



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**ALTERAÇÕES AMBIENTAIS ORAIS, ATRAVÉS DO USO DE PASTILHAS
ELÁSTICAS COM XILITOL COM E SEM ASSOCIAÇÃO A UMA PASTA
DE CPP-ACFP**

Trabalho submetido por
Joana Santos Matos Alves
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

outubro 2017



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**ALTERAÇÕES AMBIENTAIS ORAIS, ATRAVÉS DO USO DE PASTILHAS
ELÁSTICAS COM XILITOL COM E SEM ASSOCIAÇÃO A UMA PASTA
DE CPP-ACFP**

Trabalho submetido por
Joana Santos Matos Alves
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Trabalho orientado por
Prof. Doutora Ana Cristina Manso

E coorientado por
Mestre Joana do Carmo

outubro 2017

Aos meus pais

Aos meus avós

Ao meu irmão

AGRADECIMENTOS

À Prof. Doutora Ana Cristina Manso por todo o apoio prestado ao longo deste trabalho, pelo incentivo e feedback durante o desenvolvimento do mesmo e exigência. Muito obrigada por tudo.

À Prof. Carla Ascenso por me ter possibilitado o meu Erasmus e por todo o apoio dado ao longo do mesmo.

Obrigado ao Prof. Doutor Luís Proença e à Mestre Joana do Carmo pelo auxílio prestado.

Aos meus pais e ao meu irmão por acreditarem em mim e nas minhas capacidades, por estarem sempre lá para mim ao final do dia, por todo o amor e carinho que sempre me deram, assim como os valores que me transmitiram.

Aos meus avós, pelo apoio e paciência, por terem tido um enorme contributo no meu crescimento e formação, por toda a preocupação e presença na minha vida.

À Madalena e Filipa, pelo apoio e amizade incondicional, e por cada uma de sua forma, ter feito esta caminhada a meu lado.

A todos os meus amigos que de alguma forma contribuíram para o enriquecimento do meu percurso pessoal e académico e que deixaram um pouco da sua ‘marca’ em diferentes momentos importantes. Um forte obrigada a todos.

A todos os funcionários e professores que comigo se cruzaram e deram o seu contributo, de alguma forma, neste meu percurso.

RESUMO

Objetivo: Esta investigação tem como objetivo medir e comparar a variação de taxa de fluxo salivar, pH, capacidade tampão e contagem de estreptococos mutans e lactobacilos, mastigando um *pellet* de parafina ou uma pastilha elástica com xilitol, com e sem a associação de uma pasta de CPP-ACFP.

Métodos: A amostra foi constituída por 60 indivíduos dos 13 aos 24 anos de idade, de ambos os sexos, pacientes na clínica universitária do ISCSEM, que foram divididos aleatoriamente em quatro grupos, de 15 elementos. Dois grupos mastigaram pastilhas elásticas com xilitol (A e B), e foi associada uma pasta de CPP-ACFP a um deles (B). Os outros dois grupos mastigaram uma pastilha de parafina (C e D), tendo sido associada pasta de CPP-ACFP a um deles também (D). Foram recolhidas amostras de saliva de cada indivíduo, e mediu-se o fluxo salivar, os valores de pH, capacidade tampão, e a densidade de UFC de estreptococos mutans e lactobacilos.

Os dados obtidos foram tratados estatisticamente pelo *software SPSS*. Foram utilizados testes Post-hoc para correlacionar as variáveis, usando-se um nível de significância de 5% como referência para aceitar ou rejeitar a hipótese nula.

Resultados: Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas das médias de pH entre os quatro grupos, com destaque no grupo C (média=5.84; dp=1.25), grupo A (média=7,25; dp=0,06), grupo B (média=7,22; dp=0,33) e grupo D (média=7,72; dp=0,12); foram encontradas diferenças significativas também na contagem de UFC de estreptococos mutans ($p>0,05$), entre os grupos que mastigaram pastilha elástica com xilitol e os que mastigaram pastilha de parafina; não foram encontradas diferenças significativas nas restantes variáveis dos grupos.

Conclusões: A associação do CPP-ACFP com o xilitol demonstrou ser a melhor, uma vez que os resultados alcançados neste grupo (D) demonstraram média de pH e capacidade mais elevadas, e contagem de UFC de estreptococos mutans mais baixa.

Palavras-chave: xilitol; CPP-ACP; saliva; cárie

ABSTRACT

Objectives: The aim of this study is to measure and compare the salivary flow rate variation, as well as the pH, buffer capacity and counts of *streptococcus mutans* and *lactobacillus*, chewing on a paraffin pellet or a xylitol chewing gum, with and without a CPP-ACFP paste association.

Methods: 60 patients from ISCSEM, between 13 and 24 years old, from both genders, were observed and divided randomly in four groups of 15 people each. Two groups chewed xylitol gums (A and B), and one of them associated with CPP-ACFP tooth paste (B). The other two chewed a paraffin pellet (C and D), with one of them also associating CPP-ACFP tooth paste (D). Saliva samples were collected from each individual, and salivary flow rate, buffer capacity, pH and density of *streptococcus mutans* and *lactobacillus* were measured.

The data obtained was analysed statistically through SPSS software. Post-hoc tests were performed to correlate the variables, using a 5% significance level as reference to accept or reject the null hypothesis.

Results: Significant statistical differences were found on the pH levels between the four groups, highlighting group C (mean=5,58; sd=1,25), group A (mean=7,25; sd=0,06), group B (mean=7,22; sd=0,33) and group D (mean=7,72; sd=0,12); significant statistical differences were also found on the *streptococcus mutans* counts ($p>0,05$), between the groups who chewed xylitol chewing gum (A and B) and the ones who chewed on a paraffin gum (C and D); no significant differences were found in the remaining group variables.

Conclusion: Association of CPP-ACFP and xylitol (group D) has showed to be the best, since the pH level and buffer capacity were higher, and counts of *streptococcus mutans* were lower.

Keywords: xylitol; CPP-ACP; saliva; carie

ÍNDICE GERAL

1 - INTRODUÇÃO.....	13
1.1.Cárie e a sua Progressão.....	13
1.2. Saliva	18
1.3. Estreptococos Mutans e Lactobacilos	21
1.4. CPP-ACP (Fosfopeptídeo de Caseína Fosfato de Cálcio Amorfo) e CPP-ACFP (Fosfopeptídeo de Caseína Fosfato de Cálcio Amorfo e Flúor)	23
1.5. Xilitol.....	25
1.6. Objetivos e Hipóteses do Estudo.....	28
1.6.1. Objetivos do Estudo.....	28
1.6.2. Hipóteses do Estudo.....	28
2 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
2.1. Grupo de Estudo	29
2.2. Considerações Éticas	29
2.3. Recolha de Dados e Material	29
2.4. Análise Estatística	31
3 – RESULTADOS	33
3.1. pH	33
3.2. Fluxo Salivar.....	41
3.3. Capacidade Tampão	43
3.4. Estreptococos mutans	44
3.5. Lactobacilos	46
4 – DISCUSSÃO	49
5 – CONCLUSÕES	53
BIBLIOGRAFIA	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Fatores envolvidos no desenvolvimento e progressão de cárie; adaptado de (Pitts et al., 2011).....	17
Figura 2 - Pasta Dentífrica de CPP-ACFP da marca GC MI Paste Plus®.....	24
Figura 3 - Pastilhas elásticas com xilitol marca Trident®.....	27
Figura 4 - Gráfico de média de pH com outliers.....	33
Figura 5 - Gráfico das médias de pH ainda com outliers.....	35
Figura 6 - Gráfico de média de pH após eliminação de outliers.....	36
Figura 7 - Gráfico ilustrativo das médias de pH de cada grupo.....	40
Figura 8 - Gráfico de barras de fluxo salivar com contagem de indivíduos com fluxo normal ou baixo por grupo.....	42
Figura 9 - Gráfico de barras de capacidade tampão elevada, média ou baixa por cada indivíduo de cada grupo.....	43
Figura 10 - Gráfico de barras de contagem de UFC de estreptococos mutans elevadas e baixas em cada grupo.....	45
Figura 11 - Gráfico de barras de contagem elevada ou baixa de UFC de lactobacilos por grupo.....	47

