDY, M.; MORAN, J.; NEWCOMBE, R. G. Meta-analyses of studies of 0.2% delmopinol mouth rinse as an adjunct to gingival health and plaque control measures. **Journal of Clinical Periodontology**, 34(1), p. 58-65, 2007.

ADDY, M. & RENTON-HAPPER, P. Local and systemic chemotherapy in the management of periodontal disease: an opinion and review of the concept. **J Oral Rehabil**, 23, p. 219-231, 1996.

AFFLITTO, J.; FRAKHRY-SMITH, S.; GAFFAR, A. Salivary and plaque triclosan levels after brushing with a 0.3% triclosan/copolymer/NaF dentifrice. **Am J Dent**, 2(S), p. 207-210, 1989.

AXELSSON, P. & LINDHE, J. The effect of a preventive programme on dental plaque, gingivitis and caries in schoolchildren. Results after one and two years. **J Clin Periodontol**, 1, p. 126-138, 1974.

AXELSSON, P.; ALBANDAR, J. M.; RAMS, T. E. Prevention and Control of Periodontal Diseases in developing and industrialized nations. **Periodontol 2000**, 29, p. 235-246, 2002.

AXELSSON, P.; HYSTRÖM, B.; LINDHE, J. The long-term effect of a plaque control program on tooth mortality caries and periodontal disease in adults. Results after 30 years of maintenance. **Journal of Clin Periodontol**, 31, p. 749-757, 2004.

AZEVEDO, M. P. *et al.* Análise de saúde em ratos após uso de clorexidina. **Anais da XIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica**, p. 134, 1996.

BAUROTH, K.; CHARLES, C. H.; MANKODI, S. M.; SIMMONS, K.; ZHAO, Q.; KUMAR, L. D. The efficacy of an essential oil antiseptic mouthrinse vs. dental floss in controlling interproximal gingivitis: a comparative study. **J Am Dent Assoc**, 134, p. 359-365, 2003.

- BINNEY, A. *et al.* The effect of a commercially available triclosan-containing toothpaste compared to a sodium-fluoride-containing toothpaste and a chlorhexidine rinse on 4-day plaque regrowth. **J Clin Periodontol**, 22, p. 830-834, 1995.
- BINNEY, A. *et al.* The effect of a member of commercial mouthrinses compared with toothpastes on plaque regrowth. **J Periodontol**, 63, p. 839-842, 1992.
- BOGREN, A.; TELES, R. P.; TORRESYAP, G.; HAFFAJEE, A. D.; SOCRANSKY, S. S.; WENNSTROM, J. L. Clinical and microbiologic changes associated with the combined use of a powered toothbrush and a triclosan/copolymer dentifrice: a 3-year prospective study. **J Periodontol**, 78(9), p. 1708-1717, 2007.
- BONESVOLL, P.; LOKKEN, P.; RÖLLA, G. Influence of concentration, time, temperature and pH on the retention of chlorhexidine in the human oral cavity after mouth rinses. **Arch of Oral Biol**, 19, p. 1025-1029, 1974a.
- BONESVOLL, P.; LOKKEN, P.; RÖLLA, G.; PAUS, P. N. Retention of chlorhexidine in the human oral cavity after mouth rinses. **Arch of Oral Biol**, 19, p. 209-212, 1974b.
- BRADSHAW, D. J. *et al.* The effects of triclosan and zinc citrate, alone and in combination, on a community of oral bacteria growth in vitro. **J Dent Res**, 72, p. 25-30, 1993.
- CAI, H.; CHEN, J.; PANAGODAGE PERERA, N. K.; LIANG, X. Effects of Herbal Mouthwashes on Plaque and Inflammation Control for Patients with Gingivitis: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomised Controlled Trials. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2020.
- CHARLES, C. H.; SHARMA, N. C.; GALUSTIANS, H. J.; QAQISH, J.; MCGUIRE, J. A.; VINCENT, J. W. Comparative efficacy of an antiseptic mouth-rinse and an antiplaque/antigingivitis dentifrice. A six-month clinical trial. **J Am Dent Assoc**, 132, p. 670-675, 2001.
- CLAFFEY, N. Essential oil mouthwashes: a key component in oral health management. **Journal of Clinical Periodontology**, 30, p. 22-24, 2003.
- CLAYDON, N.; HUNTER, L.; MORAN, J.; WADE, W.; KELTY, E.; MOVERT, R.; ADDY, M. A 6-month home-usage trial of 0.1% and 0.2% delmopinol mouthwashes: (I). Effects on plaque, gingivitis, supragingival calculus and tooth staining. **Journal of Clinical Periodontology**, 23(3), p. 220-228, 1996.

