



**UNIVERSIDADE POTIGUAR - UNP
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
CURSO DE MESTRADO EM ODONTOLOGIA**

**AÇÃO ANTIMICROBIANA DO XILITOL, CLOREXIDINA E
XILITOL-CLOREXIDINA SOBRE *Streptococcus mutans***

Melissa Cabral de Queiroz Simeão

**Natal-RN
Junho, 2008**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

MELISSA CABRAL DE QUEIROZ SIMEÃO

**AÇÃO ANTIMICROBIANA DO XILITOL, CLOREXIDINA E
XILITOL-CLOREXIDINA SOBRE *Streptococcus mutans***

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Odontologia da Universidade Potiguar - UnP, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Odontologia, Área de Concentração em Clínica Odontológica.

Orientador: Isabelita Duarte Azevedo

Co-Orientador: Cícero Gadê Neto

**Natal – RN
2008**

S589a Simeão, Melissa Cabral de Queiroz
Ação antimicrobiana do xilitol, clorexidina e xilitol--clorexidina sobre
Streptococcus mutans/ Melissa Cabral de Queiroz Simeão - - Rio Grande do
Norte,UNP/ Natal, 2008.
67 f, 29,7cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Potiguar-UNP, Mestrado em
Odontologia - área de concentração Clínica Odontológica.

“Orientação: Prof^ª. Dra. Isabelita Duarte Azevedo”

1. *Streptococcus mutans* 2. Xilitol. 3. cárie dentária. I. Autor. II.
Universidade Potiguar. III. Título.

CDD 617.645

MELISSA CABRAL DE QUEIROZ SIMEÃO

**AÇÃO ANTIMICROBIANA DO XILITOL, CLOREXIDINA E
XILITOL-CLOREXIDINA SOBRE *Streptococcus mutans***

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Odontologia da Universidade Potiguar, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Odontologia, Área de Concentração em Clínica Odontológica.

Data da Aprovação: ___/___/2008.

Professora Isabelita Duarte Azevedo
Universidade Potiguar - UnP

Professor Cícero Romão Gadê Neto
Universidade Potiguar - UnP

Professora Edja Maria de Brito Costa
Universidade Estadual da Paraíba - UEPB

**Natal – RN
2008**

A todos que acreditaram em mim

De tudo, ficaram três coisas:

A certeza de que estamos sempre começando...

A certeza de que precisamos continuar...

A certeza de que seremos interrompidos antes
de terminar...

Portanto devemos:

Fazer da interrupção um caminho novo...

Da queda um passo de dança...

Do medo, uma escada...

Do sonho, uma ponte...

Da procura, um encontro...

(Fernando Sabino)

No fim tudo dá certo, se não deu certo é
porque ainda não chegou ao fim.

(Fernando Sabino)

Dedicatória

Ao meu Marido, Simeão

Por sua dedicação, compreensão, carinho e presença na minha vida. Por sua incansável vontade de me ajudar. Por me fazer sorrir e ser feliz...

Amar-te é saber repetir boas lembranças, reviver nossos momentos mais belos, ser feliz ao teu lado, nosso amor é a maior verdade.

AGRADECIMENTOS

A Deus, minha eterna gratidão. Agradeço a Deus pelo dom da vida, por tudo o que sou e por ter guiado cada um de meus passos mostrando-me o quanto sou capaz frente a todos os obstáculos que surgiram neste novo desafio. Sem você meu sonho não seria possível.

Ao meu pai José Maria e a minha mãe Eunice, por ter me acompanhado em todos os momentos de minha vida. Sempre me ensinando a enfrentar todas as dificuldades, possibilitando a realização de todos os meus sonhos. Amo vocês.

Ao meu marido e companheiro inseparável de todas as horas Simeão, a razão da minha vida. Obrigada por sempre me estimular e me apoiar em tudo que eu precisei com muito amor, respeito e amizade sincera e incondicional. Por me mostrar o que significa o verdadeiro amor. Por compartilhar comigo todos os momentos da minha vida pessoal e profissional. Obrigado por estar ao meu lado nos momentos mais difíceis em que pensei em desistir e que você esteve comigo. Desculpa pelos momentos em que estive ausente, mas sempre pensando no meu amor. Muitíssimo obrigada, pelo simples fato de você existir e fazer parte de minha vida. Eu te amo.

Ao meu filho amado Gabriel, a razão da minha energia, persistência e luta. A você, fonte de toda a minha inspiração, dedico essa vitória, pois a cada dia que te via sorrindo para mim crescia uma vontade cada vez maior de conseguir alcançar o objetivo final. Você meu lindo filho é o anjo que Deus colocou em minha vida. Agradeço a Deus pelo simples fato de você existir e me fazer à mãe mais feliz do mundo. Te amo filho.

As minhas irmãs Gabriela e Cristiane, obrigada pelas grandes amigas que são. Obrigada pela união nos momentos importantes. Amo vocês.

A minha sobrinha Julia, ao meu sobrinho Bernardo e ao meu sobrinho Davi, por me amarem tanto e por serem abençoados. Amo vocês.

A minha grande amiga e professora Galganny pelos ensinamentos e pela amizade. Obrigada pelo companheirismo tão sincero e por todo o apoio nas horas mais difíceis. Com

você aprendi tudo que sei em Odontopediatria. Obrigada pela oportunidade que você me deu no curso de especialização. Muito obrigada por me incentivar na busca de meus ideais. Sua amizade é muito preciosa. Obrigada por tudo.

A Professora Isabelita Duarte Azevedo, mais que uma orientadora e professora, uma amiga nova que fiz. Obrigada pela experiência e pelos ensinamentos que me deu em toda essa trajetória. Estando sempre disposta a me ajudar, indicando e me dando uma luz na hora certa. Muito obrigada por sempre me incentivar. Eu não sei como agradecer, pra mim você é mais do que um anjo. Você é um modelo completo de um verdadeiro professor. Deus a abençoe!

Ao professor Cícero Gadê Neto, por sua paciência e entusiasmo de ensinar. Por sua dedicação e incansável orientação.

A Professora Rejane Andrade de Carvalho pelo exemplo de dedicação e seriedade sempre ajudando e incentivando os alunos a seguir a vida acadêmica. Obrigado pela oportunidade de aprender com você o que é ser um verdadeiro professor.

Ao Professor Flávio pelos ensinamentos e pela grande ajuda na análise estatística.

A todos os professores do mestrado pelos ensinamentos, pelo apoio à pesquisa e pelo estímulo à vida acadêmica.

A Raíssa pelo amor de pessoa que você é. Obrigada por me receber com muita atenção no laboratório de microbiologia sempre ajudando com a maior boa vontade do mundo. Sem a sua participação esse trabalho não seria possível. Saiba que esse trabalho também é seu. Você foi mais um anjo que Deus colocou no meu caminho. Muito obrigada por tudo de coração.

A minha amiga Anajara, por me consolar nos momentos em que precisei, pelo seu apóio, pela sua amizade verdadeira sempre ao meu lado, acreditando em mim e em meus ideais. Não vou me esquecer das nossas conversas infindáveis. Obrigada por me abrigar em sua casa com todo carinho. Obrigada por ser minha amiga. Já estou morrendo de saudade de você mais saiba que amigas de verdade não se separam. Agradeça seus pais pela acolhida, pelo carinho e dedicação em todos os momentos em que fiquei em sua casa. Amiga você mora no meu coração.

A minha amiga Criseuda, por ser tão atenciosa e presente em todas as horas. Parabéns pelo modelo de mulher guerreira e vitoriosa que você é. Obrigada pela amizade.

A nova amiga que fiz Mariana, obrigada pela constante ajuda, boa vontade, atenção e dedicação em todos os momentos dessa pesquisa. Sempre me ajudando e se preocupando com cada detalhe. Sou muita grata a você por tudo. Muito obrigada pelo seu carinho e amizade. Você é uma pessoa maravilhosa.

A Letícia, obrigada pela disposição e colaboração na pesquisa. Ajudando sempre quando foi preciso. Deus te abençoe!

As minhas queridas amigas Karla e Érica, por serem tão especiais e serem minhas amigas para sempre. Amo todas vocês. Vocês moram em meu coração.

A minha amiga Bia e Wlândia por me apoiarem e me ouvirem no momento em que precisei. Adoro vocês.

As novas amigas que fiz Glória, Olímpia e Joedy por torcerem por mim o tempo todo. Vocês são pessoas maravilhosas. Obrigada por me incentivar e por tocar por mim o tempo todo. Obrigada pela amizade.

Ao amigo Gustavo, pela colaboração nas fotos e pela boa convivência nesse mestrado.

Aos amigos de turma Larissa, Rogério, Tarcísio, Ana Paula e aos demais colegas do mestrado, pela convivência agradável e pelo aprendizado nesse mestrado.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar, *in vitro*, a eficácia de substâncias antimicrobianas contra o *Streptococcus mutans* em três etapas: teste de exposição direta, medida dos halos de inibição de crescimento e quantificação das unidades formadoras de colônia. No primeiro momento foram avaliadas soluções de xilitol a 35%, clorexidina a 0,12%, soluções de xilitol a 0,5% e a associação dessas substâncias sobre *S. mutans* (ATCC 25175). Após contaminação de cones de papel absorventes em suspensões microbianas experimentais, durante 5 minutos, os mesmos foram expostos às soluções estudadas, considerando os intervalos de tempo de 45, 60 e 120 segundos. Decorrido o intervalo de tempo de estudo, as pontas de papel foram transportadas para 5mL de caldo neutralizante (DIFCO). A avaliação do resultado foi conduzida pelo método turbidimétrico, utilizando-se como padrão a escala visual de McFarland. Houve crescimento microbiano em todos os grupos teste, embora o crescimento tenha sido menor em relação ao controle positivo. No segundo momento, se avaliou a inibição de crescimento do *S. mutans* por clorexidina 0,12%, xilitol 35%, associação de clorexidina 0,12% com xilitol 35%, clorexidina 2% e solução salina 0,9% através da técnica de difusão em Agar. Cinco discos estéreis de papel absorvente foram imersos em 5mL das soluções testadas e distribuídos equidistantemente no meio ágar Muller-Hinton semeado com *S. mutans*, permanecendo por 48 horas. Num segundo grupo, os discos foram fixados na ponta de um alfinete estéril, imersos em 5mL das soluções antimicrobianas e levados para uma placa de Petri semeada com *S. mutans*. Cada disco permaneceu em contato com a superfície da placa, por 120 segundos, sendo, posteriormente, removido através da extremidade livre do alfinete. Esse processo foi repetido, várias vezes, até que se totalizassem seis placas de Petri em cada um dos grupos. As 12 placas foram levadas para estufa bacteriológica. O diâmetro das zonas de inibição do crescimento microbiano foi aferido por um paquímetro digital (Quimis) nos tempos de 24 e 48 horas. Houve inibição estatisticamente significativa da clorexidina 2% ($p < 0,05$), grupo controle positivo, porém a clorexidina 0,12% sozinha e/ou associada ao xilitol 35% não apresentou diferença entre si. No terceiro momento, após contaminação de cones de papel absorventes em suspensões microbianas experimentais, durante 5 minutos, os mesmos foram removidos e expostos às soluções de clorexidina 0,12%, xilitol 35%, associação de clorexidina 0,12% com xilitol 35%, clorexidina 2% e solução salina 0,9%, onde permaneceram por 120 segundos. Em seguida, foram transferidos para uma nova solução salina 0,9% estéril, permanecendo por 10 minutos e depois levado a um novo tubo com nova solução salina sendo, então, submetido a agitador de tubos (Vórtex) por 20 segundos. Este processo foi realizado três vezes resultando num total de 15 tubos de ensaio vortexados. Aliquotas de 50 μ L do conteúdo de cada um desses tubos de ensaio foram plaqueadas no meio ágar BHI. Ao total, obtiveram-se 75 placas de Petri que foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas. A associação de clorexidina 0,12% ao xilitol 35% apresentou um menor número de unidades formadoras de colônias comparada ao grupo controle positivo. Não houve diferença estatística ($p > 0,05$) para o grupo clorexidina 2% e para a associação clorexidina 0,12% com xilitol 35%. As soluções testadas apresentaram efeito bacteriostático contra o *S. mutans* e a associação de clorexidina 0,12% associada ao xilitol 35% mostrou-se benéfica uma vez que assemelhou-se ao controle positivo (Clorexidina 2%) no que diz respeito a inviabilização das UFC de *S. mutans*. Estudos *in vivo* precisam ser desenvolvidos para se investigar o sinergismo da associação do xilitol 35% a clorexidina 0,12%.

Palavras Chaves: *Streptococcus mutans*, clorexidina, xilitol, cárie dentária.

ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate, *in vitro*, the effectiveness of antimicrobial substances against *Streptococcus mutans* in three steps: direct exposure experiment, measurement of the growth of halos inhibition, and the quantification of colony forming units. Initially, solutions of 35% xylitol, 0.12% chlorhexidine, 0.5% xylitol and the association of these substances on *S. mutans* (ATCC 25175) were analyzed. Considering the range of time of 45, 60 and 120 seconds, absorbent paper cones were exposed to the studied solutions for 5 minutes, following contamination on microbial experimental suspensions. Undergone timing of the study, the tips of cone paper were transported to 5mL of neutralizing broth (DIFCO). The evaluation of the results were conducted by turbidimetric method, using as a standard, the visual scale of McFarland. Although growth has been low compared with the positive control, there was microbial growth in all test groups. The second step of the study, the inhibition growth of *S. mutans* by 0.12% chlorhexidine, 35% xylitol, association of 0.12% chlorhexidine with 35% xylitol, 2% chlorhexidine and 0.9% saline solution, through the technique of broadcasting in agar were evaluated. Five discs of sterile paper towels were immersed in 5 mL of the solutions tested, and distributed equidistantly in the middle agar Muller-Hinton sown with *S. mutans*, remaining for 48 hours. In a second group, the discs were set at the tip of a sterile pin, immersed in 5 ml of antimicrobial solutions, and taken to a Petri dish sown with *S. mutans*. Each disc remained on the plate surface for 120 seconds, and then removed through the free end of the pin. This process was repeated numerous times until it totalized six slabs of Petri in each of the groups. The 12 boards were taken to a bacteriological stove. A digital caliper (Quimis) measured the diameter of the inhibition zones of the microbial growth in 24 and 48 hours. There was a statistically significant inhibition of 2% chlorhexidine ($p < 0.05$), positive control group, however the 0.12% chlorhexidine alone and/or associated with 35% xylitol did not demonstrate any difference among them. In the third step, after contamination of absorbent cone papers on microbial experimental suspensions during 5 minutes, they were removed and exposed to the solutions of 0.12% chlorhexidine, 35% xylitol, association of 0.12% chlorhexidine with 35% xylitol, 2% chlorhexidine and 0.9% saline solution, which remained for 120 seconds. After that, they were transferred to a new 0.9% sterile saline solution, remaining for 10 minutes, then moved to a new tube with new saline solution, and then subjected to shaker tubes (Vórtex) for 20 seconds. This procedure was performed three times resulting in a total of 15 vortexed test tubes. Aliquots of 50 μ L of the contents of each test tube were tagged in the middle agar BHI. In total, 75 Petri plates were obtained by incubation in bacteriological oven at 37°C for 24 hours. The association of 0.12% chlorhexidine to 35% xylitol presented a smaller number of colony forming units compared to the positive control group. There was no statistical difference ($p > 0.05$) for the 2% chlorhexidine group and for the association of 0.12% chlorhexidine with 35% xylitol. The solutions tested showed bacteriostatic effect against *S. mutans*. Furthermore, the combination of 0.12% chlorhexidine associated to 35% xylitol proved to be beneficial, since resembled to the positive control (2% chlorhexidine) in respect of the impracticability CFU of the *S. mutans*. More *in vivo* studies need to be developed to investigate the synergism of the association of 0.12% chlorhexidine to 35% xylitol.

Keywords: *Streptococcus mutans*, chlorhexidine, xylitol, dental caries.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE TABELAS.....	13
LISTA DE GRÁFICOS	14
1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 PROPOSIÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 CÁRIE DENTÁRIA: UMA PERSPECTIVA MICROBIOLÓGICA.....	16
2.2 CONTROLE DO BIOFILME DENTÁRIO.....	18
2.3 CLOREXIDINA.....	20
2.4 XILITOL	23
2.5 ASSOCIAÇÃO DA CLOREXIDINA E XILITOL	26
3 MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1 PRIMEIRA ETAPA – CRESCIMENTO BACTERIANO.....	28
3.2 SEGUNDA ETAPA – AÇÃO ANTIMICROBIANA DE XILITOL, CLOREXIDINA E ASSOCIAÇÃO SOBRE <i>Streptococcus mutans</i>	37
3.3 TERCEIRA ETAPA - CONTAGEM DAS UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIA.....	41
3.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	44
4 RESULTADOS.....	45
5 DISCUSSÃO.....	51
6 CONCLUSÕES	56
REFERÊNCIAS	57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: <i>S. mutans</i> em meio BHI. Natal-RN, 2008.....	29
Figura 2: Processo de padronização. Natal-RN, 2008.....	30
Figura 3: Padronização pela Escala de Mcfarland. Natal-RN, 2008.....	30
Figura 4: Contaminação dos cones de papel com <i>S. mutans</i> . Natal-RN, 2008.	31
Figura 5: Exposição dos cones contaminados com <i>S. mutans</i> a solução antimicrobiana. Natal-RN, 2008.....	32
Figura 6: Cone de papel em tubo de ensaio contendo caldo neutralizante. Natal-RN, 2008. .	33
Figura 7: Tubos de ensaio em ambiente anaeróbico. Natal-RN, 2008.....	34
Figura 8: Leitura final dos tubos de ensaio. Natal-RN, 2008.....	35
Figura 9: Teste de coloração de gram. Natal-RN, 2008.....	36
Figura 10: Presença de cocos Gram positivos. Natal-RN, 2008.	36
Figura 11: Semeadura do <i>S. mutans</i> em ágar Mueller-Hinton. Natal-RN, 2008.....	38
Figura 12: Colocação de disco circular presos a alfinete estéril. Natal-RN, 2008.....	39
Figura 13: Colocação dos discos de papel na placa de petri. Natal-RN, 2008.....	40
Figura 14: Transferência do cone para solução salina. Natal-RN, 2.008.....	42
Figura 15: Utilização do agitador de tubos. Natal-RN, 2.008.....	43
Figura 16: Distribuição com auxílio de alça de Digrafsky. Natal-RN, 2.008.....	43
Figura 17: Contagem das unidades formadoras de colônias. Natal-RN, 2.008.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela I: Crescimento do <i>S. mutans</i> , segundo a Escala visual de Mcfarland, comparando-se agentes antimicrobianos e tempo de exposição. Natal, 2008.	45
Tabela II: Circunferência média dos halos de inibição do crescimento do <i>S. mutans</i> frente a diversas soluções antimicrobianas em disco de papel, após 24 horas e 48 horas de incubação. Natal, 2008.....	46
Tabela III: Halos de inibição do crescimento do <i>S. mutans</i> , após dois minutos de exposição às soluções antimicrobianas, 24 e 48 horas de incubação. Natal, 2008.	47
Tabela IV: Número de unidades formadoras de colônias de <i>S. mutans</i> exposto à Clorexidina 0,12%, Xilitol 35%, Clorexidina 0,12% + Xilitol 35%, Clorexidina 2% e Solução salina 0,9%. Natal, 2008.	49
Tabela V: Quantidades de unidades formadoras de colônias de <i>S. mutans</i> exposto à Clorexidina 0,12%, Xilitol 35%, Clorexidina 0,12% + Xilitol 35%, Clorexidina 2% e Solução salina 0,9%. Natal, 2008.	50

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico I: Registro das médias, em milímetros, dos halos de inibição do crescimento do <i>S. mutans</i> , frente a diversas soluções antimicrobianas em disco de papel, após 24 horas e 48 horas de incubação. Natal, 2008.....	47
Gráfico II: Halos de inibição (em milímetro) do crescimento do <i>S. mutans</i> , após dois minutos de exposição às soluções antimicrobianas, 24 e 48 horas de incubação. Natal, 2008.....	48
Gráfico III: Unidades formadoras de colônias de <i>S. mutans</i> exposto às substâncias antimicrobianas. Natal, 2008.	49

1 INTRODUÇÃO

A cárie é uma doença infecciosa, transmissível e de origem bacteriana. Tem caráter multifatorial e é usualmente crônica. Caracteriza-se pela desmineralização da parte inorgânica e destruição da substância orgânica do esmalte dentário. Apesar de seu declínio nas populações mais favorecidas, ela continua sendo um sério problema de saúde pública.