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Testes de normalidade de média de pH.....	33
Tabela 2 - Novo teste de normalidade da média de pH.....	34
Tabela 3 - Testes de normalidade da média de pH após remoção de outliers.....	36
Tabela 4 - Teste de Levene para verificação do pressuposto da homogeneidade de variâncias.....	37
Tabela 5 - Número de indivíduos por amostra após exclusão dos outliers, médio, desvio padrão e valor mínimo e máximo de pH de cada grupo.....	37
Tabela 6 - Testes Robustos de Igualdade de médias de Brown-Forsynth.....	38
Tabela 7 - Teste Post-hoc de Tamhane's para comparar as médias de pH entre grupos.....	39
Tabela 8 - Número de indivíduos que tinham fluxo salivar normal ou baixo por grupo.....	41
Tabela 9 - Número de indivíduos com capacidade tampão elevada, média e baixa por grupo.....	43
Tabela 10 - Número de indivíduos com contagem de UFC de estreptococos mutans elevada e baixa por grupo.....	44
Tabela 11 - Teste de Qui-Quadrado sobre contagem de UFC de estreptococos mutans em todos os grupos.....	45
Tabela 12 - Número de indivíduos com contagem elevada ou baixa de UFC de lactobacilos.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS

ACFP – Fosfato de Cálcio Amorfo e Flúor

ACP – Fosfato de Cálcio Amorfo

ATP – Adenosina Trifosfato

CPP – Fosfopéptido de Caseína

ISCSEM – Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz

UFC – Unidades Formadoras de Colónias

1 - INTRODUÇÃO

1.1. Cárie e a sua Progressão

A cárie dentária é um problema de saúde pública que afeta indivíduos em todo o mundo, independentemente da raça, sexo, etnia, idade, etc. Está presente tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento, tendo custos financeiros muito elevados e sendo considerada um problema social. A sua incidência está dependente de vários fatores, dos quais se destacam o consumo de hidratos de carbono refinados, higiene oral deficiente, e ausência ou falta de cuidados dentários, assim como a não existência de um regime preventivo, no qual a educação da população para este problema poderia ser bastante útil e importante no seu controlo (S. G. Damle, Bector, Damle, & Kaur, 2016).

A cárie é resultante do processo de desmineralização dentária, que ocorre por sua vez, quando há um desequilíbrio entre os fatores patológicos e os protetores. Os fatores patológicos são os hidratos de carbono fermentáveis (como foi referido no parágrafo anterior), bactérias cariogénicas (como o estreptococos mutans de que falaremos mais à frente) e as disfunções salivares (que induzem uma diminuição no fluxo salivar e capacidade tampão). Esse desequilíbrio vai provocar alterações nos processos fisiológicos de desmineralização/remineralização, favorecendo o desenvolvimento de cárie (Oliveira et al., 2014). A lesão de cárie deve ser considerada apenas a lesão do esmalte. Quando esta progride e atinge a dentina, passa a ser designada de cárie de dentina; neste tipo de lesão os fatores e mecanismos de ação são totalmente diferentes da lesão de esmalte, com participação de metaloproteinases, que degradam as matrizes celulares e o colagénio. Apesar das suas diferenças da lesão de esmalte, a lesão de dentina também pode ser revertida através da reestruturação do tecido quando ocorre um reequilíbrio (Lima, 2007).

Trata-se de uma doença multifatorial e complexa, dependente da interação de fatores pessoais (educação, estatuto sociodemográfico, nível socioeconómico, conhecimento, atitudes e comportamentos em relação à saúde oral, hábitos de higiene oral e hábitos de ‘snacking’) e ambientais (composição da saliva, fluxo salivar, capacidade tampão, agentes antibacterianos, selantes de fissura, flúor, consumo de pastilhas elásticas, pH da placa e microrganismos existentes na mesma, concentração de iões de cálcio e fosfato e frequência de consumo de açúcares e proteína) em

combinação com o fator tempo. Em relação aos fatores pessoais, devemos considerar a susceptibilidade do hospedeiro em si e também a do dente. Temos fatores extrínsecos, referentes ao hospedeiro, como o nível socioeconómico e cultural, estilo de vida e comportamentos ou atitudes em relação à saúde oral, e fatores intrínsecos, como a qualidade da saliva (fluxo salivar, capacidade tampão da mesma, concentração de iões de cálcio e fosfato, etc), a hereditariedade e a imunologia (quantidade de bactérias cariogénicas). Em relação à susceptibilidade do dente, temos também fatores intrínsecos, como o grau de mineralização do esmalte, tornando-o mais ou menos susceptível à erosão ácida, assim como a morfologia do mesmo, e fatores extrínsecos, tais como as características ambientais e locais (Lima, 2007; Pitts et al., 2011).

Outro fator de extrema importância é a dieta do indivíduo. Vários estudos relacionaram o consumo de hidratos de carbono fermentáveis, concretamente a sacarose, com uma maior prevalência de cárie, uma vez que os microorganismos responsáveis pela sua progressão, dependem deste composto para a sua atividade metabólica, através da qual produzem ácidos que promovem a desmineralização do esmalte e também para a síntese de glucanos e frutanos insolúveis, que participam na formação e adesão da placa às superfícies dentárias. No entanto, é importante referir que a desmineralização que ocorre após a ingestão de hidratos de carbono, ocorre durante um determinado período de tempo, cessando quando o pH volta a subir e a capacidade tampão a aumentar, promovendo a remineralização, estabelecendo um novo equilíbrio. A lesão de cárie dá-se quando a ingestão duma dieta cariogénica ocorre de forma contínua e frequente ao longo do tempo, ultrapassando a capacidade tampão da saliva, sendo um processo moroso. As alterações dos hábitos dietéticos, como a redução do consumo de hidratos de carbono e a inclusão de substitutos de açúcar (sorbitol, xilitol, etc) e alimentos com alto teor lipídico, proteico, mineral e vitamínico, todos considerados elementos cariostáticos, são de extrema importância na redução da incidência de cárie (Lima, 2007; Matthews, 2015).

Os microorganismos cariogénicos são também um fator primário, pois contribuem em grande parte na progressão da cárie, devido à sua habilidade em produzir glucanos extracelulares a partir da sacarose proveniente da dieta, assim como a sua capacidade em produzir ácidos (Lima, 2007). Quando ocorre a maturação do biofilme, a presença

de açúcares provenientes da dieta favorece uma maior cariogenicidade da placa, pois as bactérias utilizam estes compostos para ativar o seu metabolismo e consecutivamente produzir ácidos, mantendo o pH frequentemente abaixo dos valores críticos que levam à desmineralização do esmalte e da dentina. Um biofilme com pH ácido irá favorecer o crescimento de bactérias tolerantes a tais ambientes, tais como *Streptococcus mutans* e *Lactobacilos* (principais responsáveis pela progressão de cárie)(Cocco et al., 2017). Um $\text{pH} \leq 5,5$ é considerado crítico, pois com estes valores inicia-se o processo de desmineralização do esmalte dentário. Ao atingir o pH crítico, os íons de hidrogénio resultantes do metabolismo bacteriano, reagem com o grupo fosfato dos cristais de esmalte. O processo pode ser revertido, se o pH aumentar e houver presença de íons de fosfato e cálcio, dando origem à remineralização do esmalte, sobretudo em lesões de cárie iniciais (Esfahani, Mazaheri, & Pishevar, 2015).

Estes microrganismos possuem duas propriedades importantes na etiologia da cárie dentária: são acidogénicos (isto é, produzem ácidos a partir da fermentação dos hidratos de carbono provenientes da dieta) e são acidúricos (sobrevivem na presença de ácidos que foram formados na placa bacteriana). Ao contrário de outros microrganismos orais, estas propriedades permitem-lhes sobreviver no biofilme dentário (Garcia, Bulla, Kotaka, Tognim, & Cardoso, 2009). A perda de tecido mineralizado de forma progressiva e localizada nos dentes, ocorre devido ao metabolismo sacarolítico destas bactérias acidogénicas que fermentam a sacarose da dieta. Por este motivo, a contagem de microrganismos cariogénicos na saliva é essencial para determinar se o indivíduo tem alto risco de cárie ou não (S. Damle, Loomba, Dhindsa, Loomba, & Beniwal, 2016).