COLE, P.; RODU, B.; MATHISEN, A. Alcohol-containing mouthwash and oropharyngeal cancer: a review of the epidemiology. **J Am Dent Assoc**, 134(8), p. 1079-1087, 2003.

COLLAERT, B.; ATTSTRÖM, R.; DE BRUYN, N.; MOVERT, R. The effect of delmopinol rinsing on dental plaque formation and gingivitis healing. **J Clin Periodontol**, 19, p. 274-280, 1992.

COLLAERT, B.; ATTSTRÖM, R.; EDWARDSSON, S.; HASE, J. C.; ÅSTRÖM, M.; MOVERT, R. Short-term effect of topical application of delmopinol on salivary microbiology, plaque, and gingivitis. **European Journal of Oral Sciences**, 102(1), p. 17-25, 1994.

COLLAERT, B.; EDWARDSSON, S.; ATTSTRÖM, R.; HASE, J. C.; ÅSTRÖM, M. Microbiology of early supragingival plaque development after delmopinol treatment. **Oral microbiology and immunology**, 8(1), p. 36-41, 1993.

DAVIES, R. M.; ELLWOOD, R. P.; DAVIES, G. M. The effectiveness of a toothpaste containing triclosan and polyvinyl-methyl ether maleic acid copolymer in improving plaque control and gingival health: a systematic review. **J Clin Periodontol**, 31(12), p. 1029-1033, 2004.

DE PAOLA, L. G.; OVERHOLSER, C. D.; MEILER, T. F.; MINAH, G. E.; NIEHAUS, C. Chemotherapeutic inhibition of supragingival dental plaque and gingivitis development. **J Clin Periodontol**, 16, p. 311-315, 1989.

EGGLESTON, G. & MONGE, A. Optimization of sugarcane factory application of commercial dextranases. **Process Biochemistry**, 40(5), p. 1881-1894, 2005.

ELMORE, J. G. & HORWITZ, R. I. Oral cancer and mouthwash use: evaluation of the epidemiologic evidence. **Otolaryngology-Head and Neck Surgery**, 113(3), p. 253-261, 1995.

FERGUSON, M. M.; GEDDES, D. A.; WRAY, D. The effect of a povidone-iodine mouthwash upon thyroid function and plaque accumulation. **British Dental Journal**, 144, p. 14-16, 1978.

FIGUERO, E.; NOBREGA, D. F.; GARCÍA-GARGALLO, M.; TENUTA, L. M.; HERRERA, D.; CARVALHO, J. C. Mechanical and chemical plaque control in the simultaneous management of gingivitis and caries: a systematic review. **Journal of clinical periodontology**, 44, p. S116-S134, 2017.

FINE, D. H.; FURGANG, D.; LIEB, R.; KORIK, I.; VINCENT, J. W.; BARNETT, M. L. Effects of sublethal exposure to an antiseptic mouthrinse on representative plaque bacteria. **J Clin Periodontol**, 23(5), p. 444-451, 1996.

FINE, D. H. Chemical agents to prevent and regulate plaque development. **Periodontol 2000**, 8, p. 87-107, 1995.

FINE, D. H. *et al.* Efficacy of a triclosan/ NaF dentifrice in the control of plaque and gingivitis and concurrent oral microflora monitoring. **Am J Dent**, 11, p. 259-270, 1998.