Há muitos anos têm-se tentado buscar procedimentos simples e acurados para identificar as pessoas vulneráveis à cárie, cuja principal diferença entre a saúde e a doença não é a quantidade do acúmulo de biofilme, e sim a sua composição bacteriológica (PERES *et al.* 2003).

Streptococcus mutans (*S. mutans*) é o principal microrganismo responsável pelo início da formação de cárie em humanos. Evidências científicas mostram que o modo primário de transmissão desses organismos é vertical, de mãe para filho. Conseqüentemente é importante estudar alternativas que possam diminuir e/ou inibir este processo (MODESTO & DRAKE, 2006). *S. mutans* é o principal microrganismo cariogênico devido a suas propriedades acidogênicas e acidúricas. Atualmente, o *S. mutans* e *S. sobrinus* apresentam velocidades de produção de ácidos significativamente maiores do que outras espécies de *Streptococcus* (LORENZO, 2004).

A remoção mecânica do biofilme é o método soberano no controle da doença cárie. No entanto, existem dificuldades na remoção feita pelo próprio paciente. Frente ao reconhecimento das limitações dos métodos mecânicos de higiene, foram realizadas pesquisas com agentes químicos visando o controle do biofilme (GEBARA, ZARDETTO & MAYER, 1996).

O xilitol é um poliol aprovado para o uso em alimentos e freqüentemente usado nos produtos apontados como preventivos em saúde bucal. Ele reduz a formação do biofilme e a aderência bacteriana, inibindo a desmineralização do esmalte com efeito inibitório direto sobre o *S. mutans*. Além disso, o xilitol tem a propriedade de prolongar o efeito da clorexidina na terapia oral de *S. mutans* (ORAL HEALTH POLICIES, 2006).

A clorexidina é uma bis-guanidina, de largo espectro bacteriano, alta substantividade e dentre os agentes antimicrobianos testados é o mais eficiente agente antimicrobiano contra o *S. mutans*, que tem ação direta sobre a cárie dentária. Freqüentemente empregada em pacientes debilitados, indivíduos incapacitados física e/ou mentalmente, bem como aqueles pouco cooperativos, com alto risco de cárie e ou doença periodontal.

Estudos clínicos demonstraram que mães submetidas a tratamento com clorexidina seguido do uso de goma de mascar contendo xilitol, apresentaram níveis salivares de *S. mutans* significativamente reduzidos e inibição da transmissão deste microrganismo para seus filhos (MODESTO & DRAKE, 2006).

Diante da permanência de elevados índices de cárie dentária na população como um todo e reconhecendo-se o papel do microrganismo no desenvolvimento da mesma, a realização dessa pesquisa justifica-se pela necessidade de se testar soluções antimicrobianas que contribuam para a diminuição dos níveis de *S. mutans* e, conseqüentemente, para o controle da doença cárie.

Frente ao exposto, pretende-se com esse estudo verificar o efeito antimicrobiano de soluções de xilitol, clorexidina e associação dessas duas substâncias sobre *S. mutans*.

1.1 PROPOSIÇÃO

Avaliar a ação antimicrobiana das soluções de xilitol, clorexidina e associação de xilitol e clorexidina sobre o microrganismo *S. mutans*.

Determinar a eficácia antimicrobiana destas soluções por exposição direta, sobre o microrganismo mencionado em períodos de 45, 60 e 120 segundos.

Medir o halo de inibição por essas substâncias sobre o microrganismo estudado por 24 horas e 48 horas.

Determinar a eficácia antimicrobiana destas soluções de forma quantitativa através do método de exposição direta.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CÁRIE DENTÁRIA: UMA PERSPECTIVA MICROBIOLÓGICA

A cárie dentária durante muito tempo foi, e talvez ainda seja tratada apenas no sentido mais estrito da palavra (do latim destruição, decomposição), ou seja, limitando o seu tratamento apenas à remoção do tecido cariado e obturação da cavidade decorrente. Pode ser tida como uma doença típica do homem civilizado e, de maneira genérica, todo indivíduo adulto em algum momento da sua vida é acometido pela cárie dentária, datando, porém, da pré-história o aparecimento da cárie entre os seres humanos. Em um exame realizado em 100 crânios do homem de Neanderthal não se constatou a presença de cárie, significando não a sua ausência, mas sim uma incidência de cárie apenas ocasional neste período, restrita a uns poucos espécimes. Porém a partir de um maior consumo de açúcar por volta do ano de 1665 a incidência de cárie aumentou drasticamente (PINHEIRO, 1983).

Nos levantamentos da Organização Mundial de Saúde - OMS pode ser observada que a cárie tem apresentado franco declínio em algumas populações, especialmente em países desenvolvidos. Entretanto, o mesmo não é observado nas populações menos favorecidas, onde sua prevalência permanece elevada. Dados do SB Brasil ano 2002-2003 apresentaram um percentual de 60% das crianças com cinco anos de idade já acometida pela doença cárie (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003). Essa expressiva manifestação precoce da doença representa um importante problema de saúde pública, requerendo grandes esforços na tentativa de controlar a situação (BOWEN, 2002).

A cárie dentária tem sido uma das doenças mais prevalentes do ser humano. Através dos tempos, muitas teorias sobre a sua etiologia foram levantadas, porém só em 1890 com os estudos de Miller W.D. é que se formou a base para a teoria acidogênica de desenvolvimento da cárie. Verifica-se, portanto, uma destruição progressiva dos cristais de hidroxiapatita pelos ácidos bacterianos, levando a uma descalcificação e posterior perda da estrutura do dente. Este processo tem como etiologia fundamental a inter-relação entre a microbiota oral cariogênica e fatores como: padrão de ingestão de carboidratos; hospedeiro e seus sistemas de defesa; tempo de exposição (FIGUEIREDO & FALSTER, 1997; SEOW, 1998; FADEL & KOZLOWSKI, 1999).

Essa patologia tem início antes do desenvolvimento da lesão clinicamente detectável. Sua manifestação provém de uma etiologia multifatorial na qual interagem

superfície dentária, carboidratos da dieta, saliva e os microrganismos do biofilme dentário (SERRA, LOFFREDO & PINELLI, 2000).

O conceito de cárie como uma doença infecciosa, transmissível, de caráter crônico e de origem bacteriana é o mais aceito dentro da Odontologia desde o reconhecimento de sua etiologia a partir do biofilme específico. Esse processo é causado pela desmineralização da superfície dental por ácidos orgânicos provenientes da fermentação dos carboidratos da dieta, pelas bactérias cariogênicas (HOUTE, 1994; HELDERMAN *et al*, 1996; BURT, 2006).

O grupo mutans de estreptococos orais é constituído por sete espécies: *Streptococcus cricetus*, *S. downei*, *S. ferus*, *S. macacae*, *S. mutans*, *S. rattus* e *S. sobrinus* (WHILEY & BEIGHTON, 1998). Esta classificação é baseada em diferenças nas características genéticas, antigênicas e bioquímicas. Dentre as espécies desse grupo, *S. mutans* e *S. sobrinus* são isolados com maior frequência da odontal e estão fortemente associados à cárie dentária humana (HAMADA & SLADE, 1980; LOESCHE, 1986; LINDQUIST & EMILSON, 1990; SEOW, 1998).

A complexidade da comunidade microbiana no biofilme bacteriano torna difícil a determinação de um único agente causador da doença cárie. Um grupo de bactérias bucais denominadas de estreptococos do grupo mutans tem sido considerado o maior responsável pelo início da formação de cárie dentária em humanos. A relação entre a colonização pelo *S. mutans* em elevados níveis na cavidade bucal e a presença do biofilme, com o alto risco em desenvolver lesões cariosas, assim como com a presença da cárie já estabelecida, é a maior evidência da ligação desta bactéria com a cárie (ALALUUSU & MALMIVIRTA, 1994; HOUTE, 1994; MACIEL, MARCENES & SHEIHAM, 2001). Para reforçar esta teoria, alguns estudos demonstram que a prevenção ou a supressão nos níveis de *S. mutans* resulta em um processo inverso, ou seja, o risco é reduzido e, conseqüentemente, a prevalência e incidência das lesões cariosas (TENOVUO *et al.*, 1992; ISOKANKAGAS *et al.*, 2000; SODERLING *et al.*, 2001). Sendo assim fica claro que o controle da doença cárie está intimamente ligado à presença desta bactéria como integrante do biofilme dentário.

Segundo Berkowitz, Turner & Green (1980), os estreptococos do grupo mutans necessitam de superfícies dentárias para colonizar, não estando, portanto, na boca das crianças antes da irrupção dos dentes, podendo fazer parte apenas de uma flora transitória, sem riscos a saúde. Apesar da idade, as superfícies dentárias, uma vez presentes na cavidade bucal podem ser colonizadas e iniciar a formação do biofilme bacteriano cariogênico. Devido ao seu sistema metabólico, gera um nicho acidogênico que extrapola a capacidade tampão salivar, desencadeando alterações na camada mineral da superfície dentária, provocando a

desmineralização progressiva e iniciando o processo cariioso (KREULEN *et al.* 1997; GRÖNROOS, 2000).

Sabe-se que em pacientes com alta atividade de cárie, a concentração de *S. mutans* na saliva é freqüentemente elevada. Tal concentração varia de hospedeiro para hospedeiro, sendo as condições endógenas do mesmo, responsáveis por estes níveis. Vários fatores relacionados à ecologia bucal são atribuídos a condições que favorecem o estabelecimento e multiplicação de *S. mutans* na cavidade bucal. As características genéticas do hospedeiro associadas à microbiota bucal são as mais relevantes.

Por outro lado, fatores como a composição e o fluxo da saliva, higiene bucal e exposição ao flúor participam da regulação da progressão da doença, tanto diminuindo, como aumentando a resistência dos dentes à cárie, controlando não só a quantidade como o tipo de microrganismos relacionados com a instalação da cárie e com a cariogenicidade do substrato (ARAÚJO, 1994).

Peres *et al* (2003) verificaram a prevalência dos estreptococos do grupo mutans na biofilme dentário dos dentes decíduos ântero-superiores de crianças de creches da cidade de Joinville. Constatou-se a presença de *S. mutans* em 99,25% das amostras do biofilme dentário, ou seja, em 133 dos 134 indivíduos analisados.

Nomelini & Cunha (2006) descreveram a prevalência de cárie, a cariogenicidade da alimentação e padrão de higiene bucal em 111 crianças da cidade de Uberaba. Não foi documentada cárie nas crianças de 0 a 12 meses, embora a higiene fosse ruim. Observou-se que 50% das crianças persistiam com alimentação na madrugada e alto consumo de sacarose, resultando em prevalências crescentes de cárie.

2.2 CONTROLE DO BIOFILME DENTÁRIO

O enfoque na prevenção de doenças e na promoção de saúde tem norteado as ações nas diversas especialidades odontológicas. No entanto um dos maiores desafios para o cirurgião dentista ainda é o controle do biofilme oral, fator determinante para os resultados satisfatórios durante e após tratamentos de cárie dentária (SEKINO *et al*, 2004).

O biofilme dentário é uma massa densa, não calcificada, constituída por microrganismos envolvidos em uma matriz rica em polissacarídeos extracelulares bacterianos e glicoproteínas salivares, firmemente aderida aos dentes, cálculos e outras superfícies da cavidade oral. Na maioria das vezes, o biofilme se desenvolve sobre a película adquirida, que

é um biofilme derivado da saliva que reveste toda a cavidade oral (LASCALA, BELUZO & LASCALA JÚNIOR, 1996).

Hoje o método mais valioso para controle do biofilme dentário, atuando na sua prevenção e remoção, é o seu controle mecânico. A eficiência do controle mecânico do biofilme depende de uma série de fatores que variam desde a interação paciente-profissional até a habilidade motora do paciente para exercê-lo de forma eficiente. Este controle deve ser encarado como um recurso dinâmico dependente de motivação. É uma técnica simples constituída por vários dispositivos de limpeza dos dentes, porém suas armas mais poderosas, por serem mais eficientes, são as escovas dentais e os meios de limpeza interproximal, isto é, as escovas interproximais e os fios dentais (GEBRAN & GEBERT, 2002).

Dessa forma, a prevenção e o controle da cárie dentária e da doença periodontal dependem, impreterivelmente, do controle do biofilme. Este controle pode envolver muitas vezes aspectos mecânicos e/ou químicos. Em princípio, o controle químico seria indicado como coadjuvante ao controle mecânico, podendo substituí-lo por períodos curtos de tempo, quando necessário (GEBRAN & GEBERT, 2002).

Na intenção de se auxiliar os meios de limpeza mecânica habitual exercida pelo paciente, têm-se utilizado vários agentes químicos, visando suprir eventuais falhas no controle mecânico. Com isso, os agentes químicos poderiam atuar especificamente em situações na qual o paciente apresente alto risco de cárie, juntamente com o aconselhamento dietético e outras medidas não invasivas de controle da doença (GEBRAN & GEBERT, 2002).

Existem duas razões que justificam a utilização deste método, a primeira diz respeito que tanto à cárie quanto à doença periodontal é de origem bacteriana, e deste modo substâncias antibacterianas poderiam ser utilizadas para combatê-las; e a segunda razão deve-se à existência de indivíduos que possuem dificuldades no controle mecânico de biofilme, e assim as substâncias antibacterianas poderiam tentar minimizar as limitações. Ainda existe a possibilidade de se realizar o controle químico através de agentes que atuam supra ou subgingivalmente (GEBRAN & GEBERT, 2002).

Para o controle químico, existe uma variedade de agentes, com diferentes modos e espectros de ação, dos quais se destacam a clorexidina e o xilitol pelos expressivos resultados no controle do nível de *S. mutans* e, conseqüentemente, da cárie dentária (MODESTO & DRAKE, 2006).

Segundo Cury (1987), o controle do biofilme seja por métodos mecânicos ou químicos, tem se mostrado o principal recurso na prevenção de cárie e gengivite.

al, 1995). Sobre o metabolismo bacteriano, esta bis-biguanida inibe complexos enzimáticos entre os quais se destacam os sistemas glicosiltransferase e 2-fosfoenolpiruvato fosfotransferase, sendo que a 2-fosfoenol-piruvato fosfotransferase é uma enzima considerada vital para o processamento e a manutenção da via glicolítica. Esta enzima integra o sistema de fosfotransferência, através do qual se dá a incorporação de glicose às células bacterianas (LOESCHE, 1993).

Almeida & Bastos (2001) avaliaram o comportamento do biofilme, em crianças de nove anos, realizando escovações supervisionadas de dez em dez dias, com um gel, a base de clorexidina a 1%. Os resultados com a clorexidina a 1% não eliminou o *S. mutans* do biofilme.

Klein, Canellis & Drak (1999) compararam quatro administrações quimioterapêuticas utilizadas para inibir a progressão de lesão de cárie. As substâncias testadas foram: nitrato de prata, fluoreto de estanho, diamino fluoreto de prata e clorexidina sobre *S. mutans* e *Lactobacillus Casei*. Seis semanas após aplicações das substâncias testadas em 85 terceiros molares permanentes, concluíram que o fluoreto de estanho, o fluoreto de estanho ou o nitrato de prata resultaram em uma menor progressão da lesão de cárie em relação às demais substâncias testadas.

Lima *et al* (2001) avaliaram os níveis de infecção de bactérias cariogênicas e sua colonização após o uso de bochechos com NaF, clorexidina e NaF associados. Concluíram que a clorexidina associada ao NaF foi o único agente que reduziu os níveis de *S. mutans* por trinta dias.

Freitas *et al* (2003) avaliaram a efetividade da associação fluoreto-clorexidina na prevenção de gengivite e da cárie, avaliando se existe uma potencialização desses dois antimicrobianos associados. Os resultados mostraram que a associação da clorexidina com o fluoreto nas concentrações estudadas parece não ter efeito benéfico, devido à redução da substantividade da clorexidina.

Botelho (2000) pesquisou os efeitos inibitórios entre combinações de agentes antimicrobianos utilizados no controle da cárie. Os agentes antimicrobianos testados foram: dicloridrato de clorexidina, cloreto de benzalcônio, cetrimide e cloreto de citilpiridínio sobre uma espécie de *S. mutans*, *Lactobacillo* e *Actinimices*. Foi observado se houve sinergia, antagonismo, entre as substâncias utilizadas. De acordo com o resultado *in vitro*, não houve nenhum efeito benéfico ao se combinar os agentes antimicrobianos sobre os microrganismos cariogênicos selecionados.