Apesar destes três fatores serem considerados determinantes para o desenvolvimento de cárie (fatores que contribuem diretamente para a cárie), esta não ocorre se não houver placa dentária. No entanto, a placa não é considerada um fator determinante, pois a sua formação na cavidade oral é fisiológica, e a sua presença não determina o surgimento da cárie. Para que a placa exerça potencial cariogénico, é necessária a presença de hidratos de carbono fermentáveis, que sejam ingeridos de forma frequente, para servirem de substrato ao metabolismo bacteriano que promove a produção de ácidos, que de forma contínua durante algum tempo, iniciam a lesão de cárie. Assim, a presença de placa é essencial para que ocorra cárie, mas não é

determinante. No entanto, mesmo que o indivíduo consuma açúcares frequentemente, sem uma placa rica em flora cariogénica, ocorre um certo grau de desmineralização, mas que por si só não é suficiente para provocar uma lesão cariosa, uma vez que sem a influência das bactérias cariogénicas para promover a sua progressão, a saliva volta a reequilibrar o processo de desmineralização/remineralização através da sua capacidade tamponante, interrompendo a desmineralização que ocorria até ao momento e iniciando-se remineralização (Lima, 2007).

Relativamente ao fator tempo (deve ser considerado um fator relativo da cárie), como já foi referido várias vezes, é importante quando houver presença de placa e a dieta do indivíduo for frequentemente cariogénica (rica em hidratos de carbono). Nestas condições, o tempo necessário para desenvolver uma lesão de cárie, será inversamente proporcional à frequência de ingestão de hidratos de carbono. Por este motivo, o controlo mecânico da placa através de escovagem, utilização de fio dentário e dentífricos fluoretados, é de extrema importância, pois permite à saliva voltar a exercer a sua capacidade tampão e reequilibrar os processos de desmineralização/remineralização (Lima, 2007).

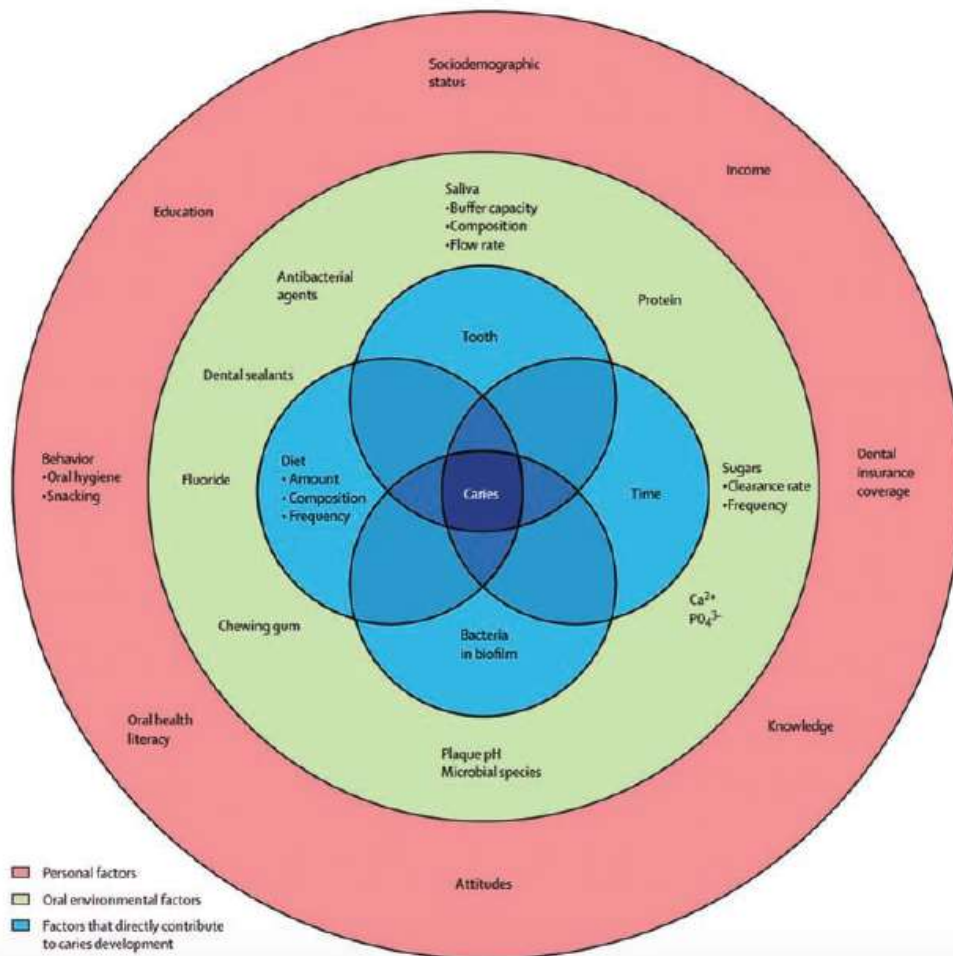


Figura 1 - Fatores envolvidos no desenvolvimento e progressão de cárie; adaptado de (Pitts et al., 2011)

Ainda que a prevalência da cárie tenha vindo a diminuir drasticamente nas últimas décadas, esta ainda prevalece, sendo considerada como um problema de saúde grave a nível mundial (Garcia, Bulla, Kotaka, Tognim, & Cardoso, 2009). A sua prevenção é mais importante que o seu tratamento, no entanto, a manutenção da higiene oral por si só, verificou-se não ser suficiente para evitar a formação de cárie, uma vez que esta é complexa e resultante da interação de todos os fatores mencionados anteriormente (Matthews, 2015).

Desta forma, a melhor abordagem perante a cárie seria a adoção de estratégias de prevenção, sobretudo em crianças e adolescentes (sendo importante alertar para o problema o mais cedo possível e educar a população jovem nesse sentido), instruindo

para uma boa higienização, cuidados a ter com a dieta, e visitas regulares ao médico dentista, no sentido de vigiar e ‘travar’ a progressão da cárie nos seus estádios mais iniciais, restabelecendo o equilíbrio entre desmineralização/remineralização, o mais precocemente possível (Esfahani et al., 2015).

Esta tese de investigação propõe-se a estudar os efeitos do xilitol sobre o pH, fluxo salivar, quantidade de *Streptococos mutans* e *Lactobacilos* e capacidade tampão da saliva, na presença ou ausência de CPP-ACFP, e a forma como influenciam os fatores predisponentes da cárie dentária.

1.2. Saliva

A saliva tem um papel fundamental, pois, tem na sua constituição enzimas que facilitam o início do processo digestivo, anticorpos e tem um efeito tampão, que permite que o pH se mantenha equilibrado e constante entre os valores 6,9-7,0 (Porcaro Bretas, Esteves Rocha, Sant'Ana Vieira, & Peres Rodrigues, 2008).

A saliva desempenha várias funções, como a lubrificação dos tecidos moles e duros da cavidade oral, participa na fala, deglutição e mastigação, e na produção da enzima amilase (Garcia et al., 2009). Na saliva encontra-se na forma de alfa-amilase, denominada ptialina, que a pH neutro ou ligeiramente alcalino, degrada parcialmente o amido, convertendo-o em maltose; esta enzima é produzida principalmente na glândula parótida.

A saliva é uma ‘mistura’ produzida por várias glândulas salivares e um pouco pelo fluido crevicular gengival, e circula constantemente na cavidade oral, atuando como uma solução de limpeza, lubrificante e tampão. Tem na sua constituição iões de cálcio e fosfato, muito importantes na remineralização do esmalte, sobretudo em lesões de cárie iniciais (Hegde & Thakkar, 2017). *In vivo*, este processo é lento, demorando pelo menos 3 semanas até ser considerado significativo (Nayak, Nayak, & Khandelwal, 2014).

A capacidade tampão e o fluxo salivar estão diretamente relacionados (Moreira Gomes Monteiro Montanuci, Ricci Volpato, Campos França, Herondina Coelho Ávila de Aguiar, & de Andrade Moreira Machado, 2013), pois o aumento do fluxo salivar promove a limpeza da cavidade oral, e aumenta a capacidade tampão, neutralizando o pH da placa bacteriana (Cocco et al., 2017).