GAFFAR, A. *et al.* Antiplaque effects dentifrices containing triclosan/ copolymer/NaF system versus triclosan dentifrices without the copolymer. **Am J Dent**, 3(5), p. 7-14, 1990.

GIBBONS, R. J. & FITZGERALD, R. J. Dextran-induced agglutination of *Streptococcus mutans*, and its potential role in the formation of microbial dental plaques. **Journal of Bacteriology**, 98(2), p. 341-346, 1969.

GILBERT, P.; DAS, J.; FOLEY, I. Biofilm susceptibility to antimicrobials. **Adv Dent Res**, 11, p. 160-167, 1997.

GILBERT, P.; MAIRA-LITRAN, T.; MCBAIN, A. J.; RICKARD, A. H.; WHYTE, F. W. The physiology and collective recalcitrance of microbial biofilm communities. **Adv Microb Physiol**, 46, p. 203-55, 2002.

HAPPER, D. S. *et al.* Clinical efficacy of a dentifrice and oral rinse containing sanguinaria extract and zinc chloride during 6 months of use. **J Periodontol**, 61, p. 352-358, 1990.

HAPPER, P. R. *et al.* An approach to efficacy screening of mouthrinses: studies on a group of French products (II). Inhibition of salivary bacteria and plaque in vivo. **J Clin Periodontol**, 22, p. 723-727, 1995.

HAYDARI, M.; BARDAKCI, A. G.; KOLDSLAND, O. C.; AASS, A. M.; SANDVIK, L.; PREUS, H. R. Comparing the effect of 0.06%, 0.12% and 0.2% Chlorhexidine on plaque, bleeding and side effects in an experimental gingivitis model: a parallel group, double masked randomized clinical trial. **BMC oral health**, 17(1), p. 118, 2017.

HWU, Y. J. & LIN, F. Y. Effectiveness of propolis on oral health: a meta-analysis. **J Nurs Res**, 22(4), p. 221-9, 2014.

JAFER, M.; PATIL, S.; HOSMANI, J.; BHANDI, S. H.; CHALISSERRY, E. P.; ANIL, S. Chemical Plaque Control Strategies in the Prevention of Biofilm-associated Oral Diseases. **The journal of contemporary dental practice**, 17(4), p. 337-343, 2016.

JAMES, P.; WORTHINGTON, H. V.; PARNELL, C.; HARDING, M.; LAMONT, T.; CHEUNG, A.; ... RILEY, P. Chlorhexidine mouthrinse as an adjunctive treatment for gingival health. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, (3), 2017.

JENKINS, S. *et al.* A comparison of cetylpyridinium chloride, triclosan and chlorhexidine mouthrinse formulations for effects on plaque regrowth. **J Clin Periodontol**, 21, p. 441-444, 1994.

JENKINS, S.; ADDY, M.; NEWCOMBE, R. G. Triclosan and sodium lauryl sulphate mouth rinses. II. Effects on 4-day plaque re-growth. **J Clin Periodontol**, 18, p. 145-148, 1991a.

JENKINS, S.; ADDY, M.; NEWCOMBE, R. G. Triclosan and sodium lauryl sulphate mouth rinses. I. Effects on salivary bacterial counts. **J Clin Periodontol**, 18, p. 140-144, 1991b.

JENKINS, S.; ADDY, M.; WADE, W.; NEWCOMBE, R. G. The magnitude and duration of the effects of some mouthrinse products on salivary bacterial counts. **Journal of Clinical Periodontology**, 21(6), p. 397-401, 1994.

JIAO, Y. L.; WANG, S. J.; LV, M. S.; JIAO, B. H.; LI, W. J.; FANG, Y. W.; LIU, S. Characterization of a marine-derived dextranase and its application to the prevention of dental caries. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, 41(1), p. 17-26, 2014.

JIMÉNEZ, E. R. (2009). Dextranase in sugar industry: a review. **Sugar tech**, 11(2), p. 124-134, 2009.

JONES, C. G. Chlorhexidine: is it still the gold standard? **Periodontol 2000**, 15, p. 55-62, 1997.