Drake *et al*, (1993) avaliaram se a clorexidina associada com o cobre exerceria sinergia sobre o *Actinomyces viscosus*, *Actinomyces naeslundii*, e *S. mutans*. O estudo confirmou haver uma sinergia entre a associação da clorexidina com o cobre, diminuindo o número dessas bactérias, em comparação com a clorexidina sozinha. Este estudo sugere que um colutório contendo clorexidina e cobre poderia ser útil ajudando a controlar a doença cárie e a gengivite.

Segundo Araújo, Araújo & Campos (2001), a clorexidina na concentração de 0,12% é tão eficaz quanto na concentração de 0,2% no tratamento da gengivite e no controle do biofilme oral. Este achado justifica o uso de concentrações mínimas adequadas às exigências clínicas.

Van Strydonck *et al* (2005) avaliaram o efeito sobre a inibição do biofilme e a percepção do gosto da clorexidina a 0,12% não-alcoólica e clorexidina a 0,2% álcool base. Concluíram que após 72 horas sem escovação, não houve diferença significativa no acúmulo de biofilme dentário entre os dois grupos. No entanto, a clorexidina a 0,2% na avaliação do sabor foi a mais desagradável.

Têm sido amplamente estudadas as diversas concentrações de clorexidina para pacientes com diferentes características clínicas (LOE & SCHIOTT, 1970; GROSSMAN *et al*, 1986; MACHADO *et al*, 2002; KOEMAN *et al.*, 2006). Mesmo assim a clorexidina 0,12% está presente em grande parte dos colutórios disponíveis no mercado, provavelmente por sua eficácia na prevenção da formação do biofilme e gengivite (ALBANDAR, GJERMO & PREUS, 1994; RENTO-HARPER *et al*, 1996).

Os benefícios da ação anti-séptica da clorexidina são incontestáveis, muito embora seu uso contínuo por longo período acarrete alguns efeitos colaterais. A maioria dos profissionais da área não recomenda o uso diário em longo prazo, principalmente por causa de seus efeitos colaterais tais como manchas dentárias, queimação na língua, alteração do paladar e em alguns casos, descamação e dor na mucosa bucal (FLEMMING *et al*, 1990; GJERMO & SAXTON, 1991). O uso freqüente da clorexidina a 0,12% pode causar a perda temporária do paladar e também alteração no sabor dos alimentos (RAMAGLIA *et al*, 1999; ALMEIDA & BASTOS, 2001).

A clorexidina tem sido considerada unanimemente, como o agente antibiofilme mais eficaz, apesar dos efeitos colaterais e da hipótese de possíveis mecanismos de resistência bacteriana.

2.4 XILITOL

O xilitol é um álcool de açúcar de cinco carbonos com doçura similar a sacarose. É usado como um adoçante em produtos alimentares. O xilitol é produzido comercialmente das árvores do videiro e de outras madeiras duras que contêm o xilana. Mais recentemente, para reduzir os custos da produção do xilitol, ele está sendo produzido a partir da espiga do milho e do resíduo da cana de açúcar ou de outras fibras. O xilitol pode ser encontrado em pequenas quantidades nas frutas, legumes, verduras e cogumelos silvestres. O corpo humano também produz xilitol regularmente durante o metabolismo normal, cerca de 5 a 15 gramas por dia (LATIF & RAJOKA, 2001; TADA *ET al*, 2004).

Sua utilização vem desde a década de 60 na terapia de infusão para pós-operatório de pacientes queimados e em choque; na dieta de pacientes diabéticos; e recentemente como adoçante nos produtos utilizados na prevenção da saúde bucal (GUIDELINES POLICY ON THE USE OF XYLITOL IN CARIES PREVENTION, 2006-2007).

Utilizado também como um adoçante não cariogênico em gomas de mascar e pastilhas, propriedades anticariogênicas e terapêuticas também têm sido atribuídas a ele (TRAHAN, 1995). Desta forma, este açúcar alcoólico tem sido incorporado em produtos utilizados para higiene bucal, como dentifrícios e enxaguatórios (PETERSSON, BIRKHED & GLEERUP, 1991; CUTRESS *et al.*, 1992; SINTES *et al.*, 1995; LINGSTRÖM *et al.*, 1997; GIERTSEN, EMBERLAND & SCHEIE, 1999).

Foi aprovado pela FDA desde os anos 60 e é seguro para o uso em crianças. Semelhante a muitos outros polióis, é frequentemente mais utilizado como adoçantes em alimentos, fármacos. Os polióis são absorvidos lentamente pelo aparelho gastrointestinal humano. O principal efeito colateral associado ao poliól é a diarreia, que ocorre somente quando é consumido em grandes quantidades (LY *et al*, 2006).

O álcool de açúcar foi apresentado como não cariogênico e também anticariogênico. Sua propriedade cariostática deve-se ao fato de não ser metabolizado pelos microrganismos cariogênicos, o que impossibilita a proliferação das bactérias e, em consequência, reduz a produção de ácido láctico que desmineralizam a superfície do esmalte dentário. Além disso, também pode ser classificado como anticariogênico, por estimular a produção de saliva, que possui capacidade tampão, o que, juntamente com o aumento na concentração de íons cálcio e fosfato, induz a remineralização, revertendo lesões iniciais de cárie dentária (HAYES, 2001; LIMA & BERLICK, 2003).

Dentre as hipóteses propostas para explicar o efeito do xilitol na redução da incidência da cárie dentária, efeitos específicos no metabolismo e crescimento bacteriano tem sido considerados. O mecanismo pelo qual xilitol inibe o crescimento e metabolismo bacteriano pode se parcialmente descrito pelo consumo de fosfoenolpiruvato (PEP), uma vez que o xilitol é transportado via frutose-sistema fosfotransferase (frutose-PTS) (TRAHAN *et al.*, 1985), resultando em acúmulo intracelular de xilitol 5-fosfato. Este metabólito intermediário não é utilizado, sendo então desfosforilado e expelido do interior celular como xilitol (ASSEV, WALER & ROLLA, 1983; SÖDERLING & PIHLANTO-LEPPÄLÄ, 1989). Este ciclo fútil consome energia e resulta em inibição do crescimento e metabolismo bacteriano.

Os microrganismos cariogênicos não metabolizam o xilitol, entretanto o xilitol é absorvido e acumulado intracelularmente no *S. mutans*. Ele compete com a sacarina para seu transportador celular e seus processos metabólicos intracelulares. Ao contrário do metabolismo da sacarina, que produz a energia e promove o crescimento bacteriano, o *S. mutans* gasta energia para dividir o xilitol acumulado sem render a energia no retorno. Além disso, os intermediários da produção de energia são consumidos e não reproduzidos pelo metabolismo do xilitol. Isso tem sido demonstrado *in vitro* e pode contribuir para a redução de níveis de *S. mutans* na saliva e no biofilme e uma redução na produção de ácido entre os que consomem xilitol (TRAHAN, 1995).

O xilitol reduz a formação do biofilme dentário e impede a aderência do *S. mutans* na superfície do esmalte. Seu uso prolongado seleciona um xilitol resistente a ação do *S. mutans*. Resultando em uma redução desses microrganismos (REFERENCE MANUAL, 2006-2007).

Em acréscimo, o xilitol tem uma série de outros efeitos sobre o *S. mutans* que pode contribuir para alguns de seus efeitos clínicos na redução da doença cárie. O consumo em curto prazo de xilitol está associado à diminuição dos níveis de *S. mutans* na saliva e no biofilme. O consumo habitual em longo prazo parece ter um efeito seletivo sobre *S. mutans*. Isso conduz à seleção para as populações que são menos virulentas e menos capazes de aderir às superfícies do dente e, assim, são vertidas mais facilmente do biofilme para saliva. Este efeito pode ser importante não só para a experiência de cárie do indivíduo, mas também pode influenciar na transmissão vertical de *S. mutans* (TRAHAN, 1995).

Mouton, Scheinin & Makinen (1975) analisaram o efeito de gomas de mascar contendo xilitol na redução do biofilme dentário. Para tanto utilizou uma amostra de 96 estudantes de Odontologia, divididos aleatoriamente em três grupos: um com 32 estudantes

utilizando gomas de mascar com sacarose, outro com 36 estudantes utilizando gomas de mascar com xilitol e um grupo controle com 28 estudantes que não utilizava nenhuma goma de mascar. Eles foram instruídos a permanecerem durante três dias com higiene restrita para permitir a formação de biofilme dentário. Esta foi a primeira fase do experimento, onde os estudantes receberam instrução para mascar seis gomas por dia, sendo uma ao acordar, duas após a primeira refeição, duas após a segunda refeição e uma ao deitar. Na segunda fase, foi realizado o registro clínico, através de mensuração do biofilme dentário. Na avaliação dos registros, foi observado que o peso do biofilme coletado no grupo que utilizou gomas com xilitol foi 24% menor que no grupo controle e 40% menor que no grupo que utilizou as gomas contendo sacarose, indicando que o uso da goma de mascar contendo xilitol promovem efeitos benéficos na amostra analisada.

Jaana (2002) avaliou a aceitação e a conformidade de um regime de goma de mascar contendo xilitol por crianças e professores da sala de aula em um programa. Trinta e cinco crianças mastigaram a goma de xilitol três vezes ao dia durante um período de três semanas. A aceitação das crianças foi avaliada segundo um questionário. As avaliações positivas foram dadas para a mastigação do xilitol (94%) e (86%) para o seu gosto. A aceitação dos professores também foi boa.

Jaana (2002) também avaliou os efeitos da utilização de gomas de xilitol nos níveis salivares de *S. mutans*. Foram selecionadas 61 crianças que mascavam estas gomas por 5 minutos durante três semanas. Como resultado verificou-se uma mudança de 48% dos níveis salivares de *S. mutans* no grupo que utilizou goma de mascar com xilitol.

Hildebrandt & Sparks (2000) selecionaram 151 indivíduos com altos níveis de *S. mutans*. Um grupo bochechou clorexidina a 0,12% duas vezes por dia durante 14 dias. O grupo teste mascava uma goma de xilitol, comercializada, três vezes ao dia durante no mínimo cinco minutos cada por três meses. Os indivíduos do grupo placebo utilizaram uma goma de mascar de sorbitol, comercializado, e os indivíduos do grupo controle não mastigaram nenhuma goma. Os autores avaliaram a concentração de *S. mutans* sobre a dentição usando amostras de parafina-estimulada na saliva. Os autores diluíram as amostras sucessivamente, plaqueando-as sobre meios seletivos e incubando-as anaerobicamente; eles então enumeraram as colônias sob um microscópio. A goma de mascar com xilitol prolongou o efeito do tratamento de clorexidina sobre *S. mutans*.

Isokangas *et al.* (2000) estudaram os efeitos de goma de mascar contendo xilitol em futuras mães que apresentavam grande quantidade de *S. mutans* na saliva, para a prevenção de cáries de seus filhos. Elas iniciaram o uso do xilitol em gomas de mascar três

meses antes do nascimento de seus filhos, quatro vezes ao dia. Após o nascimento dos bebês o uso foi interrompido por 24 meses. Os efeitos do xilitol foram comparados ao uso do verniz com flúor e clorexidina aplicado 6,12 e 18 meses após o parto. Nenhuma criança recebeu qualquer tratamento profilático durante os dois anos. Os resultados obtidos mostraram que o uso regular de xilitol pelas mães propiciou uma redução estatisticamente significativa na colonização de *S. mutans* nos seus filhos de dois anos comparados com os dentes em crianças cujas mães receberam o tratamento de verniz com flúor ou clorexidina, sendo também mais tardia a ocorrência da primeira cárie nas crianças do grupo xilitol. Com cinco anos de idade as crianças do grupo xilitol apresentavam 70% menos lesões de cárie dentária quando comparadas aos outros grupos. Os autores concluíram que o uso de gomas de mascar contendo xilitol pelas mães pode prevenir a cárie dentária em crianças por impedir a transmissão de *S. mutans* das mães para seus filhos.

Soderling *et al*, em 2000, realizaram um estudo para descobrir se as mães que consumiam habitualmente xilitol poderiam evitar a transmissão de *S. mutans* para seus filhos. As gestantes foram divididas em três grupos: gomas de mascar contendo xilitol, verniz de clorexidina e verniz de fluoreto. Os resultados obtidos mostraram que a incidência de cárie nas mães foram similares nos três grupos e o risco das crianças desenvolverem colônias de *S. mutans* foi cinco vezes maior no grupo flúor e três vezes maior no grupo clorexidina, comparados ao xilitol.

Beckers (1988) observou a influência do xilitol no metabolismo da glicose sobre *S. mutans*. Houve inibição tanto na taxa de crescimento como na produção ácida do microrganismo. Houve, também, uma inibição das lesões de cárie na fissura na presença de xilitol comparada ao grupo que utilizou glicose.

2.5 ASSOCIAÇÃO DA CLOREXIDINA E XILITOL

A associação da clorexidina com xilitol pode ser uma alternativa para evitar os efeitos colaterais da clorexidina, pois o xilitol em forma de solução pode ser usado por um longo período sem causar efeitos adversos. Além disso, diminuiria os níveis de *S. mutans* em mães com alto risco de cárie e, conseqüentemente, a contaminação precoce dos bebês; permitiria que pacientes física e mentalmente incapacitados com dificuldade de higienização pudessem utilizar essa associação reduzindo, também, os níveis de bactérias cariogênicas (GEBARA, ZARDETTO & MAYER, 1996; MACHADO *et al.*, 2002; BURT, 2006).

A associação destas duas substâncias com outros agentes como, por exemplo, entre clorexidina e fluoreto e entre xilitol e sorbitol pode ser observada em estudos como os de Pienihakkinen *et al* (1995), Makinen *et al* (1996) e Jannesson *et al* (2002). Estes estudos avaliaram a possível potencialização de uma substância pela outra no controle da cárie.

Simons *et al* (1999) conduziram um estudo de 14 dias utilizando goma de mascar de clorexidina e xilitol e concluíram que a associação dessas substâncias reduz significativamente os níveis salivares de *S. mutans*, muito mais do que o grupo que utilizou apenas xilitol.

Outro estudo menciona que o uso contínuo de clorexidina seguido de xilitol reduz os níveis salivares de *S. mutans*. Este retornou aos níveis iniciais bem mais devagar no grupo que utilizou clorexidina seguido de xilitol (HILDEBRANT & SPARKS, 2000).

Modesto & Drake (2002) observaram que a solução de clorexidina a 0,12% seguida do uso de solução de xilitol a 0,5% inibiu significativamente a formação de *S. mutans* no biofilme *in vitro*.

Modesto & Drake (2006) estudaram o efeito de várias exposições de clorexidina combinado com o gluconato de cobre ou gluconato de zinco, seguido de exposição pelo xilitol, na capacidade do *S. mutans* se aderir e formar biofilme dentário. As combinações de clorexidina seguidas de xilitol exibiram uma inibição significativa sobre *S. mutans*.

Entretanto, a associação destas substâncias não tem recebido a atenção que merece. Além do número reduzido de estudos, nenhum foi desenvolvido em crianças pré-escolares, uma importante população alvo em estudos de prevenção.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Com o objetivo de avaliar a eficácia antimicrobiana contra o *S. mutans* das soluções de xilitol, clorexidina e associação de ambas, foi realizado um estudo experimental *in vitro* executado em três etapas distintas e complementares:

Primeira Etapa: foi realizado estudo qualitativo buscando-se identificar o crescimento do *S. mutans* através do método de exposição direta a xilitol 0,5%, xilitol 35%, clorexidina 0,12%, clorexidina 0,12% seguida de exposição a xilitol 0,5% , tendo como referência a escala de McFarland.

Segunda Etapa: avaliação quantitativa da inibição de crescimento do *S. mutans*, xilitol 35%, clorexidina 0,12%, clorexidina 0,12% associada ao xilitol 35%, clorexidina 2% e solução salina 0,9% através da técnica de difusão em Agar, com e sem disco.

Terceira etapa: contagem de unidades formadoras de colônia após a técnica de Exposição Direta de cones de papel.

3.1 PRIMEIRA ETAPA – CRESCIMENTO BACTERIANO

1. Bactéria Utilizada:

- *S. mutans* (ATCC 25175).

2. Soluções Testadas:

- Grupo 1: xilitol 0,5%
- Grupo 2: xilitol 35%
- Grupo 3: clorexidina 0,12%
- Grupo 4: clorexidina 0,12% seguida de exposição a xilitol 0,5%
- Grupo Controle Positivo: 0,1 ml de *S. mutans* em 5 ml de caldo neutralizante (Difco).
- Grupo Controle Negativo: 5 ml de caldo Neutralizante (Difco) de coloração lilás.

3. Preparo das Suspensões Microbianas:

Em um tubo de ensaio contendo meio Brain Heart Infusion (BHI), esterilizado por autoclavagem a 121°C, durante 20 minutos, foi semeado *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) da cepa ATCC 25175 que, em seguida, foi incubado por período de 24 horas, em temperatura de 37°C e condições anaeróbias. Através de alça de inoculação, foi retirada amostra do resultado desta incubação e transferido, em condições assépticas, para tubo de ensaio contendo 5 ml de solução salina 0,9% estéril (Figuras 1 e 2). Repetiu-se a transferência até que o conteúdo desse tubo de ensaio atingisse turvação semelhante a da escala 1 de McFarland, o que indica a presença de 3×10^8 células por mililitro de solução (Figura 3).