A saliva estimulada tem maior concentração de iões cálcio e fosfato, que constituem parte da estrutura da hidroxiapatite, sendo que por esse motivo, possui maior capacidade de remineralização dos cristais de esmalte danificados, que a saliva não estimulada (Nayak et al., 2014).

Quando o pH desce do valor habitual de 7,0 e atinge o pH crítico (5,5) entre o biofilme e a superfície do esmalte, ocorre a desmineralização dos cristais de esmalte. Isto deve-se, porque em meio ácido, aumentam os iões de hidrogénio livres, que se difundem pelos poros do esmalte, atingindo os cristais de hidroxiapatite. Com o aumento da entrada de iões de hidrogénio, ocorre saída dos iões de cálcio e fosfato para a placa dentária, ocorrendo assim a desmineralização do esmalte. Esta perda de iões de cálcio e fosfato está relacionada com o metabolismo bacteriano que ocorre na presença de hidratos de carbono fermentáveis (Melo et al., 2015).

Graças à capacidade tamponante da saliva, o pH volta a subir para valores neutros novamente (7,0), ocorrendo as condições ideais para o processo de remineralização, no qual se dá um reequilíbrio da quantidade de iões de hidrogénio no biofilme e nos cristais de hidroxiapatite. Desta forma, os iões de cálcio e fosfato voltam a entrar passivamente da placa dentária para os cristais de hidroxiapatite. Quando ocorre a sua saturação na saliva e na placa, começa a remineralização (García-Godoy & Hicks, 2008).

É de salientar que o desenvolvimento das lesões de cárie se inicia quando a cavidade oral está frequentemente sujeita a um ambiente ácido e ao processo de desmineralização, de forma contínua ao longo do tempo. Com a ocorrência frequente e repetitiva deste processo, a capacidade tamponante da saliva acaba por ser ultrapassada, iniciando-se as lesões iniciais de cárie, chamadas de white spots (Melo et al., 2015). O equilíbrio dos processos de remineralização/desmineralização, é a chave para prevenir e tratar a doença de cárie (Pinheiro, Azenha, Araujo, & Puppim, 2017).

Para além da sua capacidade tamponante, a saliva possui atividade antibacteriana graças às enzimas que a constituem, tais como a lisozima, a lactoferrina e a lactoperoxidase (conhecidas como LLL). A primeira tem capacidade de digerir o peptidoglicano da parede celular bacteriana; a segunda tem um papel regulador na incidência de cárie; a última reduz a quantidade de ferro disponível para os microrganismos patogénicos, conferindo tanto atividade bacteriostática como bactericida (Pinheiro et al., 2017).

O fluxo salivar é também um fator importante a ter conta, pois quanto mais elevado for, maior será a capacidade de ‘clearance’ na cavidade oral assim como contribui para prevenir a formação de cárie. Esta permite que haja uma limpeza natural da cavidade oral, impedindo a acumulação de placa bacteriana nas superfícies dentárias. O fluxo diminui com a idade, afetando mais o sexo feminino que o masculino, o que constitui um fator de risco importante para a cárie dentária. Os tecidos moles desidratam ficando mais susceptíveis a agressões, e facilitando a colonização bacteriana, o que pode levar a infeções fúngicas, úlceras, inflamação da mucosa, etc. Vários estudos demonstraram que qualquer pastilha, independentemente de conter açúcar ou não (ainda que o açúcar não seja aconselhado pois é um dos fatores de risco para a cárie), estimula igualmente o fluxo salivar, sendo uma opção bastante fácil e acessível à população em geral (Gueimonde et al., 2016).

Neste estudo foram utilizadas pastilhas elásticas com xilitol e pastilhas de parafina estéreis para comparar quais os seus efeitos, não só a nível do fluxo salivar, como também da capacidade tampão, pH e densidade de UFC de lactobacilos e estreptococos mutans.

1.3. Estreptococos Mutans e Lactobacilos

Os estreptococos do grupo mutans são considerados um dos principais agentes etiológicos da lesão de cárie. A sua colonização está dependente da erupção dentária, uma vez que necessitam de superfícies duras e lisas (não descamativas) para se desenvolverem (Nakano, Nomura, Nakagawa, Hamada, & Ooshima, 2005).

São cocos imóveis, catalase-negativos e gram-positivos. Formam cadeias curtas ou intermédias. Quando há sacarose disponível no meio, estes microrganismos apresentam cápsulas de glicano, pelo que conseguem produzir polissacarídeos extracelulares (Nakano et al., 2005).

Como já foi referido, o seu potencial cariogénico deve-se às suas características: por um lado por serem acidogénicos, e por outro porque são acidúricos. Estas promovem a formação de placa dentária assim como de polissacarídeos intracelulares (que permitem a continuidade da produção de ácidos mesmo na ausência de sacarose) e polissacarídeos extracelulares (que contribuem para a formação de placa bacteriana e sua consolidação) (Nakano et al., 2005). A sua produção de ácidos, nomeadamente ácido láctico, resultante do metabolismo dos hidratos de carbono fermentáveis, leva a uma diminuição do pH, ativando metaloproteínases que dissolvem a matriz extracelular da fase orgânica da dentina, levando à progressão da lesão. As toxinas libertadas durante o processo cariogénico, difundem-se no esmalte, levando a reações bioquímicas na dentina, provocando a perda de minerais e alterando a sua matriz (Pinheiro et al., 2017).

Assim, se os níveis de estreptococos mutans aumentarem, aumenta também a acumulação de placa, o que aumenta o risco de cárie. Devido a este facto, o controlo da quantidade deste microrganismo é um importante fator a ter em conta na prevenção e controlo da cárie dentária (Syed & Shafi, 2017).

Os lactobacilos também estão fortemente associados à cárie dentária. À semelhança dos estreptococos mutans, estes microrganismos também produzem ácidos (sobretudo ácido láctico) a partir do metabolismo da sacarose (são acidogénicos), baixando o pH da cavidade oral, tornando o ambiente inóspito para os microrganismos competitivos, mas persistindo nestas condições adversas (são

acidúricos), sobretudo no esmalte e nas raízes dos dentes. Origina muitas vezes a formação de cáries da raíz, cujo processo está altamente relacionado com a sua associação aos estreptococos mutans. Os lactobacilos proliferam habitualmente no biofilme resultante das lesões de cárie, ou seja, a sua colonização ocorre quando temos lesões de pré-cárie ou cáries já existentes (ao contrário dos estreptococos mutans, que existem tanto em zonas com ou sem atividade de cárie). No entanto, a sua proliferação está dependente de três fatores essenciais: existência de um nicho retentivo, pH baixo/ambiente anaeróbio, e por último, um substrato rico em hidratos de carbono. Se estes microrganismos forem elevados no meio oral, isto é um forte indicador de que a dieta do indivíduo é rica em hidratos de carbono, assim como também traduz, uma elevada atividade de cárie, sendo que nestes indivíduos se verificará um elevado número de cáries (Neves et al., 2001). No entanto, têm dificuldade em subsistir e em desenvolver-se por si só na placa dentária, ao contrário dos estreptococos mutans, estando dependentes destes para proliferar, conseguindo ser predominantes na sua presença. Em circunstâncias cariogénicas, os estreptococos mutans têm um papel determinante neste processo, pois são eles os colonizadores iniciais das superfícies dentárias, que ‘criam’ o nicho retentivo necessário à acumulação e proliferação dos lactobacilos (Caufield, Schön, Saraithong, Li, & Argimón, 2015).

Munson e Chhour (2005), demonstraram que as bactérias predominantes em indivíduos com lesões de cárie profundas e avançadas eram os estreptococos mutans e os lactobacilos. Foi também relatado num outro estudo que a associação destes dois microrganismos era muito frequente no processo de desenvolvimento da cárie e sua progressão (Peterson et al., 2013).

Devido às propriedades dos lactobacilos serem muito semelhantes às do estreptococos mutans, e serem também um dos principais responsáveis pela progressão da cárie dentária, a determinação da sua densidade de UFC, foi também relevante de forma a avaliar se houve ou não diferenças significativas na presença ou ausência de xilitol (Pinheiro et al., 2017).