KAMATH, N. P.; TANDON, S.; NAYAK, R.; NAIDU, S.; ANAND, P. S.; KAMATH, Y. S. The effect of aloe vera and tea tree oil mouthwashes on the oral health of school children. **European Archives of Paediatric Dentistry**, 21(1), p. 61-66, 2020.

KARIM, B.; BHASKAR, D. J.; AGALI, C.; GUPTA, D.; GUPTA, R. K.; JAIN, A.; KANWAR, A. Effect of Aloe vera mouthwash on periodontal health: triple blind randomized control trial. **J Clin Periodontol**, 13, p. 14-19, 2011.

KHALIKOVA, E.; SUSI, P.; KORPELA, T. Microbial dextran-hydrolyzing enzymes: fundamentals and applications. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 69(2), p. 306-325, 2005.

LAI, X.; LIU, X.; LIU, X.; DENG, T.; FENG, Y.; TIAN, X.; ... WANG, S. The Marine Catenovulum agarivorans MNH15 and Dextranase: Removing Dental Plaque. **Marine drugs**, 17(10), p. 592, 2019.

LANG, N. P. *et al.* Effect of supervised chlorhexidine mouthrinses in children. A longitudinal clinical trial. **Journal of Periodontal Research**, 17, p. 101-111, 1982.

LEE, S. S.; ZHANG, W. U.; LI, Y. The antimicrobial potential of 14 natural herbal dentifrices: results of an in vitro diffusion method study. **The Journal of the American Dental Association**, 135(8), p. 1133-1141, 2004.

LEIVA-CALA, C.; LORENZO-POUSO, A. I.; CENTENERA-CENTENERA, B.; LÓPEZ-PALAFIX, J.; GÁNDARA-VILA, P.; GARCÍA-GARCÍA, A.; PÉREZ-SAYÁNS, M. Clinical efficacy of an Aloe Vera gel versus a 0.12% chlorhexidine gel in preventing traumatic ulcers in patients with fixed orthodontic appliances: a double-blind randomized clinical trial. **Odontology**, 108(3), p. 470-478, 2020.

LINDHE, J. Gingivitis, General Discussion. **Journal of Clinical Periodontology**, 13, p. 395, 1986.

LÖE, H.; THEILADE, E.; JENSEN, S. B. Experimental gingivitis in man. **Journal of Periodontology**, 36, p. 177-187, 1965.

LÖE, H.; SCHIOTT, G. R. The effect of mouthrinses and topical application of chlorhexidine on the development of dental plaque and gingivitis in man. **J Periodont Res**, 5, p. 79-83, 1970.

LÖE, H. Progression of natural untreated periodontal disease in man. *In: Borderland between Caries and Periodontal Disease*. 3rd edn. Geneve: Medecin et Hygiene, 1986.

LOESCHE, W. Chemotherapy of dental plaque infections. **Oral Sciences Reviews**, 9, p. 65-107, 1976.

LYNCH, M. C.; CORTELLI, S. C.; MCGUIRE, J. A.; ZHANG, J.; RICCI-NITTEL, D.; MORDAS, C. J.; CORTELLI, J. R. The effects of essential oil mouthrinses with or without alcohol on plaque and gingivitis: a randomized controlled clinical study. **BMC Oral Health**, 18(1), p. 1-10, 2018.

MALTZ, M.; ALVES, L. S.; DO AMARAL ZENKNER, J. E. Biofilm Control and Oral Hygiene Practices. In: ROCHA DE OLIVERA CARRILHO, M. (org.) **Root Caries: From Prevalence to Therapy**. Vol. 26. Basel: Karger Publishers, p. 76-82, 2017.

MALTZ, M.; ZICHERT, I.; KRASSE, B. Effect of intensive treatment with chlorhexidine on number of streptococcus mutans in saliva. **Scand J Dent Res**, 89, p. 445-9, 1981.