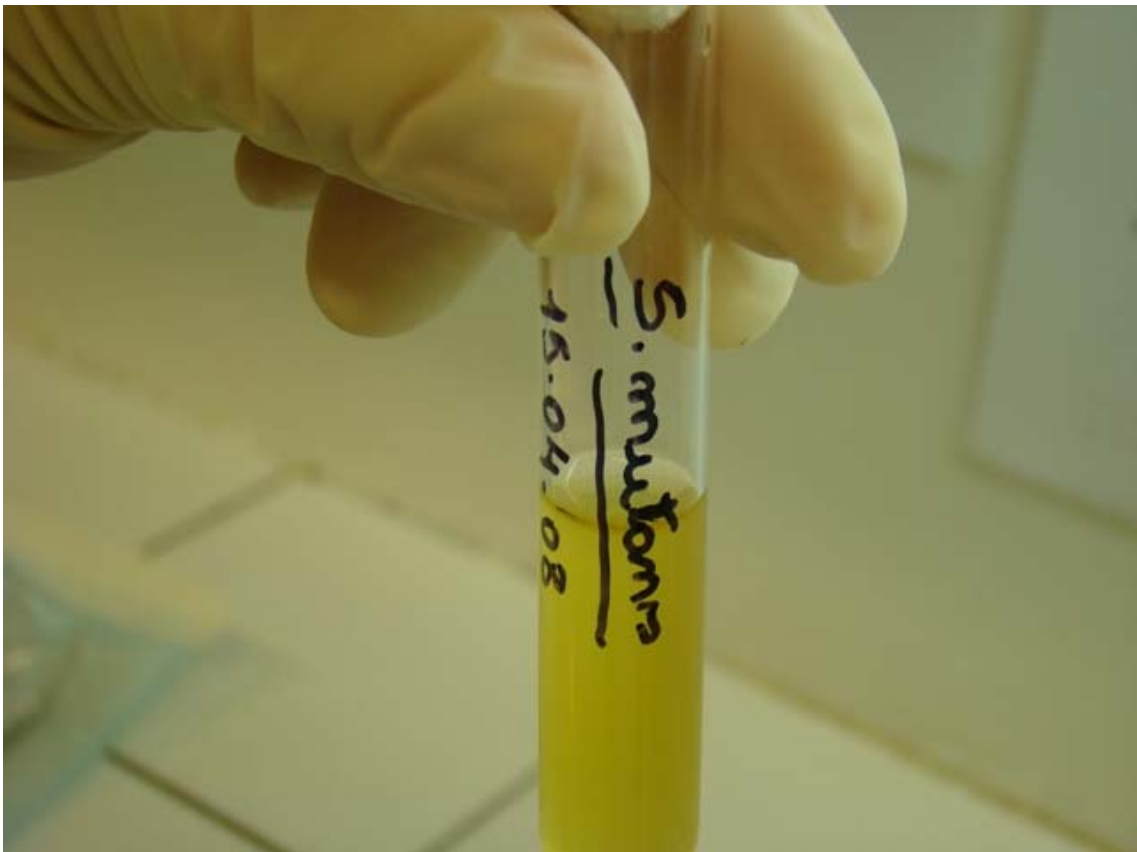


Figura 1: *S. mutans* em meio BHI. Natal-RN, 2008.



Figura 2: Processo de padronização. Natal-RN, 2008.



Figura 3: Padronização pela Escala de Mcfarland. Natal-RN, 2008.

4. Determinação da Ação Antimicrobiana pelo Método de Exposição Direta:

Trinta e seis cones de papel absorvente, segunda série (Dentsply), número 80, foram esterilizados por autoclavação a 121°C, durante 20 minutos e divididos em quatro grupos (1, 2, 3 e 4) de 9 cones cada. Após distribuir a solução microbiana experimental em uma placa de Petri, cada grupo foi imerso durante 05 minutos, finalizando o processo de contaminação (Figura 4). Concluída essa etapa, cada grupo de cones foi transferido para placa de Petri contendo uma das soluções estudadas (Figura 5), sendo: grupo 1 - xilitol 0,5%, grupo 2 - xilitol 35%, grupo 3 - clorexidina 0,12% e grupo 4 - clorexidina 0,12% seguida de uma exposição ao xilitol 0,5%.



Figura 4: Contaminação dos cones de papel com *S. mutans*. Natal-RN, 2008.

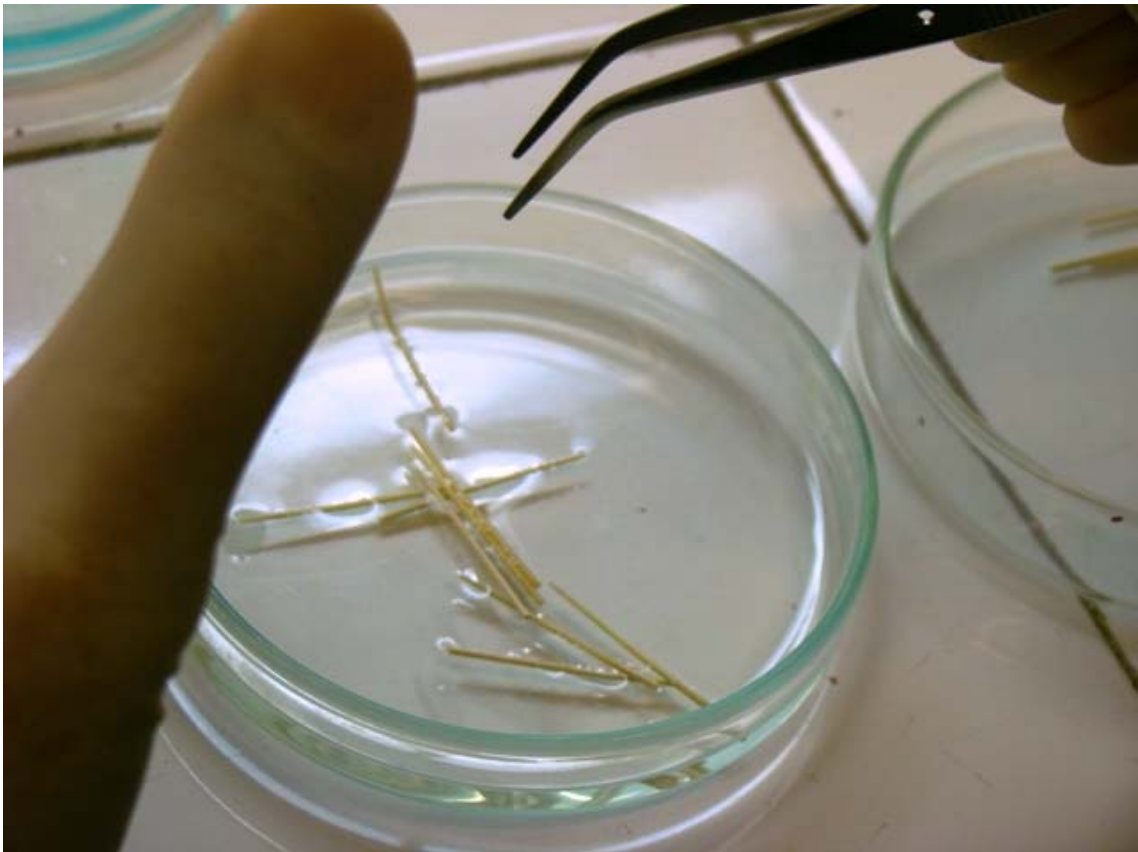


Figura 5: Exposição dos cones contaminados com *S. mutans* a solução antimicrobiana. Natal-RN, 2008.

Para cada substância, o respectivo grupo de cones foi dividido em quatro subgrupos (1.1/1.2/1.3, 2.1/2.2/2.3, 3.1/3.2/3.3, 4.1/4.2/4.3) com três cones cada um. Os subgrupos indicados pelos números 1, 2 e 3 permaneceram em contato com a solução testada por 45, 60 e 120 segundos, respectivamente, sendo que, ao final deste tempo, os cones dos subgrupos 1, 2 e 3 foram individualmente transferidos para tubos de ensaio identificados contendo 5 ml de caldo neutralizante Difco. Os cones do grupo 4, após serem retirados da imersão em clorexidina 0,12%, foram imersos em xilitol 0,5% permanecendo em exposição pelo mesmo tempo que ficaram a clorexidina: 4.1 – 45 segundos, 4.2 – 60 segundos e 4.3 - 120 segundos, sendo então transferidos individualmente para tubos de ensaio identificados contendo 5 ml de caldo neutralizante (Figura 6).



Figura 6: Cone de papel em tubo de ensaio contendo caldo neutralizante. Natal-RN, 2008.

Para obtenção do grupo-controle positivo, foi inoculado 0,1 ml de solução bacteriológica em 2 tubos de ensaio estéreis contendo 5 ml de caldo neutralizante. Já o grupo-controle negativo consistiu em 2 tubos de ensaio com 5 ml de caldo neutralizante. Em ambos os grupos, o material foi levado em jarra hermeticamente lacrada, com ambiente anaeróbio em seu interior obtido através do consumo do oxigênio ali contido pela chama de uma vela. Após o consumo do oxigênio, a jarra com os tubos de ensaio foi levada para uma estufa bacteriológica a 37°C, onde permaneceu por 48 horas (Figura 7).



Figura 7: Tubos de ensaio em ambiente anaeróbio. Natal-RN, 2008.

Após o período em que permaneceu na estufa bacteriológica, o material contido em cada um dos tubos de ensaio de todos os grupos foi analisado macroscopicamente por três avaliadores calibrados, quanto à presença ou ausência de turvação e segundo os parâmetros da escala visual de McFarland (Figura 8). Esse procedimento foi repetido por cada avaliador quatro vezes.

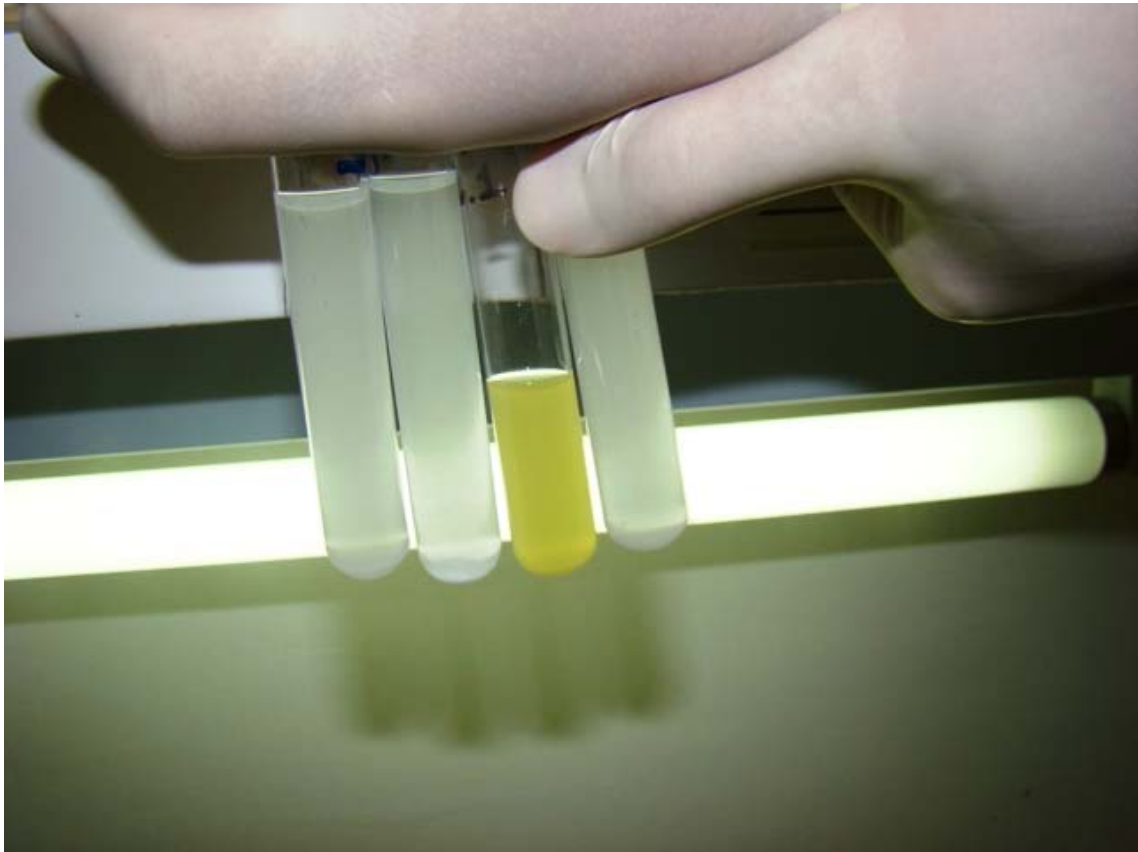


Figura 8: Leitura final dos tubos de ensaio. Natal-RN, 2008.

Para a certificação de que não houve contaminação das amostras por outras bactérias, foi realizada observação microscópica através de esfregaços em lâminas de vidro, coradas pelo método de Gram para confirmação microscópica da presença de cocos Gram-positivos (Figuras 9 e 10). A técnica de coloração de Gram empregada permitiu observar a forma e o tipo de agrupamento bacteriano, além de diferenciar as células em dois grupos frente aos corantes básicos. O mecanismo é baseado na constituição química da parede celular. As bactérias Gram positivas, por apresentarem uma camada espessa de peptidoglicano, retêm o cristal violeta, fixado pelo lugol (cor violeta), enquanto que as Gram negativas são coradas pela fucsina, uma vez que apresentam parede celular constituída por uma delgada camada peptidoglicano e lipopolisacarídeo, corando-se de vermelho. O que se observou foi a confirmação da presença de *S. mutans*, bactéria Gram positiva em todas as amostras coletadas no estudo.

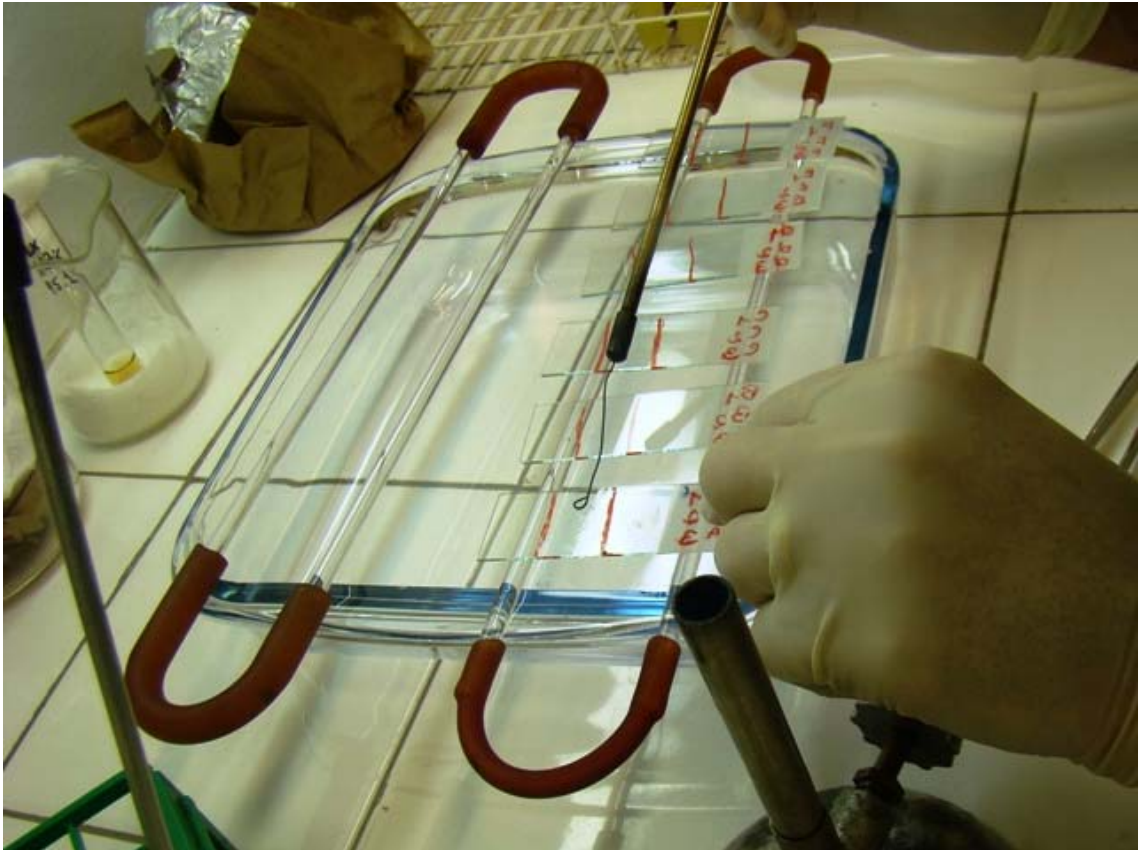


Figura 9: Teste de coloração de gram. Natal-RN, 2008.

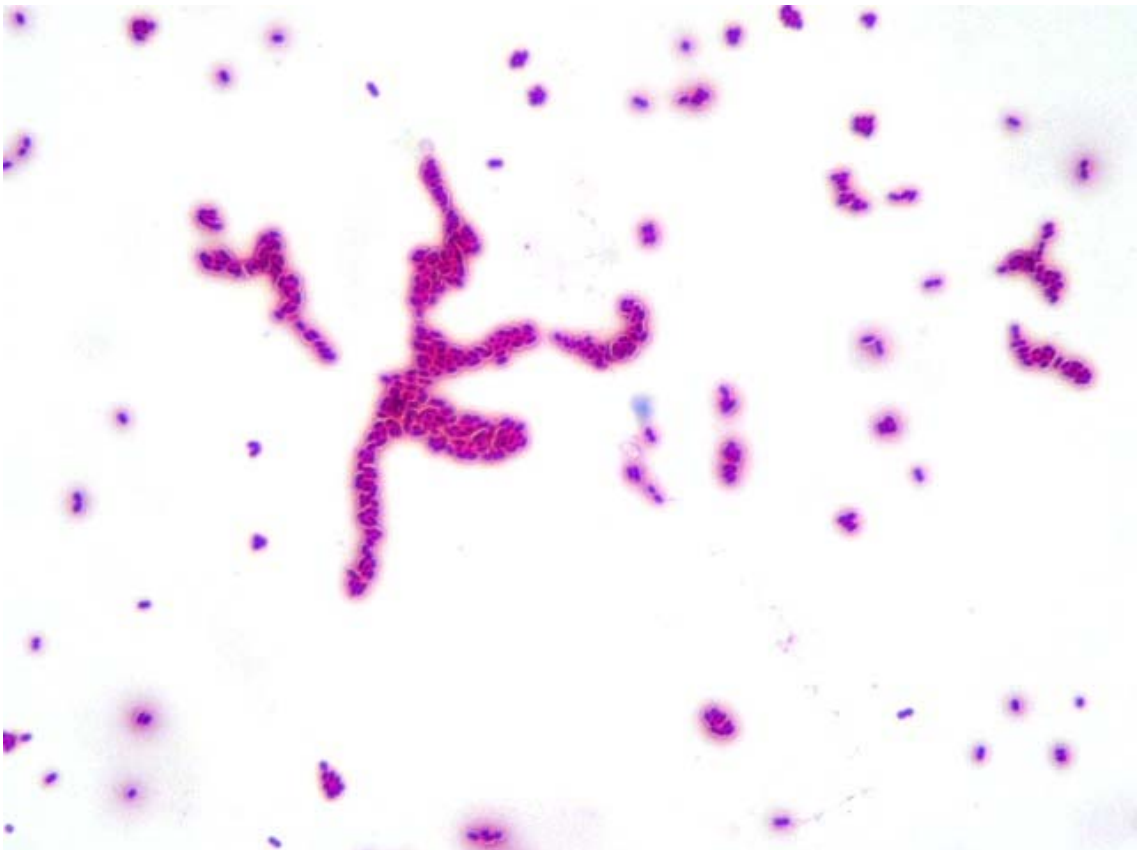


Figura 10: Presença de cocos Gram positivos. Natal-RN, 2008.