1.4. CPP-ACP (Fosfopeptídeo de Caseína Fosfato de Cálcio Amorfo) e CPP-ACFP (Fosfopeptídeo de Caseína Fosfato de Cálcio Amorfo e Flúor)

O CPP-ACP é um produto anticariogénico, derivado do leite, com propriedades remineralizadoras. O fosfato de cálcio amorfo (ACP) une-se ao esmalte dentário através da ajuda da caseína fosfopeptídea (CPP), que por sua vez contribui para a diminuição dos níveis de estreptococos mutans, ao integrar-se no biofilme (Farooq, Moheet, Imran, & Farooq, 2013).

O CPP é um péptido que tem a capacidade de se unir ao cálcio, transformando o fosfato de cálcio em fosfato de cálcio amorfo, uma substância mais estável. Para além de estabilizar o cálcio e o fosfato numa solução, o CPP-ACP também ajuda no tamponamento do pH da placa, aumentando os níveis de cálcio e fosfato na placa supragengival. A elevada concentração de cálcio e fosfato em lesões de superfície do esmalte, resulta na sua remineralização (Farooq et al., 2013).

O complexo CPP-ACP pode ser encontrado em pastas dentífricas, pastilhas elásticas e colutórios. Quando presente em pastas dentífricas, o CPP-ACP ajuda a reduzir a sensibilidade dentária, pois consegue unir-se aos túbulos dentinários, bloqueando-os (Farooq et al., 2013).

Diversos estudos *in vitro* realizados com esmalte bovino nos últimos anos, permitiram concluir que as pastas contendo CPP-ACP preveniam a desmineralização do esmalte, assim como ainda promoviam a remineralização do mesmo, ao contrário das pastas sem CPP-ACP (Farooq et al., 2013).

Em 2007 foi realizado um estudo *in vitro* com esmalte humano (Rahiotis Christos, 2007) no qual também se chegou à conclusão do elevado potencial de remineralização do CPP-ACP.

Mais recentemente realizou-se um estudo *in vitro* no qual se pretendia comparar o potencial de remineralização de pastas contendo flúor, com as que continham apenas CPP-ACP. Os resultados permitiram concluir que a forma mais eficaz de promover a remineralização seria a associação de ambos (Farooq et al., 2013).

Ao formar nanocomplexos de cálcio e fosfato na superfície dentária, estes compostos promovem a remineralização dentária. Apesar de insolúveis, na presença

de fosfolípidos de caseína, estes complexos tornam-se solúveis, transformando-se em fosfato de cálcio amorfo estável, que por sua vez, permite a migração de íões de cálcio e fosfato através da camada porosa das lesões de cárie iniciais (*white spots*), remineralizando os cristais de esmalte. Também tem capacidade de se transformar em hidroxiapatite, que ao ser depositada na superfície dentária também promove a remineralização (Esfahani et al., 2015).

Este composto aumenta as concentrações de cálcio e fosfato disponíveis mas não as de flúor, sendo que a solução seria aplicar um produto semelhante a um verniz de flúor simultaneamente, para potencializar o processo de remineralização ao máximo (Farooq et al., 2013).

Uma vez que o CPP-ACP é um derivado do leite, este não pode ser administrado em pacientes intolerantes à lactose, o que é um inconveniente deste composto, pois seria necessário desenvolver uma alternativa ao mesmo (Farooq et al., 2013). No entanto, apresenta como vantagem, ser seguro em caso de deglutição, independentemente da dose deglutida (Esfahani et al., 2015).

Neste estudo, foi utilizada uma pasta contendo CPP-ACFP, da marca GC MI™ & Paste Plus™ com sabor a menta. Uma vez que em Portugal não são comercializadas estas pastas, este produto foi encomendado de Espanha.



Figura 2 - Pasta Dentífrica de CPP-ACFP da marca GC MI Paste Plus®

1.5. Xilitol

O xilitol é um poliol de 5 carbonos (pentose) derivado do açúcar xilose, anticariogénico. Tem capacidade de reduzir a quantidade de estreptococos mutans, sendo que não é fermentado por este microrganismo, assim como reduz também a placa bacteriana (Salli, Gürsoy, Söderling, & Ouwehand, 2017).

É um adoçante substituto do açúcar muito utilizado atualmente em pastilhas elásticas, tendo como principal indicação a sua utilização entre refeições, uma vez que não é metabolizado pelas bactérias patogénicas da flora oral e não baixa o pH do biofilme (Syed & Shafi, 2017).

O xilitol tem propriedades antibacterianas, pois inibe o desenvolvimento de estreptococos mutans assim como a formação de placa dentária (Salli et al., 2017).

Os níveis de *Streptococcus mutans* na placa e na saliva são reduzidos pelo xilitol, uma vez que o mesmo reduz a capacidade de adesão dos microrganismos à superfície dentária assim como também diminui a sua produção de ácidos (Nayak et al., 2014).

Consegue penetrar no citoplasma bacteriano, onde é acumulado sob a forma de xilitol 5-fosfato, diminuindo a produção de glucose e adenosina trifosfato (ATP), o que por sua vez reduz ou atrasa a reprodução e o desenvolvimento celular (Syed & Shafi, 2017).

Resumidamente, o mecanismo de ação do xilitol consiste em interromper o processo de glicólise que ocorre no interior das células bacterianas, levando ao ‘desprendimento’ da placa bacteriana e controlando assim o seu desenvolvimento. No entanto para que exerça um efeito significativo nos níveis de estreptococos mutans, é necessário consumir de forma frequente e contínua, pastilhas elásticas que contenham este composto (Syed & Shafi, 2017).

Diversos ensaios clínicos realizados, permitiram também concluir que o consumo regular de xilitol permite uma selecção de estirpes de *Streptococcus mutans* menos agressivas e com reduzida adesividade ao tecido dentário (Ribelles, Guinot, Mayné, & Bellet, 2010).

Foi demonstrado também num outro estudo, que o consumo de xilitol diminui a produção de polissacarídeos pelos *Streptococcus mutans* (Söderling, 2009).

Utilizadores regulares de xilitol contêm menos polissacarídeos insolúveis na sua placa bacteriana, ao contrário dos que não têm o hábito de consumir xilitol (Mäkinen, 2009).

No entanto, outros estudos concluíram que a densidade de UFC de estreptococos mutans, ainda que reduzisse na presença do xilitol, não persistia a longo prazo. Ainda assim, a grande maioria dos autores concorda que o xilitol tem a capacidade de diminuir os níveis de estreptococos mutans, e, como tal, deveria ser incluído como um método de prevenção de cáries, sobretudo em crianças (Syed & Shafi, 2017).

Para além deste poliol reduzir a capacidade das bactérias se multiplicarem, controlando assim os números de estreptococos mutans, outra hipótese sugerida para o xilitol diminuir a incidência de cárie, é a sua capacidade de remineralizar o esmalte. O xilitol transporta iões de cálcio formando complexos com os mesmos, inibindo a deslocação dos iões de cálcio e fosfato para o exterior, o que levaria à desmineralização dentária. (Arianto, Triaminingsih, Asada, & Saeki, 2016).

Num estudo realizado, no qual se comparou vários vernizes, uns contendo xilitol e outros flúor, concluiu-se que o verniz que demonstrou maior capacidade remineralizadora, foi o verniz com maior conteúdo de xilitol (20% de xilitol). Desta forma, considerou-se que os vernizes de xilitol parecem ser uma alternativa promissora no futuro, pois demonstrou ter uma ótima capacidade remineralizadora de lesões de cárie *in situ* (Cardoso et al., 2016).

No entanto, apesar de vários autores concordarem que o xilitol apresenta capacidade remineralizadora, num outro estudo, onde foram comparados um verniz contendo CPP-ACP e outro xilitol, concluí-se que o verniz com CPP-ACP tem maior potencial de remineralização que o verniz com xilitol (Esfahani et al., 2015).

Neste estudo foram utilizadas pastilhas elásticas com xilitol da marca Trident®, comercializadas no mercado português.