MAROTTA, M.; MARTINO, A.; DE ROSA, A.; FARINA, E.; CARTENI, M.; DE ROSA, M. Degradation of dental plaque glucans and prevention of glucan formation using commercial enzymes. **Process Biochemistry**, 38(1), p. 101-108, 2002.

MARSH, P. D. Dental plaque as a microbial biofilm. **Caries Res**, 38, p. 204-211, 2004.

MATTHIJS, S.; ADRIAENS, P. A. Chlorhexidine varnishes: a review. **J Clin Periodontol**, 29(1), p. 1-8, 2002.

MCCLANAHAN, S. F. *et al.* A comparison of stabilized stannous fluoride dentifrice and triclosan/copolymer dentifrice for efficacy in the reduction of gingivitis and gingival bleeding: six-month clinical results. **J Clin Dent**, 8, p. 39-45, 1997.

MEJÀRE, B.; MEJÀRE, I.; EDWARDSSON, S. Bacteria beneath composite restorations culturing and histobacteriological study. **Acta Odontol Scand**, 37, p. 267-275, 1979.

MILLER, W. D. **The microorganisms of the mouth**. Leipzig: Georg Thieme, 1890.

MONTEIRO, M. S.; HENZ, S. L.; OPPERMANN, R. V. Estudo comparativo do efeito de dois anti-sépticos sobre a formação de placa bacteriana. **Revista brasileira de Odontologia**, 2, p. 2-5, 1990.

MORAN, J. *et al.* A comparison of natural product, triclosan and chlorhexidine mouthrinses on 4-day plaque regrowth. **J Clin Periodontol**, 19, p. 578-582, 1992.

MUKHERJEE, P. K.; ESPER, F.; BUCHHEIT, K.; ARTERS, K.; ADKINS, I.; GHANNOUM, M. A.; SALATA, R. A. Randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial to assess the safety and effectiveness of a novel dual-action oral topical formulation against upper respiratory infections. **BMC infectious diseases**, 17(1), p. 74, 2017.

NISHAD, A.; SREESAN, N. S.; JOY, J.; LAKSHMANAN, L.; THOMAS, J.; ANJALI, V. A. Impact of Mouthwashes on Antibacterial Activity of Subjects with Fixed Orthodontic Appliances: A Randomized Clinical Trial. **The journal of contemporary dental practice**, 18(12), p. 1112-1116, 2017.

ORLAND, F. J. *et al.* Use of the germ-free animal technique in the study of experimental dental caries. **J Dent Res**, 33, p. 147-174, 1954.

OVERHOLSER, C. D.; MEILLER, T. F.; DE PAOLA, L. G.; MINAH, G. E.; NIEHAUS, C. Comparative effects of 2 chemotherapeutic mouthrinses on the development of supragingival dental plaque and gingivitis. **J Clin Periodontol**, 17, p. 575-579, 1990.

PAN, P.; BARNETT, M. L.; COELHO, J.; BROGDON, C.; FINNEGAN, M. B. Determination of the in situ bactericidal activity of an essential oil mouthrinse using a vital stain method. **J Clin Periodontol**, 27(4), p. 256-261, 2000.

PANAGAKOS, F. S.; VOLPE, A. R.; PETRONE, M. E.; DEVIZIO, W.; DAVIES, R. M.; PROSKIN, H. M. Advanced oral antibacterial/anti-inflammatory technology: A comprehensive review of the clinical benefits of a triclosan/copolymer/fluoride dentifrice. **J Clin Dent.**, 16(S), p. 1-19, 2005.

PARWANI, S. R.; PARWANI, R. N.; CHITNIS, P. J.; DADLANI, H. P.; PRASAD, S. V. S. Comparative evaluation of anti-plaque efficacy of herbal and 0.2% chlorhexidine gluconate mouthwash in a 4-day plaque re-growth study. **Journal of Indian society of Periodontology**, 17(1), p. 72, 2013.

PRADEEP, A. R.; AGARWAL, E.; NAIK, S. B. Clinical and microbiologic effects of commercially available dentifrice containing aloe vera: a randomized controlled clinical trial. **Journal of periodontology**, 83(6), p. 797-804, 2012.