Em todas as etapas experimentais, sem exceção, a cadeia asséptica foi mantida, e os testes foram efetuados em triplicata.

3.2 SEGUNDA ETAPA – AÇÃO ANTIMICROBIANA DE XILITOL, CLOREXIDINA E ASSOCIAÇÃO SOBRE *Streptococcus mutans*

1. Bactéria Utilizada:

- *S. mutans* cepa ATCC 25175

2. Soluções Analisadas:

- Grupo I: clorexidina 0,12%
- Grupo II: xilitol 35%
- Grupo III: clorexidina 0,12% associada a xilitol 35%
- Grupo Controle Positivo: clorexidina 2%
- Grupo Controle Negativo: solução salina 0,9%

3. Meio de Cultura:

- Ágar Mueller-Hinton

4. Preparo das Suspensões Microbianas:

Em um tubo de ensaio contendo meio Brain Heart Infusion (BHI), esterilizado por autoclavagem a 121°C, durante 20 minutos, foi semeado *S. mutans* da cepa ATCC 25175 que, em seguida, foi incubado por período de 24 horas, em temperatura de 37°C e condições anaeróbias. Através de alça de inoculação, foi retirada amostra do resultado desta incubação e transferido, em condições assépticas, para tubo de ensaio contendo 5 ml de solução salina 0,9% estéril. Repetiu-se a transferência até que o conteúdo desse tubo de ensaio atingisse turvação semelhante a da escala 1 de McFarland.

5. Processo de Inoculação do Meio:

Em 12 placas de Petri de 10 cm de diâmetro, foi distribuído homogeneamente ágar Mueller-Hinton até atingir uma camada de 4 mm de espessura. Uma alíquota de 0,1 ml

da suspensão microbiana elaborada inicialmente foi transferida para cada placa de Petri com o meio de cultura e, de imediato, semeada uniformemente com o auxílio de swab oral estéril, a fim de se obter crescimento bacteriano uniformemente distribuído (Figura 11).



Figura 11: Semeadura do *S. mutans* em ágar Mueller-Hinton. Natal-RN, 2008.

6. Preparo e Colocação de Antimicrobianos:

Cada um de cinco discos estéreis de papel absorvente foi imerso em 5 ml de solução antimicrobiana: disco 1 - clorexidina 0,12%, disco 2 - xilitol 35%, disco 3 - clorexidina 0,12% associada a xilitol 35%, disco 4 - clorexidina 2%, disco 5 - solução salina 0,9%. Após a absorção da solução testada, cada disco foi fixado na ponta de um alfinete estéril e levado através deste para uma placa de Petri semeada com *S. mutans* (Figura 12). Cada disco permaneceu em contato com a superfície da placa, de forma equidistante, por 120 segundos, sendo posteriormente removido através da extremidade livre do alfinete. O disco e alfinete foram então descartados. A placa foi coberta com tampa de vidro e nela foi realizada

identificação através de marcador permanente do local da impressão de cada disco. Este processo foi repetido várias vezes até que se totalizassem seis placas de Petri.

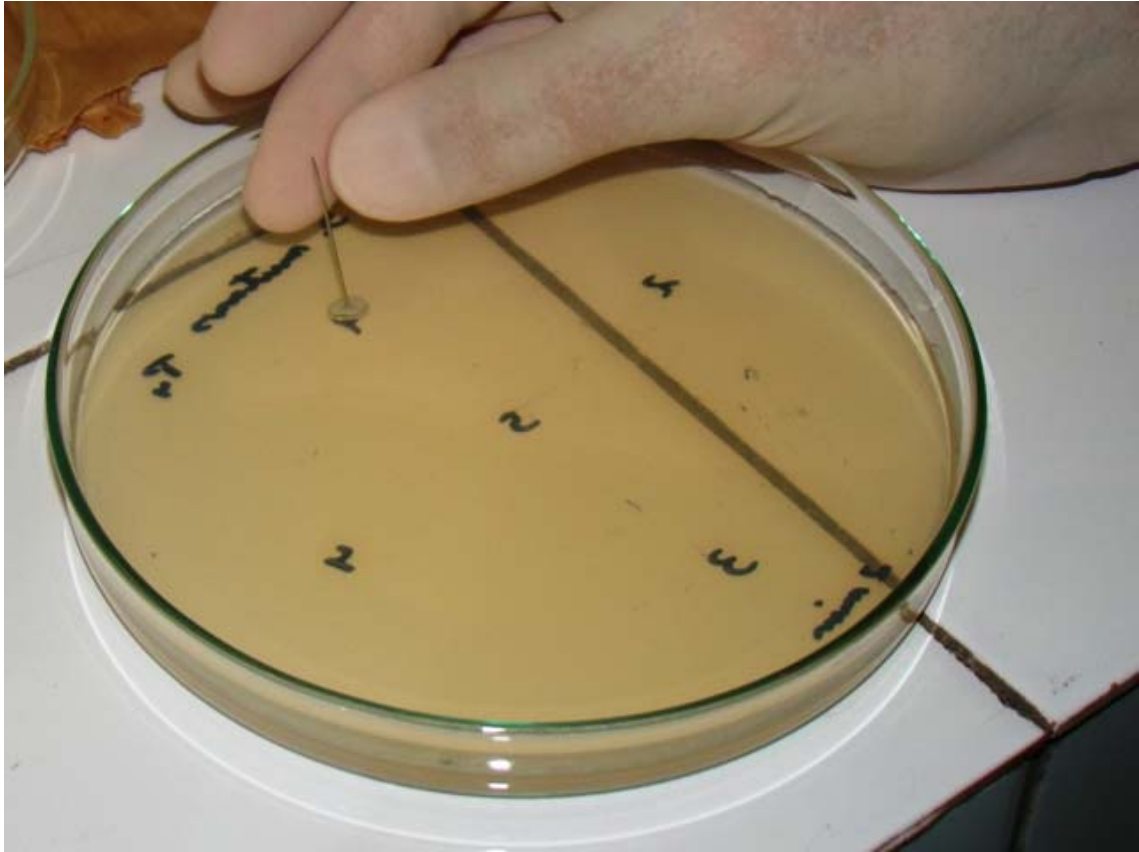


Figura 12: Colocação de disco circular presos a alfinete estéril. Natal-RN, 2008.

Num segundo grupo, cinco discos estéreis de papel absorvente foram imersos em 5 ml de determinada solução antimicrobiana: disco 1 - clorexidina 0,12%, disco 2 - xilitol 35%, disco 3 - clorexidina 0,12% associada a xilitol 35%, disco 4 - clorexidina 2%, disco 5 - solução salina 0,9%. Após a absorção da solução testada, os discos foram conduzidos com o auxílio de pinça clínica estéril e distribuídos equidistantemente em placa Petri contendo meio ágar Muller-Hinton e semeada com *S. mutans*. Os discos foram levemente pressionados e permaneceram em contato com a superfície do meio ágar. A placa foi coberta com tampa de vidro e nela foi realizada identificação através de marcador permanente do local de cada disco. Este processo foi repetido várias vezes até que se totalizassem seis placas de Petri (Figura 13).

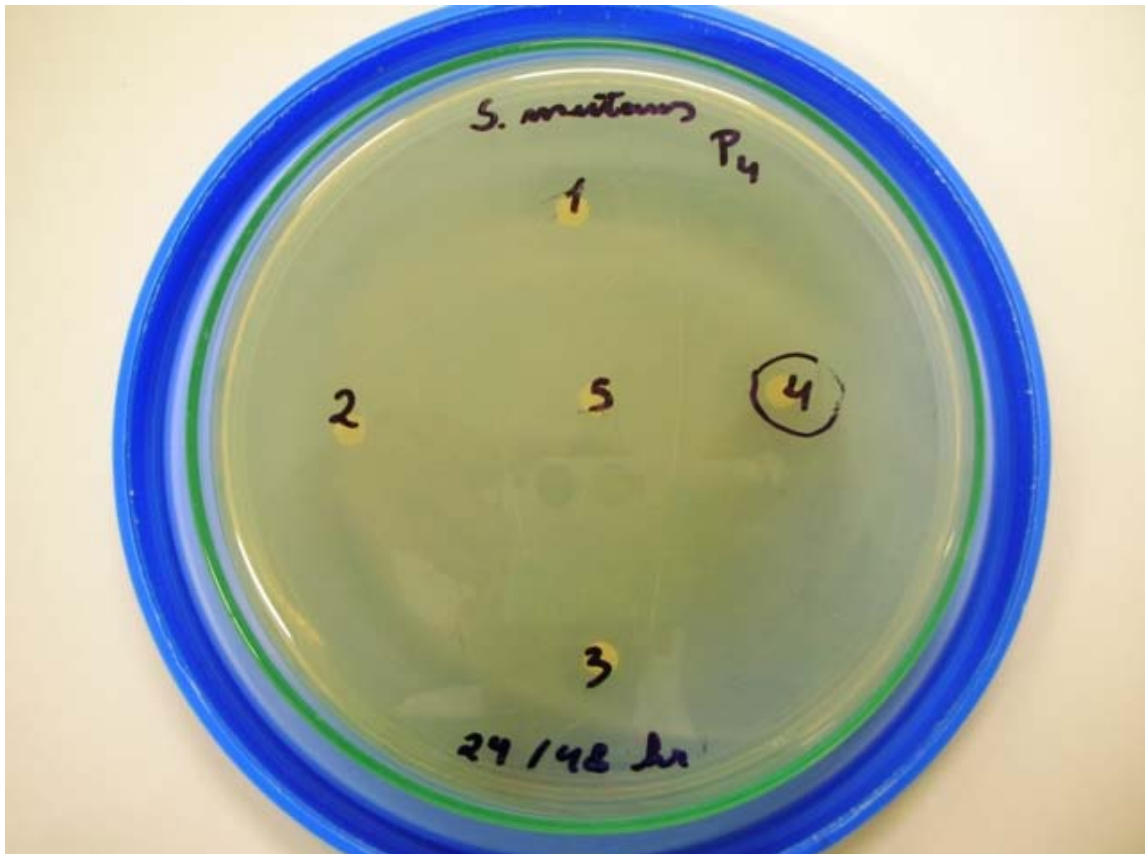


Figura 13: Colocação dos discos de papel na placa de petri. Natal-RN, 2008.

7. Pré-Incubação e Incubação:

As 12 placas de Petri preparadas foram levadas para estufa bacteriológica onde permaneceram à temperatura de 37 °C por 24 horas. Ao final deste intervalo de tempo, todas as placas foram retiradas da estufa. Foi aferido com um paquímetro digital (Starrett 799-6/150) o diâmetro das zonas de inibição do crescimento microbiano que se formou ao redor dos discos que permaneceram nas placas, ou ao redor dos locais onde os discos permaneceram em contato por 2 minutos. As placas foram novamente conduzidas à estufa bacteriológica onde permaneceram sob as mesmas condições por mais 24 horas. Após o segundo período de incubação, foi novamente realizado registro dos halos de inibição com paquímetro digital. Para conferir a fidedignidade aos resultados, cada medida foi aferida duas vezes pelo mesmo avaliador em momentos distintos.

3.3 TERCEIRA ETAPA - CONTAGEM DAS UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIA

Foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônia pelo método de Exposição Direta baseado nas metodologias de Siqueira *et al.*, (1998) e Estrela (2001).

1. Bactéria Utilizada:

- *S. mutans* (ATCC 25175).

2. Soluções Analisadas:

- Grupo 1: clorexidina 0,12%
- Grupo 2: xilitol 35%
- Grupo 3: clorexidina 0,12% associada a xilitol 35%
- Grupo 4 – grupo-controle positivo: clorexidina 2%
- Grupo 5 – grupo-controle negativo: solução salina 0,9%

3. Preparo das Suspensões Microbianas:

Em um tubo de ensaio contendo meio Brain Heart Infusion (BHI), esterilizado por autoclavagem a 121°C, durante 20 minutos, foi semeado *S. mutans* da cepa ATCC 25175 que, em seguida, foi incubado por período de 24 horas, em temperatura de 37°C e condições anaeróbias. Através de alça de inoculação, foi retirada amostra do resultado desta incubação e transferido, em condições assépticas, para 5 tubos de ensaio contendo 5 ml de solução salina 0,9% estéril. Repetiu-se a transferência até que o conteúdo desses tubos de ensaio atingisse turvação semelhante a da escala 1 de McFarland.

4. Determinação da Ação Antimicrobiana pelo Método de Exposição Direta Modificado:

Cinco cones de papel absorvente segunda série (Dentsply), número 80, foram esterilizados por autoclavagem a 121°C por 20 minutos. Cada cone foi imerso durante 5 minutos em uma das cinco suspensões microbianas experimentais elaboradas. Em seguida, cada cone foi imerso em tubo de ensaio estéril contendo 5ml das soluções antimicrobianas avaliadas, onde permaneceram por 120 segundos: cone 1 – clorexidina 0,12%, cone 2 – xilitol

35%, cone 3 – clorexidina 0,12% associada a xilitol 35%, cone 4 – clorexidina 2% e cone 5 – solução salina 0,9%.

Após o contato com as soluções antimicrobianas, cada cone foi transferido com pinça clínica número 01 estéril para tubo de ensaio previamente identificado contendo 5 ml de solução salina 0,9%, onde permaneceu por 10 minutos a fim de se remover as células não aderidas à sua superfície (Figura 14). Em seguida, cada cone foi transferido com auxílio de uma pinça estéril para um tubo de ensaio identificado contendo solução salina 0,9% estéril, sendo, então, submetido a agitador de tubos (Vórtex) por 20 segundos (Figura 15). Este processo foi realizado três vezes resultando num total de 15 tubos de ensaio vortexados – três de cada solução-teste. Alíquotas de 50 microlitros do conteúdo de cada um desses tubos de ensaio foram inoculadas em 5 placas de Petri com ágar BHI e distribuídas de forma homogênea com auxílio de alça de Digralsky (Figura 16). Ao total, obtiveram-se 75 placas de Petri devidamente identificadas que foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas.



Figura 14: Transferência do cone para solução salina. Natal-RN, 2.008.



Figura 15: Utilização do agitador de tubos. Natal-RN, 2.008.



Figura 16: Distribuição com auxílio de alça de Digralsky. Natal-RN, 2.008.

Cada placa de Petri foi submetida a contador eletrônico de partículas do tipo Coulter para determinar número de unidades formadoras de colônias. Os resultados foram registrados e catalogados em banco de dados (figura 17).

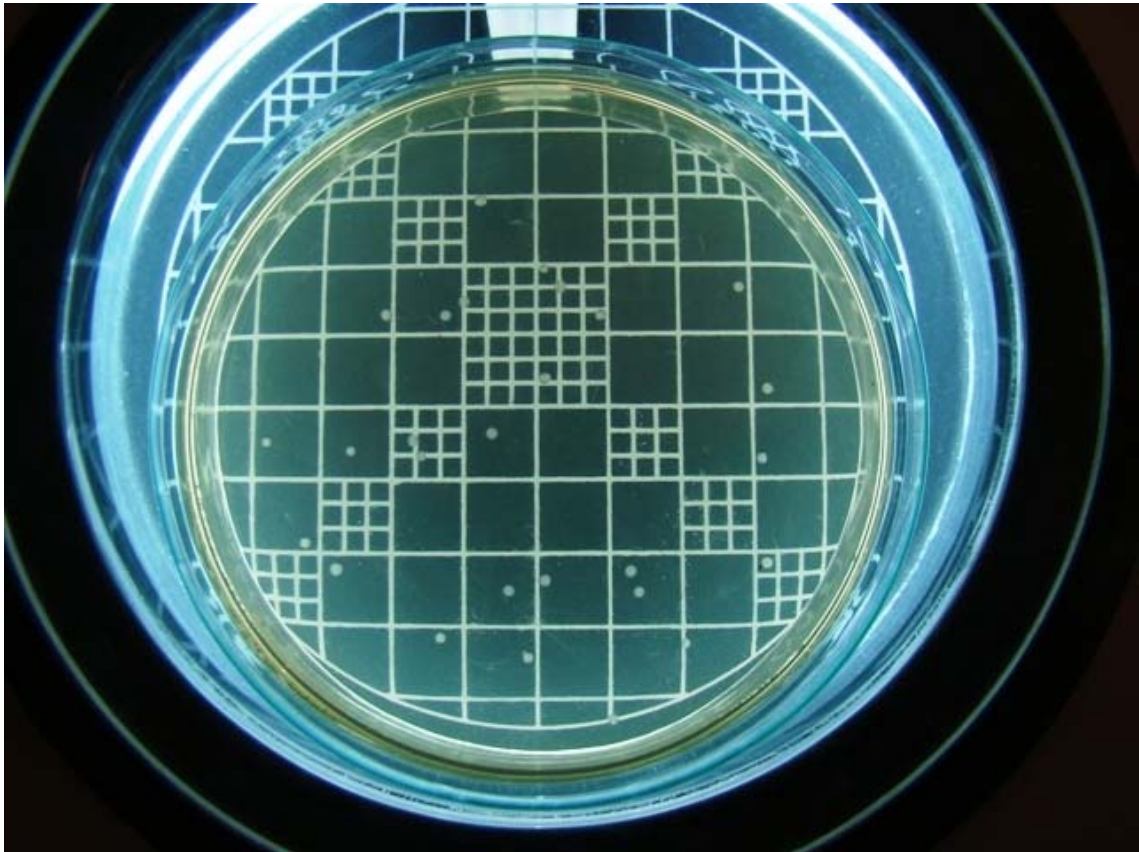


Figura 17: Contagem das unidades formadoras de colônias. Natal-RN, 2.008.

3.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados obtidos foram apresentados através de gráficos e tabelas. Em um primeiro momento da pesquisa foi feita uma avaliação qualitativa expressa em tabela. Na segunda parte da pesquisa foi realizado o teste estatístico ANOVA dois critérios e o Teste de Tuckey nível de significância 5%. Na terceira etapa da pesquisa foi realizado o teste de Kruskal Wallis seguido pelo Teste de Miller.

4 RESULTADOS

A tabela 1 descreve os resultados do crescimento do *S. mutans* avaliada através do teste turbidimétrico segundo a Escala visual de Mcfarland às soluções testadas, pela exposição direta, nos períodos de 45,60 e 120 segundos.

O grupo-controle positivo (0,1ml de *S. mutans* em 5ml de caldo neutralizante) atingiu o valor 10 da escala visual de Mcfarland o que representa o maior crescimento bacteriano. Já o grupo-controle negativo (5 ml de caldo neutralizante) não apresentou turvação, o valor zero, o que, pela análise visual de Mcfarland, indica ausência de crescimento bacteriano.