Figura 3 - Pastilhas elásticas com xilitol marca Trident®

1.6. Objetivos e Hipóteses do Estudo

1.6.1. Objetivos do Estudo

Este estudo teve como objetivos medir e comparar a variação da taxa de fluxo salivar, pH, capacidade tampão e contagem de *Streptococos mutans* e *Lactobacilos*, mastigando um *pellet* de parafina ou uma pastilha elástica com xilitol, com e sem uma pasta de CPP-ACFP.

1.6.2. Hipóteses do Estudo

As hipóteses de estudo são:

- Não existem diferenças significativas no pH da saliva, capacidade tampão e contagem de *Streptococos mutans* e *Lactobacilos* após a mastigação de um *pellet* de parafina ou uma pastilha elástica com xilitol;
- Não existem diferenças significativas no pH da saliva, capacidade tampão e contagem de *Streptococos mutans* e *Lactobacilos* após a mastigação com um *pellet* de parafina ou uma pastilha elástica com xilitol e ambos associados à aplicação de CPP-ACFP;
- Existem diferenças significativas no pH da saliva, capacidade tampão e contagem de *Streptococos mutans* e *Lactobacilos* após a mastigação com um *pellet* de parafina ou uma pastilha elástica com xilitol e ambos associados à aplicação de CPP-ACFP;

2 – MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Grupo de Estudo

A amostra utilizada neste estudo foi de 60 indivíduos saudáveis entre 13 e os 24 anos. O estudo foi feito na Clínica Universitária do ISCSEM. Foram entregues consentimentos informados a todos os participantes (no caso de menores o mesmo foi assinado pelos encarregados de educação), onde foi explicada que a sua participação seria voluntária e não invasiva, assim como foi ainda fornecido um texto informativo em anexo, para dar a conhecer melhor o projeto e esclarecer eventuais dúvidas.

A amostra foi dividida em quatro grupos de estudo com 15 elementos cada:

Grupo A - indivíduos que mastigaram uma pastilha elástica com xilitol da *Trident®*, de venda no mercado português.

Grupo B - indivíduos que mastigaram uma pastilha elástica com xilitol da *Trident®*, de venda no mercado português e que simultaneamente aplicaram uma pasta de CPP-ACFP da *GC MI™ & Paste Plus™*.

Grupo C - indivíduos que mastigaram um pellet de parafina.

Grupo D - indivíduos que mastigaram um pellet de parafina e que simultaneamente aplicaram uma pasta de CPP-ACFP da *GC MI™ & Paste Plus™*.

2.2. Considerações Éticas

O projecto, assim como os consentimentos e textos informativos foram aprovados pela Comissão de Ética para a Saúde da Cooperativa de Ensino Superior Egas Moniz. Todos os participantes intervenientes no estudo, autorizaram a recolha de saliva, assim como de alguns dados clínicos ou não clínicos, tendo assinado o consentimento que lhes foi previamente entregue e lido o texto informativo em anexo, sendo que a sua participação foi totalmente voluntária.

2.3. Recolha de Dados e Material

A recolha de dados foi feita na Clínica Dentária Egas Moniz entre Maio e Julho de 2017, com a autorização da Direção Clínica. O material utilizado para a recolha de saliva é todo descartável, à exceção da pasta de CPP-ACFP utilizada (da marca *GC*

MI™ & *Paste Plus*™ com sabor a menta), tendo sido usados copos de plástico, kits *CRT*® *bacteria* e *CRT*® *buffer* da Ivoclar Vivadent, e seringas graduadas de plástico. A nível laboratorial usou-se uma estufa, *Memmert INE 400* (para incubar o teste *CRT*® *bacteria*) e um elétrodo de pH (*Basic20 – Crison*) para medir o pH da saliva.

Após selecionar os indivíduos de acordo com a aceitação da amostra, foi preenchido o consentimento informado e entregue o texto informativo em anexo. Primeiramente fez-se uma breve recolha de dados do paciente (nome, idade, número de processo, data da recolha e grupo) para facilitar o tratamento estatístico dos mesmos, sendo que todos os dados recolhidos foram mantidos anónimos. Seguidamente, foi fornecida uma pastilha elástica com xilitol, de venda no mercado português, (da marca *Trident*® com sabor a menta) aos grupos A e B, e os pacientes foram instruídos a mastigarem a pastilha durante 5 minutos, passando por todas as superfícies dos dentes, deixando escorrer a saliva de forma passiva para um copo de plástico fornecido. No grupo B, antes da mastigação da pastilha elástica e recolha de saliva estimulada, os pacientes foram instruídos a aplicar uma pasta de CPP-ACFP no dedo, e a realizar movimentos de escovagem, passando por todas as superfícies e utilizando a língua para ajudar a espalhar a mesma, durante 3 minutos; seguidamente procedeu-se à mastigação da pastilha e recolha da saliva; Nos grupos C e D foi fornecida uma pastilha de parafina, também mastigada durante 5 minutos, à medida que se fazia recolha de saliva estimulada. No grupo D, à semelhança do grupo B, foi aplicada uma pasta de CPP-ACFP, onde os pacientes foram instruídos a fazer movimentos de escovagem com o dedo, passando por todas as superfícies e alternando com a língua de forma a espalhar melhor a pasta, durante 3 minutos, após os quais se forneceu a pastilha de parafina para posterior recolha de saliva. Após recolher a saliva pelo método convencional, foi medido o fluxo salivar com uma seringa de plástico graduada e mediu-se o pH com o elétrodo no laboratório, devidamente calibrado; seguidamente determinou-se a capacidade tampão, através do kit *CRT*® *buffer*, colocando uma gota de saliva na zona de teste, na extremidade da tira fornecida pelo kit. Aguardaram-se 5 minutos pelos resultados. De acordo com as instruções do fabricante os resultados poderiam ser três: azul (elevada capacidade tampão, pH ≥ 6), verde (capacidade média, pH entre 4,5 e 5,5) e amarelo (capacidade baixa, pH = 4) (Paiva, Ferreira, & Pessoa, 2009).

Por último, foi aplicado o teste *CRT® bacteria* (para medir as unidades formadoras de colónias de *Streptococcus mutans*; este kit apresenta um dispositivo central com dois meios de cultivo, um verde (de Rogosa-agar) que permite o cultivo de *Lactobacilos*, e um azul no lado inverso (de Mitis-salivarius-bacitracina-agar) para o cultivo de *Streptococcus mutans*. Remove-se o plástico protetor dos dois meios de cultivo e com uma pipeta de plástico (incluída no kit) escorre-se a saliva nos mesmos; os tubos foram fechados com os respetivos meios de cultivo e identificados com o nome do paciente, tendo sido inseridos numa estufa a 37°C (temperatura ótima para o crescimento de *Streptococcus mutans*) durante 48h, após as quais se procedeu à contagem de colónias de cada espécie (os resultados foram comparados à tabela presente nas instruções do fabricante, sendo que esta foi uma avaliação qualitativa).

2.4. Análise Estatística

Os dados recolhidos da amostra foram inseridos numa folha de cálculo do software *Microsoft® Excel® for Mac* versão 14.2.0, e inseridos no *SPSS® (IBM®)* versão 24.0, onde foi efetuada uma análise estatística e descritiva.

Os dados foram organizados por grupos e a cada um foi atribuído um dígito (Grupo A=1; B=2; C=3; D=4) e foram inseridos os valores de pH obtidos em cada grupo.

Foram realizados testes paramétricos one-way ANOVA de forma a comparar as médias de pH dos 4 grupos, testes robustos de igualdade de médias e testes Post-hoc, para determinar qual a média significativamente diferente das restantes.

Para compararmos o fluxo salivar, capacidade tampão e UFC de estreptococos mutans e lactobacilos (variáveis qualitativas nominais) foi utilizado um teste não paramétrico, o teste de qui-quadrado, cujas condições exigidas apenas se verificaram na densidade de UFC de estreptococos mutans, sendo que me baseei apenas nas percentagens ou estatísticas descritivas evidentes, para avaliar as restantes variáveis.