PUIG-SILLA, M.; MONTIEL-COMPANY, J. M.; ALMERICH-SILLA, J. M. Use of chlorhexidine varnishes in preventing and treating periodontal disease: A review of the literature. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, 13, p. 257-260, 2008.

QUINTAS, V.; PRADA-LÓPEZ, I.; PRADOS-FRUTOS, J. C.; TOMÁS, I. In situ antimicrobial activity on oral biofilm: essential oils vs. 0.2% chlorhexidine. **Clinical oral investigations**, 19(1), p. 97-107, 2015.

REILLY, C.; GOETTL, M.; STEINMETZ, M.; NIKRAD, J.; JONES, R. S. Short-term effects of povidone iodine and sodium fluoride therapy on plaque levels and microbiome diversity. **Oral Diseases**, 22(2), p. 155-161, 2016.

- RENTON-HARPER, P. *et al.* A comparison of chlorhexidine, cetylpyridinium chloride, triclosan, and C31G mouthrinse products for plaque inhibition. **J Periodontol**, 67, p. 486-489, 1996.
- RÖLLA, G. & MELSEN, B. On the mechanism of the plaque inhibition by chlorhexidine. **J Dent Res**, 54, p. 57-62, 1975.
- RÖSING, C. K.; CAVAGNI, J.; GAIO, E. J.; MUNIZ, F. W. M. G.; RANZAN, N.; OBALLE, H. J. R.; ZHANG, Y. P. Efficacy of two mouthwashes with cetylpyridinium chloride: a controlled randomized clinical trial. **Brazilian Oral Research**, 31, 2017.
- SAFIAGHDAM, H.; OVEISSI, V.; BAHRAMSOLTANI, R.; FARZAEI, M. H.; RAHIMI, R. Medicinal plants for gingivitis: a review of clinical trials. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, 21(10), p. 978, 2018.
- SALEHI, B.; ALBAYRAK, S.; ANTOLAK, H.; KRĘGIEL, D.; PAWLIKOWSKA, E.; SHARIFI-RAD, M.; ... VARONI, E. M. Aloe genus plants: from farm to food applications and phytopharmacotherapy. **International journal of molecular sciences**, 19(9), p. 2843, 2018.
- SEGRETO, V. A. *et al.* A comparison of a mouthrinses containing two concentrations of chlorhexidine. **J Periodontol Res**, 21, p. 23-27, 1986.
- SHARMA, N. C.; CHARLES, C. H.; QAQISH, J.; GALUSTIANS, H. J.; ZHAO, Q.; KUMAR, L. D. Comparative effectiveness of an essential oil mouthrinse and dental floss in controlling interproximal gingivitis and plaque. **Am J Dent**, 15, p. 351-355, 2002.
- SHARMA, N.; CHARLES, C. H.; LYNCH, M. C.; QAQISH, J.; MCGUIRE, J. A.; GALUSTIANS, J. G. *et al.* Adjunctive benefit of an essential oil containing mouthrinse in reducing plaque and gingivitis in patients who brush and floss regularly: a six-month study in controlling interproximal. **J Am Dent Assoc**, 135, p. 496-504, 2004.
- SIMONSON, L. G.; LIBERTA, A. E.; RICHARDSON, A. Characterization of an extracellular dextranase from *Fusarium moniliforme*. **Applied microbiology**, 30(5), p. 855-861, 1975.
- SIMONSSON, T.; HVID, E. B.; RUNDEGREN, J.; EDWARDSSON, S. Effect of delmopinol on in vitro dental plaque formation, bacterial acid production and the number of microorganisms in human saliva. **Oral microbiology and immunology**, 6(5), p. 305-309, 1991.

SREENIVASAN, P. & GAFFAR, A. Antiplaque biocides and bacterial resistance: a review. **Journal of Clinical Periodontology**, 29(11), p. 965-974, 2002.