Foi observado presença de crescimento variando de 8 a 10 segundo a Escala de Mcfarland em todas as substâncias testadas. Apesar disso, quando comparados ao grupo-controle positivo (0,1ml de *S. mutans* em 5 ml de caldo neutralizante), demonstrou-se que a turvação dos grupos testados foi um pouco menor do que o grupo controle positivo. O crescimento bacteriano teve um grau de inibição expressivo quando avaliado por um método qualitativo em meio líquido.

Tabela I: Crescimento do *S. mutans*, segundo a Escala visual de Mcfarland, comparando-se agentes antimicrobianos e tempo de exposição. Natal, 2008.

SOLUÇÃO	TEMPO DE EXPOSIÇÃO (EM SEGUNDOS)	ESCALA DE MCFARLAND		
		Tubo 1	Tubo 2	Tubo3
Clorexidina 0,12%	45	10	9	8
	60	9	8	10
	120	10	9	9
Xilitol 35%	45	10	10	9
	60	10	10	9
	120	10	9	10
Xilitol 0,5%	45	8	8	9
	60	10	10	10
	120	10	9	9
Clorexidina 0,12% seguido de xilitol 0,5%	45	8	8	8
	60	8	10	10
	120	9	10	10
Grupo-controle positivo	-	10	10	-
Grupo-controle negativo	-	0	0	-

As médias dos diâmetros, em milímetros, dos halos de inibição ao crescimento do *S. mutans*, quando discos de papel saturados com os agentes antimicrobianos em teste permaneceram em contato com o meio de cultura durante todo o tempo de incubação, de 24 e 48 horas, são demonstrados na tabela II e no gráfico I. Estes dados foram submetidos à análise de variância avaliando o tempo e o halo de inibição formado após exposição às substâncias testadas, houve diferença estatística significativa entre os grupos ($p=0,000$), mas não entre os tempos ($p=0,55$). Considerando-se um nível de significância de 5%.

Para permitir a comparação entre os halos de inibição dos grupos entre si, foi aplicado o teste de Tukey que mostrou haver diferença estatisticamente significativa entre todos os grupos comparados dois a dois, exceto entre: clorexidina 0,12% e associação de clorexidina 0,12% ao xilitol 35%; clorexidina 0,12% e clorexidina 2%; e xilitol 35% e solução salina 0,9%. A única diferença estatisticamente significativa entre dois grupos onde nenhum dos dois teve média zero foi entre a associação de clorexidina 0,12% com xilitol 35% e clorexidina 2%. Ou seja, os grupos clorexidina 0,12%, associação de clorexidina 0,12% com xilitol 35% e clorexidina 2% são superiores ao xilitol 35% e a solução salina 0,9%. A clorexidina 2% é superior a associação de clorexidina 0,12% com xilitol 35% e a clorexidina 0,12% não tem diferença em relação a associação de clorexidina 0,12% com xilitol 35%.

Tabela II: Circunferência média dos halos de inibição do crescimento do *S. mutans* frente a diversas soluções antimicrobianas em disco de papel, após 24 horas e 48 horas de incubação. Natal, 2008.

SUBSTÂNCIA	TEMPO	N	HALO	SIGNIFICÂNCIA
Clorexidina 0,12%	24h	6	9,95	AC
	48h	6	12,32	AC
Xilitol 35%	24h	6	0,00	B
	48h	6	0,00	B
Clorexidina 0,12% associada a xilitol 35%	24h	6	8,56	A
	48h	6	8,96	A
Clorexidina 2%	24h	6	13,60	C
	48h	6	14,00	C
Solução salina 0,9%	24h	6	0,00	B
	48h	6	0,00	B

Letras diferentes apontam diferença estatisticamente significativa segundo o teste Tuckey a 5%. “n” representa o número de placas estudadas para cada substância. Circunferências dos halos de inibição em milímetros

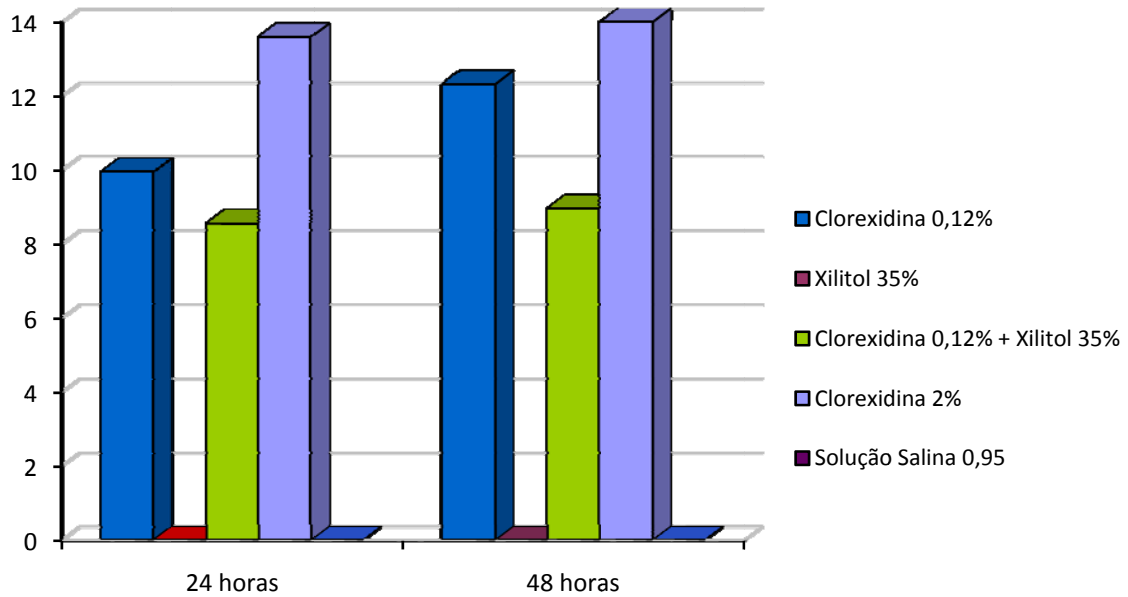


Gráfico I: Registro das médias, em milímetros, dos halos de inibição do crescimento do *S. mutans*, frente a diversas soluções antimicrobianas em disco de papel, após 24 horas e 48 horas de incubação. Natal, 2008.

As médias dos diâmetros, em milímetros, dos halos de inibição ao crescimento do *S. mutans*, quando discos de papel saturados com os agentes antimicrobianos em teste permaneceram em contato com o meio de cultura apenas por dois minutos antes do início dos períodos de incubação, de 24 e 48 horas, são demonstrados na tabela III e no gráfico II. Estes dados foram submetidos à análise de variância avaliando o tempo e o halo de inibição formado após exposição às substâncias testadas Houve diferença estatística significativa entre os grupos ($p=0,000$), mas não entre os tempos ($p=0,52$). Considerando-se um nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$).

Tabela III: Halos de inibição do crescimento do *S. mutans*, após dois minutos de exposição às soluções antimicrobianas, 24 e 48 horas de incubação. Natal, 2008.

SUBSTÂNCIA	TEMPO	N	HALO (EM MILÍMETRO)	SIGNIFICÂNCIA
Clorexidina 0,12%	24h	6	6,39	A
	48h	6	6,95	A
Xilitol 35%	24h	6	0,00	B
	48h	6	0,00	B
Clorexidina 0,12% associada a xilitol 35%	24h	6	4,34	A
	48h	6	4,44	A
Clorexidina 2%	24h	6	13,61	C
	48h	6	14,96	C
Solução salina 0,9%	24h	6	0,00	B
	48h	6	0,00	B

Letras diferentes apontam diferença estatisticamente significativa segundo o teste Tuckey a 5%. “n” representa o número de placas estudadas para cada substância. Circunferências dos halos de inibição em milímetros

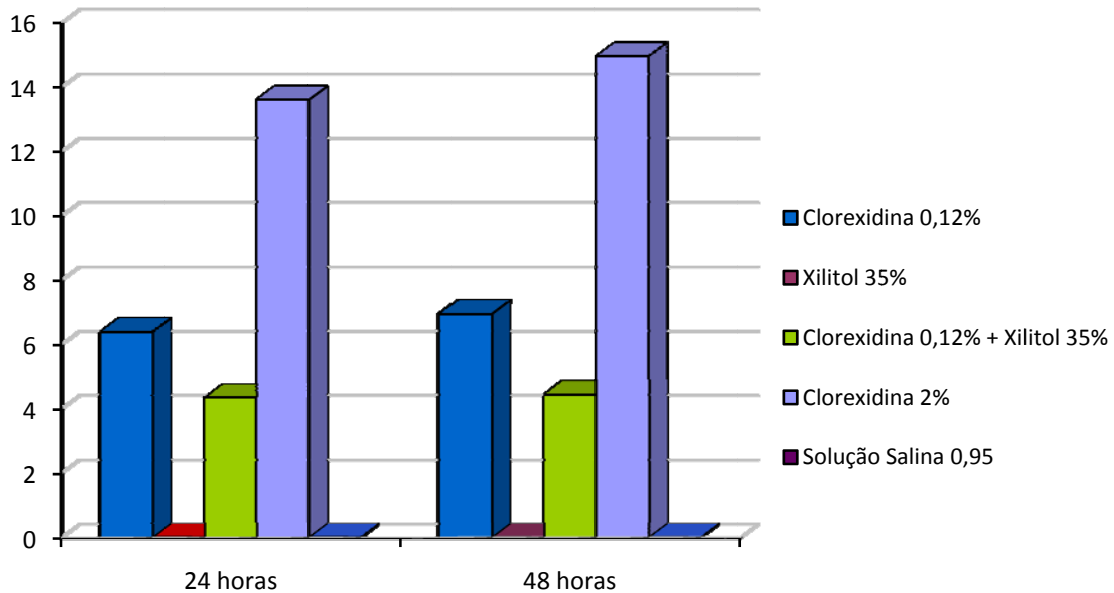


Gráfico II: Halos de inibição (em milímetro) do crescimento do *S. mutans*, após dois minutos de exposição às soluções antimicrobianas, 24 e 48 horas de incubação. Natal, 2008.

Para permitir a comparação entre os halos de inibição dos grupos entre si, foi aplicado o teste de Tukey que mostrou haver diferença estatisticamente significativa entre todos os grupos comparados dois a dois, exceto entre: clorexidina 0,12% e associação de clorexidina 0,12% ao xilitol 35%; e xilitol 35% e solução salina 0,9%. As únicas diferenças estatisticamente significativas entre dois grupos, onde nenhum dos dois teve média zero, foi entre a associação de clorexidina 0,12% com xilitol 35% e clorexidina 2%; e entre clorexidina 0,12% e clorexidina 2%. Ou seja, os grupos clorexidina 0,12%, clorexidina 0,12% associada ao xilitol 35%, e clorexidina 2% são superiores ao xilitol 35% e à solução salina, e a clorexidina 2% é ainda superior em inibição ao *S. mutans* que clorexidina 0,12% isoladamente ou em associação com xilitol 35%. A clorexidina 2% teve ação inibitória em 24 horas maior que quaisquer outros grupos, mesmo após o período de incubação de 48 horas.

A quantidade de unidades formadoras de colônias de *S. mutans* resultantes da incubação por 24 horas de cones de papel contaminados com a bactéria e expostas às substâncias antimicrobianas está representada na tabela IV e no gráfico III.

Tabela IV: Número de unidades formadoras de colônias de *S. mutans* exposto à Clorexidina 0,12%, Xilitol 35%, Clorexidina 0,12% + Xilitol 35%, Clorexidina 2% e Solução salina 0,9%. Natal, 2008.

PLACA	CLOREXIDINA 0,12%	XILITOL 35%	CLOREXIDINA 0,12% ASSOCIADA A XILITOL 35%	CLOREXIDINA 2%	SOLUÇÃO SALINA 0,9%
1	96	243	112	29	Incontáveis
2	71	230	79	28	Incontáveis
3	88	238	103	26	Incontáveis
4	92	242	119	26	Incontáveis
5	113	240	146	28	Incontáveis
6	117	252	29	18	Incontáveis
7	148	246	29	11	Incontáveis
8	88	Incontáveis	42	17	Incontáveis
9	120	Incontáveis	46	15	Incontáveis
10	95	Incontáveis	30	17	Incontáveis
11	130	230	34	40	Incontáveis
12	204	234	32	35	Incontáveis
13	134	238	24	25	Incontáveis
14	146	241	28	41	Incontáveis
15	178	246	46	30	Incontáveis

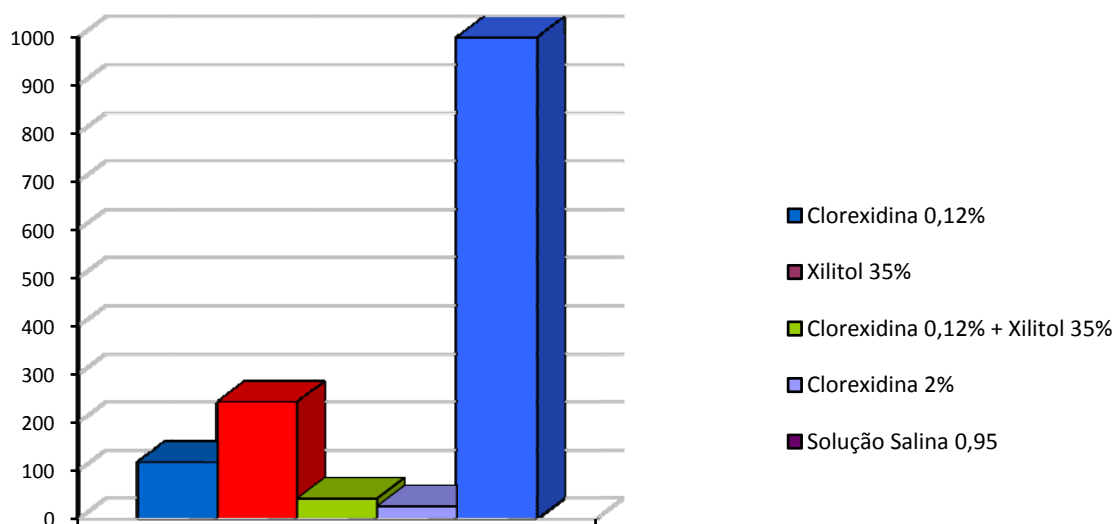


Gráfico III: Unidades formadoras de colônias de *S. mutans* exposto às substâncias antimicrobianas. Natal, 2008.

A aplicação de testes estatísticos paramétricos tornou-se inviável, pois a quantidade de unidades formadoras de colônias (UFCs) do grupo solução salina foi registrada como incontável devido ao enorme número de colônias desenvolvidas. Lançou-se mão do teste de Kruskal-Wallis, que faz uma avaliação de dados não paramétricos atribuindo postos a cada valor testado. Como a quantidade de colônias obtidas no grupo solução salina foi incontável, atribuiu-se o valor de 999, pois assim este valor seria maior que o de qualquer outro grupo (tabela V).

Tabela V: Quantidades de unidades formadoras de colônias de *S. mutans* exposto à Clorexidina 0,12%, Xilitol 35%, Clorexidina 0,12% + Xilitol 35%, Clorexidina 2% e Solução salina 0,9%. Natal, 2008.

GRUPO	N	MEDIANA	SOMA DOS POSTOS	POSTO MÉDIO	SIGNIFICÂNCIA **
Clorexidina 0,12%	15	117,00	537,50	35,30	bc
Xilitol 35%	15	242,00	817,50	54,50	ab
Clorexidina 0,12% + xilitol 35%	15	42,00	343,00	22,86	cd
Clorexidina 2%	15	26,00	154,50	10,30	d
Solução salina 0,9%	15	999,00*	997,50	66,50	a

*Foi atribuído para efeito de cálculo estatístico o valor de 999 UFCs às amostras com UFCs “incontáveis”. Diferença estatisticamente significativa (P=0,0000) (Teste Kruskal-Wallis).

**Letras diferentes apontam diferença estatisticamente significativa segundo o teste Miller a 5%.

Aos valores resultantes dos postos atribuídos no teste de Kruskal-Wallis foi aplicado o teste de Miller para comparações individuais com nível de significância de 5% (p=0,05) (Tabela V). Revelou-se então, que a clorexidina 2% apresentou diferença estatisticamente significativa em relação a todos os grupos exceto em relação ao grupo da associação de clorexidina 0,12% com xilitol 35%. A associação de clorexidina 0,12% com xilitol 35% não apresentou diferença estatística para o grupo clorexidina 2% e para o grupo clorexidina 0,12%. O grupo da solução salina 0,9% apresentou diferença estatisticamente significativa em relação a todos os grupos, exceto em relação ao grupo de xilitol 35%. O grupo xilitol 35% não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação a clorexidina 0,12%, mas teve pior resultado que o grupo de clorexidina 2% e a associação de clorexidina 0,12% com xilitol 35%.

5 DISCUSSÃO

A clorexidina e o xilitol são importantes armas terapêuticas no combate à cárie dentária. O uso desses agentes isoladamente ou em associação com outras substâncias reduz os níveis de *Streptococcus mutans* na cavidade oral (HILDEBRANDT, BRANDON & SPARKS, 2000; BECKERS, 1988; SODERLING *et al*, 2001; SAHNI *et al*, 2002; DRAKE *et al*, 1993; KLEIN *et al*, 1999; EMILSON, 1994; TRAHAN, 1995; BRIAN & BURT, 2006; ALMEIDA & BASTOS, 2001; BOTELHO, 2000; LUOMA, 1972; JAANA, 2002; EMILSON, 1981; GONÇALVES *et al*, 2001; PERES & RIBEIRO, 2004; MAKINEN *et al*, 1996; MARSH *et al*, 1983; AMEACHI, SUSAN & WILLIAM, 1999; SODERLING *et al*, 2000; SIMONS *et al*, 1999). A fim de testar a ação desses antimicrobianos de forma isolada e quando ambos são administrados conjugados, a presente pesquisa, inicialmente, avaliou de maneira qualitativa a presença de crescimento do *S. mutans* em exposição às substâncias antimicrobianas supracitadas. Para tal, utilizou-se o teste de turvação segundo a escala de McFarland, onde se utilizou a escala de turvação baseada numa suspensão de sulfato de bário. A medida foi feita visualmente entre as turvações da escala de McFarland e a turvação da suspensão microbiana.