3 – RESULTADOS

3.1. pH

1. Tabela Testes de Normalidade

Grupo	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk			
	Estatística	gl	Sig.	Estatística	gl	Sig.	
pH	A	,406	15	,000	,638	15	,000
	B	,238	15	,022	,793	15	,003
	C	,212	15	,067	,890	15	,067
	D	,440	15	,000	,395	15	,000

Tabela 1 - Testes de Normalidade da média de pH

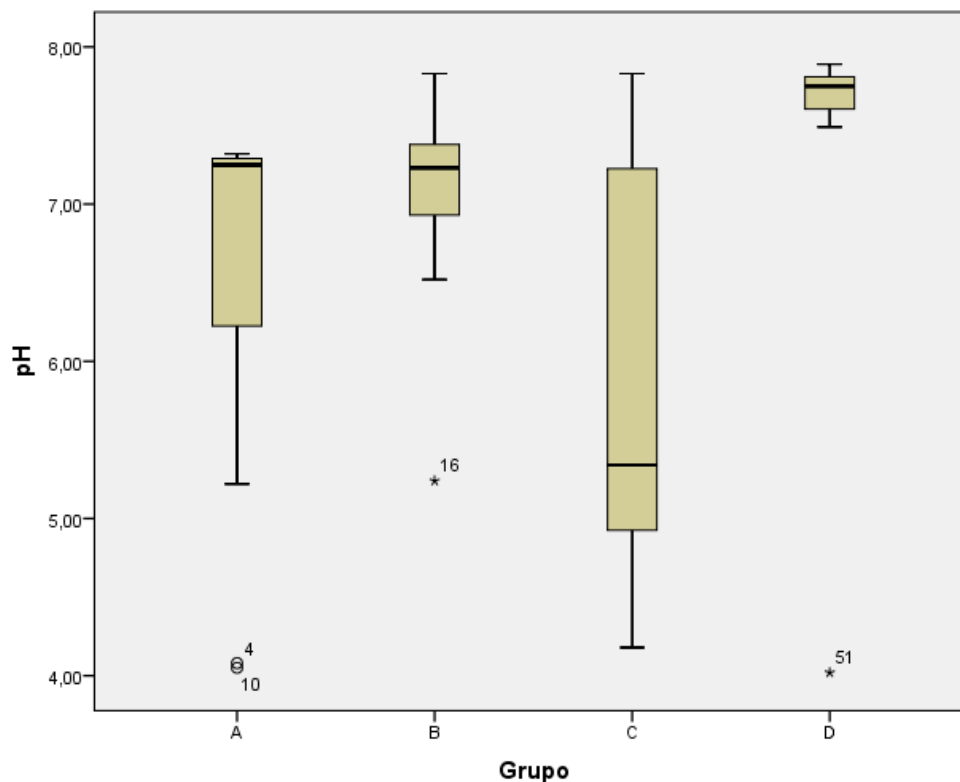


Figura 4 - Gráfico de média de pH com outliers

Quando se pretende comparar uma variável quantitativa (dependente, neste caso o pH da saliva estimulada) e se pretende comparar a média de dois ou mais grupos populacionais independentes definidos por uma variável qualitativa (independente ou fator) aplica-se o teste paramétrico One-Way ANOVA.

Os testes paramétricos exigem que se verifiquem simultaneamente alguns pressupostos, nomeadamente, que a variável dependente possua distribuição normal e que as variâncias dos grupos sejam homogénias.

Pela análise da tabela 1, é possível verificar-se que existem evidências estatisticamente significativas para se afirmar que o pH nos grupos A (SW=0,638; p=0,000), B (SW=0,793; p=0,003) e D (SW=0,395; p=0,000) não segue uma distribuição normal (utiliza-se o teste de Shapiro-Wilk por se tratar de amostras de pequena dimensão $n < 30$).

Verifica-se pela análise do gráfico 4 que nos grupos em questão existem quatro observações outliers, pelo que se procedeu à sua eliminação (4, 10, 16 e 51).

Testes de Normalidade							
Grupo	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk			
	Estatística	gl	Sig.	Estatística	gl	Sig.	
pH	A	,434	13	,000	,515	13	,000
	B	,142	14	,200*	,978	14	,962
	C	,212	15	,067	,890	15	,067
	D	,167	14	,200*	,929	14	,292

Tabela 2 - Novo teste de normalidade da média de pH

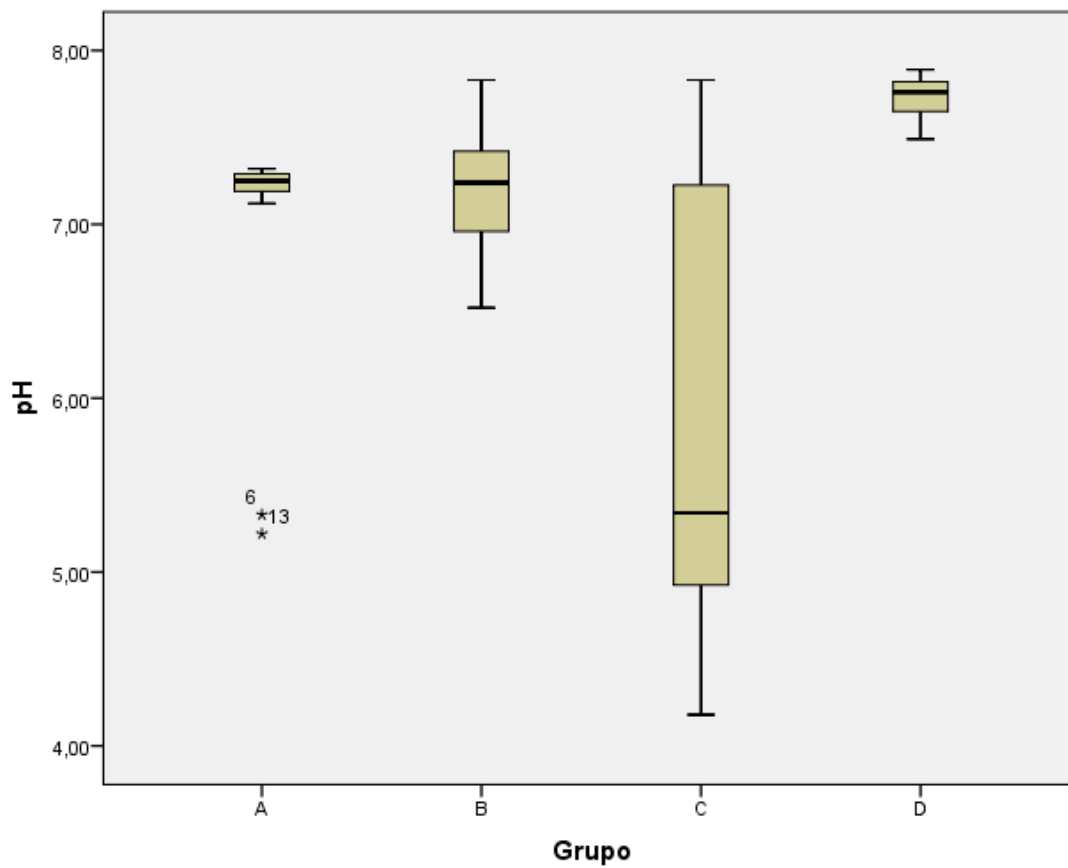


Figura 5 - Gráfico das médias de pH ainda com outliers

Após a eliminação dos quatro outliers identificados anteriormente, efetuou-se nova análise exploratória de dados verificando-se pelo gráfico anterior que são identificadas duas novas observações com valores atípicos (outliers).

Na tabela 2, é possível verificar-se que existem evidências estatisticamente significativas para se afirmar que a média de pH do grupo A (SW=0,515; p=0,000) não segue uma distribuição normal.

Procedeu-se à eliminação das duas observações.