TADAKAMADLA, S. K.; BHARATHWAJ, V. V.; DURAISWAMY, P.; SFORZA, C.; TARTAGLIA, G. M. Clinical efficacy of a new cetylpyridinium chloride-hyaluronic acid-based mouthrinse compared to chlorhexidine and placebo mouthrinses—A 21-day randomized clinical trial. **International Journal of Dental Hygiene**, 18(1), p. 116-123, 2020.

TELES, R. P. & TELES, F. R. F. Antimicrobial agents used in the control of periodontal biofilms: effective adjuncts to mechanical plaque control?. **Braz Oral Res**, 23, p. 39-48, 2009.

TENG, F.; HE, T.; HUANG, S.; BO, C. P.; LI, Z.; CHANG, J. L.; LING, J. Q. Cetylpyridinium chloride mouth rinses alleviate experimental gingivitis by inhibiting dental plaque maturation. **International Journal of Oral Science**, 8(3), p. 182-190, 2016.

TORRES, C. R. G. *et al.* Antimicrobial agents and your potential of use in odontology. **Pós Grad Rev**, 3, p. 41-52, 2000.

TRIRATANA, T.; RUSTOGI, K. N.; VOLPE, A. R.; DEVIZIO, W.; PETRONE, M.; GINGER, M. Clinical effect of a new liquid dentifrice containing triclosan/copolymer on existing plaque and gingivitis. **Am Dent Assoc**, 133(2), p. 219-225, 2002.

VAN DER HOEVEN, J. S. *et al.* The effect of chlorhexidine and zinc/triclosan mouthrinses on the production of acids in dental plaque. **Caries Res**, 27, p. 298-302, 1993.

VAN DER WEIJDEN, G. A.; TIMER, C. J.; TIMMERMAN, M. F.; REIJERSE, E.; MANTEL, M. S.; VAN DER VELDEN, U. The effect of extracts in an experimental mouthrinse on established plaque and gingivitis. **Journal of Clinical Periodontology**, 25, p. 399-403, 1998.

VANDEKERCKHOVE, B. N. *et al.* Efficacy on supragingival plaque control of cetylpyridinium chloride in a slow-release dosage form. **J Clin Periodontol**, 22, p. 842-849, 1995.

VAN SWAAIJ, B. W.; VAN DER WEIJDEN, G. A.; BAKKER, E. W.; GRAZIANI, F.; SLOT, D. E. Does chlorhexidine mouthwash, with an anti-discoloration system, reduce tooth surface discoloration without losing its efficacy? A systematic review and meta-analysis. **International journal of dental hygiene**, 18(1), 27-43, 2020.

- XUE, Y.; LU, Q.; TIAN, Y.; ZHOU, X.; CHENG, L.; REN, B. Effect of toothpaste containing arginine on dental plaque—A randomized controlled in situ study. **Journal of Dentistry**, 67, 88-93, 2017.
- WAERHAUG, M. *et al.* Comparison of the effect of chlorhexidine and CuSO₄ on plaque formation and development of gingivitis. **J Clin Periodontol**, 11, p. 176-180, 1984.
- WATTS, A. & ADDY, M. (2001). Tooth discoloration and staining: a review of the literature. **British Dental Journal**, 190, p. 309-16, 2001.
- WEATHERLY, L. M. & GOSSE, J. A. Triclosan exposure, transformation, and human health effects. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, Part B, 20(8), p. 447-469, 2017.
- WESTFELD, E. Rationale of mechanical plaque control. **Journal of Clinical Periodontology**, 23, p. 263-267, 1996.
- WIERICHS, R. J. & MEYER-LUECKEL, H. Systematic review on noninvasive treatment of root caries lesions. **Journal of dental research**, 94(2), p. 261-271, 2015.
- WOLFF, L. F.; PIHLSTROM, B. L.; BAKDASH, M. B.; SCHAFFER, E. M.; AEPPLI, D. M.; BANDT, C. L. Four-year investigation of salt and peroxide regimen compared with conventional oral hygiene. **J Am Dent Assoc.**, 118(1), p. 67-72, 1989.