Nesta etapa da pesquisa, quando se comparou a ação dos antimicrobianos com o grupo-controle negativo (5ml de caldo neutralizante), em todos os grupos testados houve turvação do conteúdo do tubo de ensaio após o período de incubação, o que demonstra evidente proliferação do *S. mutans* frente às substâncias avaliadas. Apesar disso, quando comparados ao grupo-controle positivo (0,1ml de *S. mutans* em 5ml de caldo neutralizante), demonstrou-se que a turvação dos grupos testados deu-se em menor intensidade, atingindo escores inferiores na escala visual de McFarland, ou seja, a multiplicação bacteriana teve algum grau de inibição, evidenciando o efeito antimicrobiano destas soluções.

Em estudos prévios, Schaeken *et al* (1991), Emilson, Gisselsson & Birkhed (1999) afirmam que após a interrupção da terapia antimicrobiana, a cavidade oral pode ser recolonizada dependendo da frequência da terapia, veículo e concentração do agente antimicrobiano. Outro fator que pode influenciar em uma ação menos eficaz do agente antimicrobiano é a variabilidade na suscetibilidade do *S. mutans* às substâncias antimicrobianas. Essa variabilidade no nível de supressão e na rapidez do retorno de *S. mutans* rapidamente sugeriu a possibilidade da clorexidina e do xilitol não estarem agindo tão eficazmente contra o microrganismo. Isso corrobora com os resultados de outros estudos

(MALTZ, ZICKERT & KRASSE, 1981; SANDHAM *et al*, 1988). Porém, a teoria de recolonização não pode ser confirmada em um método experimental uma vez que não houve reprodução das condições do meio ambiente bucal e a pesquisa empregou rigidez na técnica asséptica. Quanto à possibilidade de variação na sensibilidade dos microrganismos às substâncias, a utilização de uma única cepa da bactéria em todos os grupos minimiza essa variabilidade.

Aumentar o tempo de exposição do microrganismo às substâncias avaliadas poderia ser uma alternativa para se conseguir maior ação das substâncias e, assim, possibilitar a comparação da capacidade inibitória de cada uma e da associação. Contudo, percebeu-se que não houve diferença entre os grupos ao se comparar os tempos de 45, 60 e 120 segundos.

No estudo de Modesto & Drake (2006), onde foi realizada exposição do *S. mutans* a uma concentração de xilitol de 0,5%, não houve efeito considerável na inibição do crescimento do *S. mutans*. Isto se faz considerar que, ao se utilizar uma concentração maior de xilitol, poder-se-ia demonstrar a capacidade antimicrobiana desta substância. Sahni *et al* (2002) testaram a ação do xilitol sobre o *S. mutans* em diferentes concentrações havendo comprovação de ação antimicrobiana em concentrações que variaram de 0,78% a 50%. Com a finalidade de promover o estudo da ação antibacteriana do xilitol e compará-lo às soluções de clorexidina, foi selecionada a solução em concentração de 35%, pois se tem respaldo de eficiência pelo trabalho de Sahni *et al* e existe solução disponível comercialmente (Spiffies®) para realização de prevenção de cárie dentária.

Assim sendo, na segunda etapa da pesquisa, descartou-se a utilização dos menores tempos, descartou-se o xilitol 0,5% e avaliou-se quantitativamente (através da medição do halo de inibição) a eficácia dos antimicrobianos na inibição do crescimento do *S. mutans* nos tempos de 2 minutos, 24 horas e 48 horas. Nesse segundo momento, não houve diferença estatística entre os tempos de 24 horas e 48 horas estudados na pesquisa ($p=0,55$) e o comportamento das substâncias testadas também foi semelhante quando o disco com o antimicrobiano permaneceu durante dois minutos em contato com o meio em relação aos grupos onde as soluções permaneceram expostas durante as 48 horas avaliadas.

No que diz respeito à formação de halo de inibição no grupo onde o disco permaneceu em contato durante as 48 horas com o microrganismo, nesse grupo houve diferença entre os grupos das substâncias testadas ($p= 0,000$). Em todos os grupos, o controle positivo, a clorexidina a 2%, apresentou o maior halo de inibição de crescimento sobre *S. mutans*, sendo esta diferença estatisticamente significativa em relação a xilitol 35% e associação clorexidina 0,12% e xilitol 35% ($p<0,05$), mas não a clorexidina 0,12%. O grupo

de clorexidina 0,12% não apresentou diferença estatisticamente significativa com relação a associação de clorexidina 0,12% e xilitol 35%. O grupo xilitol 35% apresentou halos de inibição estatisticamente menores do que todos os outros grupos ($p < 0,05$), exceto o grupo controle negativo (salina 0,9%). Nesse grupo apesar da clorexidina a 0,12% e da associação da clorexidina a 0,12% com o xilitol a 35% terem apresentado um resultado satisfatório em relação ao controle negativo (solução salina 0,9%) eles não apresentaram diferença estatística entre si e apresentaram um efeito antimicrobiano inferior ao controle positivo (clorexidina a 2%). O estudo de Botelho (2000) e Freitas *et al* (2003) corrobora com o mesmo resultado que obtivemos nesta pesquisa frente à associação dessas substâncias não terem nenhum efeito benéfico contra o *S. mutans*.

No que diz respeito à formação do halo de inibição quando o disco foi removido após dois minutos de exposição, nesse grupo foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos das substâncias testadas ($p=0,52$). Em todos os grupos, o controle positivo, a clorexidina a 2%, apresentou o maior halo de inibição de crescimento sobre *S. mutans*, sendo esta diferença estatisticamente significativa em relação ao xilitol 35% e à associação clorexidina 0,12% e xilitol 35% ($p < 0,05$), mas não a clorexidina 0,12%. O grupo de clorexidina 0,12% não apresentou diferença estatisticamente significativa com relação à associação de clorexidina 0,12% e xilitol 35%. O grupo xilitol 35% apresentou halos de inibição estatisticamente menores do que todos os outros grupos ($p < 0,05$), exceto o grupo controle negativo (salina 0,9%). Tanto nesse grupo como no anterior apesar da clorexidina a 0,12% e da associação da clorexidina a 0,12% com o xilitol a 35% terem apresentado um resultado satisfatório em relação ao controle negativo (solução salina 0,9%) eles não apresentaram diferença estatística entre si e apresentaram um efeito antimicrobiano inferior ao controle positivo (clorexidina a 2%). O grupo controle positivo (clorexidina 2%) mesmo com apenas 24 horas teve um efeito antimicrobiano superior aos grupos da clorexidina 0,12% e o da associação de clorexidina 0,12% com xilitol 35% com 48 horas. Um trabalho realizado por Drake & Modesto (2006) observaram significativa inibição do crescimento do *S. mutans*, após várias administrações de clorexidina seguida por várias exposições ao xilitol. Tal desenho metodológico pode responder pela discordância dos resultados aqui encontrados, onde não se utilizou múltiplas exposições ao agente antimicrobiano. Esses achados, aparentemente contraditórios, poderão ser explorados mais profundamente em pesquisas futuras com grupos de maior tamanho e através de um estudo *in vivo*.

Segundo a formação do halo de inibição, em ambos os grupos, onde o disco permaneceu em contato durante as 48 horas com o microrganismo e quando o disco foi

removido após dois minutos de exposição, o xilitol 35% foi o que apresentou menor inibição comparado ao grupo controle negativo, a solução salina 0,9%. O fato do xilitol 35% utilizado isoladamente ter apresentado menores halos de inibição, se deve ao fato dele ser bacteriostático, e não bactericida, mesmo em elevadas concentrações. Age no *S. mutans* se acumulando intracelularmente e danificando suas propriedades de adesão a estrutura dentária provocando assim uma diminuição no crescimento e produção de ácidos. Esse mesmo pensamento foi observado (ISOKANGAS *et al*, 1889; SODERLING *et al*, 2000; SODERLING *et al*, 2001; AUTTO, 2002; e LYNCH & MILGROM, 2003). Um maior número de exposições do xilitol ao *S. mutans* em uma nova pesquisa poderia selecionar um microrganismo menos virulento e uma maior redução no número de bactérias. Knuuttila & Makinen (1975), Soderling, Trahan & Lumikari (1998) e Tanzer *et al* (2006) concordam o pensamento acima. Algumas pesquisas *in vitro* demonstram uma inibição do *S. mutans* na presença de glicose, inibindo assim a produção de ácidos, levantando a possibilidade de se realizar um estudo *in vitro* em presença de glicose. Esse pensamento é semelhante ao estudo (KNUUTTILA & MAKINEN, 1975).

A utilização da clorexidina a 2% como controle positivo deveu-se ao conhecimento prévio da sua ação bactericida contra o *S. mutans* (SISSONS & MIDGLEY, 1981; LUOMA, 1972; MARSH *et al*, 1983; HUGO & LONGWORTH, 1964), o que pode ser constatado principalmente no grupo em que as substâncias testadas permaneceram em contato com o microrganismo por 2 minutos. Onde a clorexidina 2% com apenas 24 horas já apresentava um halo de inibição superior as demais substâncias no tempo de 48 horas presente na segunda etapa no momento em que o disco foi removido após dois minutos de exposição.

Um achado expressivo foi observado na terceira etapa da pesquisa, onde na contagem das unidades formadoras de colônia, o controle positivo, a clorexidina a 2%, mostrou a maior inibição de crescimento sobre *S. mutans*. Entretanto, a associação de clorexidina 0,12% com xilitol 35% não apresentou diferença estatística em relação ao controle positivo, concordando com o estudo de Drake *et al* (1993), que mostra que a associação desses antimicrobianos exerce um sinergismo sobre o *S. mutans* melhorando a ação antimicrobiana em relação à clorexidina 0,12% utilizada isoladamente, sugerindo que o xilitol mantém os níveis bacterianos baixos e torna o *S. mutans* menos virulentos. É sabido que, clinicamente, como o xilitol não tem efeito colateral, ele pode ser usado por longo período de tempo interferindo no metabolismo do *S. mutans* e permitindo a manutenção dos excelentes benefícios das aplicações intermitentes de clorexidina, pois essa como possui efeitos

colaterais pronunciados não permite sua utilização de forma contínua ou muito freqüente por longos períodos de tempo. Estudos comprovaram, *in vivo*, que ao se utilizar a clorexidina seguida de xilitol o *S. mutans* torna-se resistente ao xilitol, mas mantém o *S. mutans* menos virulento e seus níveis mais estáveis (TRAHAN *et al*, 1996; SODERLING, TRAHAN & LUMIKARI, 1998; TANZER *et al*, 2006).

A clorexidina a 2% inibiu significativamente o *S. mutans* em todas as etapas da pesquisa. Esse resultado é similar ao publicado anteriormente, no que diz respeito à elevada sensibilidade do *S. mutans* a clorexidina (EMILSON, 1977; EMILSON, 1981; GJERMO, 1989; e ARAÚJO, ARAÚJO & CAMPOS 2001). Por seus efeitos adversos, não se pode utilizar clinicamente esta concentração, permitindo-se apenas a utilização de clorexidina a 0,12% no controle da cárie dentária. Na terceira etapa desse estudo, a clorexidina 0,12% não foi tão efetiva contra *S. mutans*. O xilitol 35%, que apresentou resultados estatisticamente semelhantes ao grupo-controle negativo, ao ser combinado com a clorexidina 0,12% resultou numa associação tão eficiente na inibição de formação de colônias bacterianas quanto a clorexidina a 2%. Esta observação indica que existiu um efeito sinérgico entre estas duas substâncias, o que é bastante benéfico, se reprodutível clinicamente, pois a potencialização na inibição do *S. mutans* revela uma possibilidade de profilaxia e controle muito mais eficiente da cárie dentária resultante da ação desta bactéria. O sinergismo de certas associações de substâncias antimicrobianas no controle da cárie dentária já vem sendo observada por Luoma (1972), Drake *et al* (1993) e Modesto & Drake (2006).

No estudo aqui desenvolvido, o xilitol 35% não foi eficaz isoladamente sobre o *S. mutans*. Sabe-se que a ação do xilitol é apenas bacteriostática, mesmo quando utilizado em elevadas concentrações. Sua atividade clínica baseia-se no controle e prevenção da formação do biofilme e na capacidade de limitar o crescimento do *S. mutans* através da inibição de enzimas. As aplicações desses resultados *in vivo* indicam que uma baixa concentração de xilitol afetaria o crescimento e a proliferação do *S. mutans* segundo Sahni *et al* (2002) e ASSEV, WALER & ROLLA (1983). O fato de o xilitol ter apresentado o pior resultado pode ser justificado pela necessidade de biofilme dentário e também pelo fato dele não ser metabolizado pelo *S. mutans*. E pelo método utilizado pode-se avaliar mais precisamente a ação bactericida das substâncias testadas.

6 CONCLUSÕES

Todas as substâncias testadas tiveram comportamento bacteriostático frente ao *S. mutans* no teste de exposição direta.

Entre as soluções testadas, a clorexidina 0,12% apresenta-se como a mais eficaz na inibição do crescimento do *S. mutans* quando avaliado o halo de inibição bacteriana;

O xilitol 35% apresentou a menor capacidade antimicrobiana em relação ao *S. mutans*.

Houve sinergismo na associação da clorexidina 0,12% e xilitol 35% na ampliação de capacidade inibidora do crescimento do *S. mutans*.

REFERÊNCIAS

- ACHONG, R. A. *et al.* Effect of chlorhexidine varnish mouthguards on the levels of selected oral microorganisms in pediatric patients. *Pediatric Dent*, v. 21, n. 3, p. 169-175, 1999.
- ALALUUSU, A.; MALMIVIRIA, R. Early plaque accumulation-a sign for caries risk in young children. *Community Dent Oral Epidemiol*, Michigan, V.22, n.5, p.273-276, oct.1994
- ALBANDAR, J.; GJERMO, P.; PREUS, H. Chlorhexidine use alter two decades of over-the-counter availability. *J. Periodontal*, 1994, n. 65, p. 109-112.
- ALMEIDA, B. S.; BASTOS, J. R. M. Uso de clorexidina associada com a escovação no controle de biofilme dentária de escolares. *RGO*, v.49, n. 3, p.133-138, jul/ago/set, 2001.
- AMEACHI, B. T.; SUSAN, M. H.; WILLIAM, M. E. Caries inhibiting and remineralizing effect of xylitol *in vitro*. *Journal of Oral Science*. V. 41, N. 2, p. 71-76, 1999.
- ARAÚJO, F. B. Dente erupcionado deve ser selado? *In: Atualização na clínica odontológica*. São Paulo: Artes Médicas, p.197-203.1994.
- ARAÚJO, M. T. B; ARAÚJO, R. P. C.; CAMPOS, E. J. Estudo *in vitro* e *ex vivo* da atividade bactericida da clorexidina a 0,12% e a 0,2% e dos produtos farmacológicos Listerine e Duplak. *Revista Odonto Ciência*, V.16, n.33, Porto Alegre, mai/ago, 2001. p. 187-200.
- ARNEBERG, P. *et al*, *Promoção de Saúde Oral na Clínica Odontológica*. São Paulo: Artes Médicas LTDA., 2000. cap 9, p.218-245.
- ASSEV, S.; WALER, M.; ROLLA, G., Further studies on the growth inhibition of some oral bacteria by xylitol. *Acta Pathol Microbial Immunol Scand B*, 1983. 91, p. 261-265.
- _____. Further studies on the growth inhibition of some oral bacteria by xylitol. *Acta Microbiol Immunol*, Escandinávia, n.9, 1986. p.261-265.
- ATTIN, R. *et al.* Efficacy of differently concentrated chlorhexidine varnishes in decreasing mutans streptococcus and lactobacilli counts. *Arch Oral Biol*. 2003; 48: 503-509.
- AUTTO, J. T. Effect of xylitol chewing on salivary streptococci mutans in preschool children. *J. Dentchild*, 2002, 69:81-86.

- BECKERS, H. J. A. Influence of xylitol on growth, establishment, and carcinogenicity of streptococci mutans in dental plaque of rats. *Caries Res.* 1988. 22, p. 166-173.
- BERKOWITZ, R. J.; TURNER, J.; GREEN, P. Primary oral infection of infants with *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol*, Oxford, v. 25, n. 3, p. 221-224, mar, 1980.
- BONESWOLL, P.; GERMO, P. A. Comparison between chlorhexidine and some quaternary ammonium compounds with regard to retention, salivary concentration and plaque inhibiting effect in the human mouth after mouthrinses. *Archives of oral Biology*. V. 23, p. 289-294, 1978.
- BOTELHO, M. G. Fractional inhibitory concentrations index of combinations of antibacterial agents against cariogenic organisms. *Journal of Dentistry*. V. 28, n. 9, maio/2000. P. 565-570.
- BOWEN, W. H. Do we need to be concerned about dental caries in the coming millennium? *Crit Rev oral Biolmed*, Stanford, V.13, n. 2, mar. 2002. p.126-131.
- BRIAN, A. B. O uso de pastilhas elásticas adoçadas com xilitol e sorbitol no controlo da cárie. *JADA*. V. 6. N. 5, Set/out/2006.
- BUSSADORI, S. K. *et al.* Uso de vernizes de flúor e de clorexidina na promoção de saúde bucal. *Rev Assoc Paul Cir Dent*, v. 58, n.5, p. 359-362, 2004.
- CURY, J. A. Avaliação de um gel dentifrício contendo xilitol e flúor. *Ver. Bras. Odontol*. V. 64, n. 4, p. 36-42, jul/ago/1987.
- CUTRESS, T. *et al.* Caries preventive effect of high fluoride and xilitol containing dentifrices. *J Dent Child*, v. 9, n. 4, p. 313-318, 1992.
- DRAKE, D. R. *et al.* Synergistic growth inhibitory effect of chlorhexidine and copper combinations on *Streptococcus mutans*, *Actinomyces viscosus* and *Actinomyces naeslundii*. *Journal of Dental Research*, n. 72, 1993, p. 524-528.
- EDGAR, W. M. Sugar substitutes, chewing gum and dental caries: a review. *Br Dent J*, v.1, p.29-32, 1998.
- EMILSSON, C. G. Susceptibility of various microorganisms to chlorhexidine. *Scand J Dent Res*. 1977. 85:255-265.

EMILSSON, C. G. Effect of chlorhexidine gel treatment on *Streptococcus mutans* population in human saliva and dental plaque. *Scand J Dent Res*, v. 89, p. 239-246, 1981.

_____. Potential efficacy of chlorhexidine against mutans streptococci and human dental caries. *J. Dent Res*. 1994, 73:682-691.

EMILSSON, C. G.; GISSELSSON, H.; BIRKHED, G. H. Recolonization pattern of mutans streptococci after suppression by three different models of chlorhexidine gel application. *Eur J. Oral Sci*, 1999. 107:170-175.

FADEL, C. B.; KOZLOWSKI JUNIOR., V. A. Dieta e higienização bucal como preditores da cárie dental na primeira infância. *UFES Rev Odontol*, v.1, n.2, p. 66-77. 1999.

FERREIRA, F. Efeito do xilitol em pastilhas na composição do biofilme dental e na desmineralização e remineralização do esmalte. *Faculdade de Odontologia (FO). USP*. 2007.

FIGUEIREDO, M. C.; FALSTER, C. A. A cárie dentária como uma doença infecciosa transmissível. *RFO UPF*, Passo Fundo, v.2, n.1, p.23-32, 1997.

FLEMMING *et al.* Supragingival irrigation with 0,06% chlorhexidine in naturally occurring gingivitis. 6 month clinical observations. *J.Periodontol*, v.2, n.61, p.112-117, 1990.

FREITAS, L. B.; RUNDEGREN, J.; ARNEBRANT, T. The binding of delmopinol and chlorhexidine to *Streptococcus mutans* and *actinobacillus actinomycesetemcomitans* strains with varying degrees of surface hydrophobicity. *Oral Microbial Immunol*, v.8, p.355-360, 1993.

FREITAS, S. C. *et al.* Evaluation of the substantivity of chlorhexidine in association with sodium fluoride *in vitro*. *Pesquisa. Odontol. Bras.* v. 17, n.1, São Paulo, jan/mar. 2003.

GEBARA, E. C. E.; ZARDETTO, C. G. D. C.; MAYER, M. P. A. Estudo *in vitro* da ação antimicrobiana de substâncias naturais sobre *S. mutans* e *S. sobrinus*. *Rev Odontol*, Univ São Paulo, v.10, n.4, p.251-256, out/dez, 1996.

GEBRAN, M. P.; GEBERT, A. P. O. Controle químico e mecânico de placa bacteriana. *Ciência e Cultura*. N. 26, V.3, p. 45-58. Curitiba, jan/2002.

GIERTSEN, E.; EMBERLAND, H.; SCHEIE, A. A., Effects of mouthrinses with xylitol and fluoride on dental plaque and saliva. *Caries Res*, v.33, n.1, p.23-31, 1999.

GJERMO, P, Chlorhexidine and related compounds. *J Dent Res*, n. 68, 1989, p. 1602-1608.

GJERMO, P.; SAXTON, C. A. Antibacterial dentifrices. Clinical data and relevance with emphasis on zinc/triclosan. *J Clin Periodontol*, v.18, p. 468-473, 1991.

GONÇALVES *et al.* Efeito de soluções fluoretadas contendo xilitol e sorbitol no número de estreptococos do grupo mutans na saliva de seres humanos. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health* 9(1), 2001.

GRÖNROOS, L. *Quantitative and Qualitative Characterization of Mutans Streptococci in Saliva and in the Dentition.* (Academic Dissertation - Department of Pedodontics and Orthodontics, Institute of Dentistry, University of Helsinki and Department of Oral and Maxillofacial Diseases, Helsinki University Central Hospital). Helsinki, 2000. 80 f.

GROSSMAN, E. *et al.* Six months study of the effect of a chlorhexidine mouthrinse on gingivitis in adults. *Periodont Rest*, n. 21, 1986, p. 33-43.

HAMADA, S.; SLADE, H. D. Biology, immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Rev*, Washington, v.44, n.2, p.331-384, June 1980.

HAYES, C. The effect of noncariogenic sweeteners on the prevention of dental caries; A review of the evidence. *J Dent Educ*, v.65, p.1106-1109, 2001.

HELDERMAN, W. H. *et al.* Cariogenicity depends more on diet than the prevailing mutans streptococcal species. *J Dent Res*, Stanford, V.75, n.1, p.535-545, Jan, 1996.

HENNESSEY, T. D. Some antibacterial properties of chlorhexidine. *J Periodontal res*, v.8 (spec iss): p.61-67, 1973.

HILDEBRANDT, G. H.; SPARKS, B. S. Maintaining mutans streptococci suppression with xylitol chewing gum. *JADA*, 2000. 131:909-916.

HOUTE, J. Role of micro-organisms in caries etiology. *J Dent Res*, Stanford, V.73, n.3, p. 672-681, mar, 1994.

HUGO, W. B.; LONGWORTH, A. R. Some aspects of the mode of action of chlorhexidine. *J Pharm Pharmacol*, v. 16, p. 655-662, 1964.

HULL, P. S. Chemical inhibition of plaque. *J. Clin Periodontol.*v.7, p. 431-442, 1980.

ISOKANGAS, P. Xylitol chewing gum in caries prevention. A longitudinal study on Finnish school children. *Proc Finn Dent Soc*, v.83. p.1-117, 1987.

ISOKANGAS, P. *et al.* occurrence of dental decay in children after maternal consumption of xylitol chewing gum, a follow-up from 0 to 5 years of age. *J.Dent.Res.*, v.79, n.11, p.1885-1889, Nov/2000.

JAANA, T. Effect of xylitol chewing gum on salivary *streptococcus mutans* in preschool children. *Journal of dentistry for children.* january-april/2002.

JANESSON REWERT, S. *et al.* Effect of tricloxin – containing toothpaste supplemented with 10% xylitol on mutans streptococci in saliva and dental plaque. *Caries Res.* 2002. 36, p. 36-39.

KLEIN, U.; KANELIS, M. J.; DRAKE, D. Effects of four anticaries agents on lesion depth progression in an vitro caries model. *Pediatric Dentistry.* 21:3, 1999, july, p.176-180.

KNUUTTILA, M. L. E.; MAKINEN, K. K. Effect of xilitol on the growth and metabolism of *Streptococcus mutans*. *Caries Res*, 1975; 9;177-189.

KOEMAN, M. *et al.* Oral decontamination with chlorhexidine reduces the incidence of ventilator-associated pneumonia. *American journal of respiratory critical care*, v. 15, n. 173 (12), p. 1348-1355. 2006.

KREULEN, C. M. *et al.* *Streptococcus mutans* in children using nursing bottles. *ASDC Journal of Dentistry for Children*, 1997; 64:107-111.

LASCALA, C. E; BELLUZZO, R. H. L.; LASCALA JÚNIOR, N. T. Procedimentos de motivação e higiene bucal em pacientes sob tratamento ortodôntico objetivando a saúde periodontal. *Periodontia.* V. 5, n. 4, p. 324-327, jul/dez, 1996.

LATIF, F.; RAJOKA, M. I. production of ethanol and xylitol from corn cobs by yeasts. *Bioresour Technol.* v.77, p.57-63, 2001.

LIMA, C. K. *et al.* Levels of infection and colonization of some oral bacteria after use of NaF, chlorhexidine and a combined chlorhexidine with NaF mouthrinses. *Brazilian Journal of Microbiology*, n. 32, p. 158-161. ISSN 1517-8382. 2001.

LIMA, L. H. A.; BERLINCK, C. N. Xilitol, o adoçante do future. *Ciência Hoje*. v.33, n.195, p.66-69, jul/2003.

LINDQUIST, B.; EMILSON, C. G. Distribution and prevalence of mutans streptococci in the human dentition. *Journal of Dental Research*, n. 69, p. 1160-1166. 1990.

LINGSTRÖM, W. J. *et al.* Effects of frequent mouthrinses with palatinose and xylitol on dental plaque. *Eur J Oral Sci.* 1997; 105: 162-169.

LOE, H.; SCHIOTT, R. The effect of mouthrinses and topical application of chlorhexidine on the development of dental plaque and gingivitis in man. *J. periodontal res*, 1970, n. 2, p. 79-83.

LOESCHE, W. L. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev*, Washington, v.50, n.4, p.353-380, Dec. 1986.

_____. *Cárie dental: uma infecção tratável*. Rio de Janeiro: Cultura médica, 1993, 349 p.

LORENZO, J. L. de. *Microbiologia para o estudante de odontologia*. São Paulo: Atheneu, 2004.

LUOMA, H. The effects of chlorhexidine and fluoride combinations on the potassium, sodium and phosphorus content and acid production of cariogenic streptococci. *Archs oral Biol*, v.17, p.1431-1437, 1972.

LYK, A. *et al.* Xylitol, Sweeteners, and Dental Caries. *Pediatric Dentistry*. 28:2 2006.

LYNCH, H.; MILGROM, P. Xylitol and dental caries: an overview for clinicians. *Journal of the California Dental Association*, n. 31, 2003, p. 205-229.

MACHADO, W. A. S. *et al.* A clorexidina no controle de placa em pacientes internados: estudo piloto. *RBO*, v.59, n.6, p.390-392, nov/dez, 2002.

MACIEL, S. M., MARCENES, W; SHEIHAM, A. The relationship between preference levels of salivary mutans streptococci and caries experience in brazilian pre-school children. *Int J Paediatric Dentistry*, London, V.11, n.2 ,p.123-130, mar/2001.

MAKINEN, K .K.; HUJOEL, P. P.; BENNETT, C. A.; *et al.* A descriptive report of the effects of a 16-month xilitol chewing-gum programme subsequent to a 40-month sucrose gum programme. *Caries Res*, v.32, p.107-112,1998.

MÄKINEN, K. K.; MÄKINEN, P. L.; PAPE, H. R. JR, *et al.* Conclusion and review of the “Michigan xilitol Programme” (1986-1995) for the prevention of dental caries. *Int Den J.* v.46, p.22-34, 1996.

MALTZ, M.; ZICKERT, I.; KRASSE, B. Effect of intensive treatment with chlorhexidine on number of *Streptococcus mutans* in saliva. *Scandinavian Journal of Dental Research*, n. 89, p. 445-449. 1981.

MARSH, P.D. *et al.* Inhibition vy the antimicrobial agent chlorhexidine of acid production and sugar transport in oral streptococcal bacteria. *Archs Oral Biol*, v.28, p.233-240, 1983.

MODESTO, A.; DRAKE, D. R. Multiple Exposures to Chlorhexidine and Xylitol: biofilm formation by streptococci mutans. *J. Dent Res.*2002. 28. P. 445.

_____. Multiple Exposures to Chlorhexidine and Xylitol: Adhesion and Biofilm Formation by *Streptococcus mutans*. *Current Microbiology*, V.52, p. 418-423, 2006.

MOUTON, C.; SCHEININ, A.; MAKINEN, K. K. Effect of a xilitol chewing gum on plaque quantity and quality. *Acta Odontol Scand*, v.33, n.5, p.251-257, Sep/oct.,1975.

NIE, M.; FAN, M.; BIAN Z. Transmission of mutans streptococci in adults within a chinese population. *Caries Res.* v. 36:161-6, 2002.

NOMELINI, M. H. D.; CUNHA, S. F. C. Prevalência de cárie e determinação dos fatores cariogênicos em bebês de uma equipe do programa saúde da família,uberaba. *Revista ibero-americana de Odontopediatria e Odontologia do bebê*, v.9, n.47, p.73-78, jan/fev, 2006.

PERES, D. D. F.; RIBEIRO, G. L. U. Avaliação da eficácia do verniz de clorexidina na supressão dos estreptococos do grupo mutans na dentição decídua-estudo *in vivo*. *Rev Pós Grad*, v.11, n.1, p.49-56, 2004.

- PERES, D. D. F. *et al.* Prevalência dos Streptococos do grupo Mutans (Egm) em crianças de 8 a 60 meses nas creches da Cidade de Joinville-SC. *JBP*, v.6, n.29, p.36-40, 2003.
- PETERSSON, L. G. *et al.* Caries-preventive effect of dentifrices containing various types and concentrations of fluoride and sugar alcohols. *Caries Res.* 1991; 25: 74-79.
- PINHEIRO, C. E. Curso de Bioquímica da cárie dental; - VI - Fatores etiológicos: suscetibilidade do dente. *Rev. Paul. Odontol.*, v.5, n.4, p.53-62,jul./ago. 1983.
- RAMAGLIA, L. *et al.* A clinical comparison of the efficacy and efficiency of two professional prophylaxis procedures in orthodontic patients. *European J Orthodontics*, v.21, p.423-428, 1999.
- REFERENCE MANUAL. Oral Health Policies.Guidelines Policy on The Use of Xylitol in *Caries Prevention*. 2006-2007.
- REKOLA, M. Correlation between caries incidence and frequency of chewing gum sweetened with sucrose or xilitol .*Proc Finn Dent Soc*, v.85, p.21-24, 1989.
- RENTO-HARPER P., *et al.* A comprison of chlorhexidine, ctylpyridinium chloride, triclosan and c3g1 monthrinse products for plaque inhibition. *J. Periodontal.*, n. 67, 1996, p. 486-489.
- ROGERS *et al.* Effects of pulsing with xylitol on mixed continuous cultures of oral streptococci. *Australian Dental Journal*. 1991. 36(3); 231-5.
- SAHNI, P. S. *et al.* In vitro testing of xylitol as an anticariogenic agent. *Gen Den*, 2002, 50:340-343.
- SANDHAM, H. J. *et al.* A preliminary report of long-term elimination of detectable mutans streptococci in man, *Journal of Dental Research*. N. 67, p. 9-14.1988.
- SCHAEKEN, M. J. M. *et al.* Influence of contact time and concentracion of chlorhexidine varinish on mutans streptococci in interproximal dental plaque. *Cries Res.* 1991, 25:292-295.
- SCHEININ, A. *et al.* Sugar Studies V. Final report on the effect of sucrose, fructose and xylitol diets on the caries incidence in man. *Acta Odontol, Scand.* v.33, n.70, p 67-104, 1975.
- SCHEININ, A. Caries control through the use of sugar substitutes. *Int Dent J.* v. 26, p.4-13, 1976.

- SEKINO, S. *et al.* The effect of a chlorhexidine regimen on plaque formation. *J Clin Periodontol*, n. 31, 2004; p. 609-614.
- SEOW, W. K. Biological mechanisms of early childhood caries. *Comm Dent Oral Epidemiol*, v. 26, n.1, p.8-27, 1998.
- SERRA, C. M.; LOFFREDO, L. C. M.; PINELLI, C. Reprodutibilidade de um teste microbiológico para estreptococos do grupo mutans. *Pesq Odont Bras*, v.14, n.1. p.13-18. jan/mar, 2000.
- SHAW, W. C. *et al.* Chlorhexidine and traumatic ulcers in orthodontic patients. *European Journal of Orthodontics*, V.6, p.137-140, 1984.
- SIMONS, D. *et al.* The effect of chlorhexidine/xylitol chewing gum on plaque accumulation and gingival inflammation. *J. Clin Periodontal*. 1999, 26:388-391.
- SINTES, J. L. *et al.* Enhanced anticaries efficacy of a 0.243% sodium fluoride/10% xylitol/silica dentifrice: 3-year clinical results. *Am J Dent*. 1995; 8: 231-235.
- SISSONS, A.; MIDGLEY, M. Energy transduction in chlorobium limicola: role membrane-bound adenosine triphosphatase and the proton electrochemical gradient. *J Gen Microbiol*, v.122, p.211-216, 1981.
- SÖDERLING, E. *et al.* Influence of maternal xylitol consumption on mother-child transmission of Mutans Streptococci: 6-year follow-up. *Caries Res*, Bristol, v. 35, n. 3, p. 173-177, May-June, 2001.
- SODERLING, E.; PIHLANTO-LEPPALA: Uptake and expulsion of ¹⁴C-xylitol by xylitol cultured *Streptococcus mutans* ATCC 25175 *in vivo*. *Scand J Dent Res* 1989; 97:511-9.
- SODERLING, E.; TRAHAN, L.; LENANDER-LUMIKARI, M. Growth of xylitol resistant versus xylitol – sensitive streptococci mutans strains in saliva. *Acta Odontol Scand*. Huddinge, V. 56, n. 2, p. 116-121, apr/1998.
- SODERLING, E. *et al.* Influence of maternal xylitol consumption on acquisition of mutans streptococci by infants. *J. Dent. Res*. v.79, n.3, p.882-887, mar/2000.

SVANBERG, M.; BIRKHED, D. Effect of dentifrices containing either xylitol and glycerol or sorbitol on mutans streptococci in saliva. *Caries Res*, v.25, n.6, p.449-453, 1991.

TADA, K. *et al.* Microbial xylitol production from corn cobs using *Candida magnoliae*. *J Biosci Bioeng*, v.98, p.228-230, 2004.

TANZER, J. M. *et al.* *Streptococcus mutans*: Fructose Transport, xylitol resistance, and virulence. *Journal of Dental Research*; apr.2006; 85,4; Pro Quest medical library; p 369-373.

TENOVIUO, J.; MAKINEN, K. K.; PAUNIO, K. Effects on oral health of mouthrinses containing xylitol, sodium cyclamate and sucrose sweeteners in the absence of oral hygiene.IV. Analysis of whole saliva. *Proc Finn Dent Soc*, v.80, n.1, p.28-34, 1984.

TENOVIUO, J. *et al.* Effect of chlorhexidine-fluoride gel treatments in mothers on the establishment of mutans streptococci primary teeth and the development of dental caries of children. *Caries Res* , Bristol, V. 26, n. 4, p.275-280, Aug. 1992.

TORRES, C. R. G. *et al.* Agentes antimicrobianos e seu potencial de uso na odontologia. *Rev Faculdade de São José dos Campos*, v.3, n.2, p.43-52, 2000.

TRAHAN, L. Xylitol: a review gum and dental caries. *Int. Dent J.* 45, p. 65-76. 1995.

TRAHAN, L. Xylitol: a review of its action on mutans streptococci and dental plaque-its clinical significance. *Int Dent J*, v.45, p.77-92, 1995.

TRAHAN, L. *et al.* Transport and phos phorylation of xylitol by a fructose phosphotransferase system in streptococci mutans. *Caries Res.* 1985. 19, p. 53-63.

_____. Effect of xylitol consumption on the plaque – saliva distribution of mutans streptococci and the occurrence and long – term survival of xylitol – resistant strains. *J. Dent Res.*1992. 71. P. 1785-1791.

VAAHTONIEMI, L. H. *et al.* Mouth-rising with chlorhexidine causes a delayed, temporary increase in the levels of oral viridans. *Adcta odontol scand*, v.53, n.4, p.226-229, 1995.

VAN STRYDONCK, D. A. C. *et al.* Plaque inhibition of two commercially available chorhexidine mouthrinses. *Journal of Clinical Periodontology*, v.12, p.305-309, 2005.

WAN, A. K. *et al.* The effects of chlorhexidine gel on *streptococcus mutans* infection in 10-month-old infants: a longitudinal, placebo-controlled, double-blind trial. *Pediat Dent*; 25:215-222, 2003.

WHILEY, R. A.; BEIGHTON, D. Current classification of the oral streptococci. *Oral Microbiol. Immunol*, v.13, p.195-216,1998.

WHO – World Health Organization. www.int/oral_health/action/information/surveillance

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)