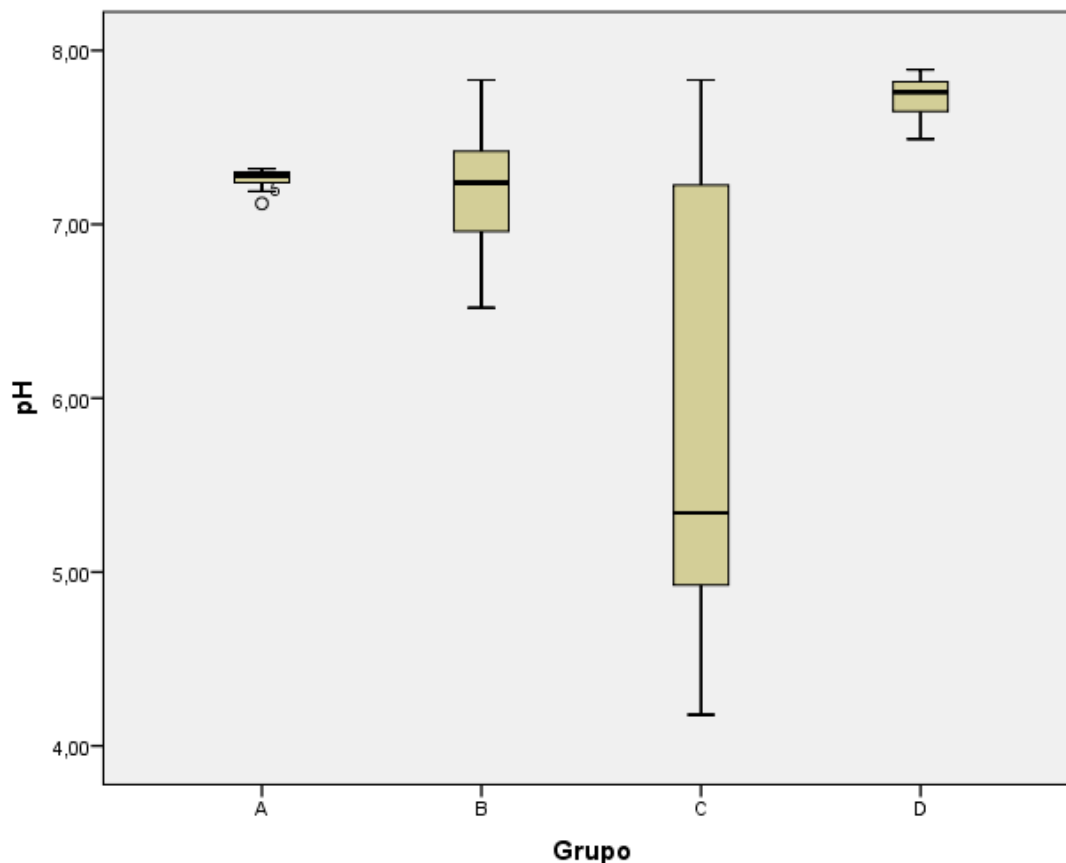


Figura 6 - Gráfico de média de pH após eliminação de outliers

pH	Grupo	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estatística	gl	Sig.	Estatística	gl	Sig.
	A	,179	11	,200*	,881	11	,106
	B	,142	14	,200*	,978	14	,962
	C	,212	15	,067	,890	15	,067
	D	,167	14	,200*	,929	14	,292

Tabela 3 - Testes de Normalidade das médias de pH após remoção de outliers

Pela análise da tabela 3, pode-se verificar que não existem evidências estatisticamente significativas para se afirmar que o pH nos grupos A (SW=0,881; p=0,106), B (SW=0,978; p=0,962), C (SW=0,890; p=0,067) e D (SW=0,929; p=0,292), não segue uma distribuição normal, pelo que se assume que o pH é normalmente distribuído.

Relativamente ao pH foi-nos possível observar que os valores mais elevados (alcalinos) foram observados no grupo D (indivíduos que mastigaram uma pastilha de parafina e que simultaneamente aplicaram uma pasta de CPP-ACFP).

Nos grupos A (indivíduos que mastigaram uma pastilha elástica com xilitol) e B (indivíduos que mastigaram uma pastilha elástica com xilitol e que simultaneamente aplicaram uma pasta de CPP-ACFP) os valores de pH foram muito semelhantes, tendo havido poucas variações nestes indivíduos, apesar das diferentes condições apresentadas.

Já no grupo C (indivíduos que só mastigaram uma pastilha de parafina), foi onde se observaram as maiores variações de pH, com valores tanto no intervalo ácido como alcalino.

Teste de Homogeneidade de Variâncias

pH

Estatística de Levene	gl1	gl2	Sig.
40,589	3	50	,000

Tabela 4 - Teste de Levene para verificação do pressuposto da homogeneidade de variâncias

Teste de Homogeneidade de Variâncias

	N	Média ± Desvio-Padrão	Valor mínimo - máximo
A	11	7,25 ± 0,06	7,12 – 7,32
B	14	7,22 ± 0,33	6,52 – 7,83
C	15	5,84 ± 1,25	4,18 – 7,83
D	14	7,72 ± 0,12	7,49 – 7,89

pH

Tabela 5 - Número de indivíduos por amostra após exclusão dos outliers, médio, desvio padrão e valor mínimo e máximo de pH de cada grupo

Para a verificação do pressuposto da homogeneidade de variâncias, realizou-se o teste de Levene, concluindo-se que se rejeita a hipótese nula das variâncias serem iguais (Levene=40,589; $p=0,000$), pela análise do desvio padrão dos grupos, anteviam-se problemas, pois o grupo C apresenta um desvio padrão mais de vinte vezes superior ao grupo A.

Quando este pressuposto não é válido, também não é válido o resultado do teste F utilizado pela ANOVA, pelo que se recorreu ao teste robusto de igualdade de médias de Brown-Forsythe.

Testes Robustos de Igualdade de Médias

pH

	Estatística ^a	gl1	gl2	Sig.
Brown-Forsythe	23,515	3	16,405	,000

Tabela 6 - Testes Robustos de Igualdade de médias de Brown-Forsynth

Pela análise da tabela 6, podemos verificar que o resultado do teste ($F=23,515$; $p=0,000$) nos leva a rejeitar a hipótese de igualdade de médias, pelo que podemos concluir que existe pelo menos uma média que é significativamente diferente das restantes.

Uma vez que este teste não nos indica quais são os pares de médias diferentes, aplicaram-se testes post-hoc, neste caso o teste post-hoc de Tamhane's utilizado quando as variâncias são diferentes.

Comparações múltiplas

Variável dependente: pH

Tamhane

(I) Grupo	(J) Grupo	Diferença média	Erro Padrão	Sig.	Intervalo de Confiança 95%	
		(I-J)			Limite inferior	Limite superior
A	B	,03838	,09114	,999	-,2400	,3168
	C	1,42176*	,32388	,004	,4323	2,4112
	D	-,46091*	,03800	,000	-,5719	-,3499
B	A	-,03838	,09114	,999	-,3168	,2400
	C	1,38338*	,33544	,005	,3786	2,3881
	D	-,49929*	,09523	,000	-,7835	-,2150
C	A	-1,42176*	,32388	,004	-2,4112	-,4323
	B	-1,38338*	,33544	,005	-2,3881	-,3786
	D	-1,88267*	,32506	,000	-2,8734	-,8919
D	A	,46091*	,03800	,000	,3499	,5719
	B	,49929*	,09523	,000	,2150	,7835
	C	1,88267*	,32506	,000	,8919	2,8734

Tabela 7 - Teste Post-hoc de Tamhane's para comparar as médias de pH entre grupos

Pela observação da tabela anterior, podemos concluir que não existem evidências estatísticas para afirmar que a média dos valores de pH sejam diferentes ($p=0,999$) nos grupos A e B, onde de facto as médias são muito semelhantes ($A=7,25$; $B=7,22$).

Por sua vez, para os grupos C e D, podemos concluir que existem evidências estatisticamente significativas, uma vez que ambos apresentam médias diferentes entre si, e em relação aos restantes grupos ($p<0,05$).

Podemos concluir que os grupos que mastigaram pastilha elástica com xilitol apresentam valores médios de pH semelhantes entre si, e diferentes dos indivíduos que mastigaram pastilha de parafina.

O grupo que mastigou apenas pastilha de parafina (grupo C) apresenta valores médios de pH estatisticamente diferentes dos grupos que mastigaram pastilha elástica com xilitol (grupos A e B) e do grupo que mastigou pastilha de parafina e que aplicou a pasta de CPP-ACFP (grupo D).

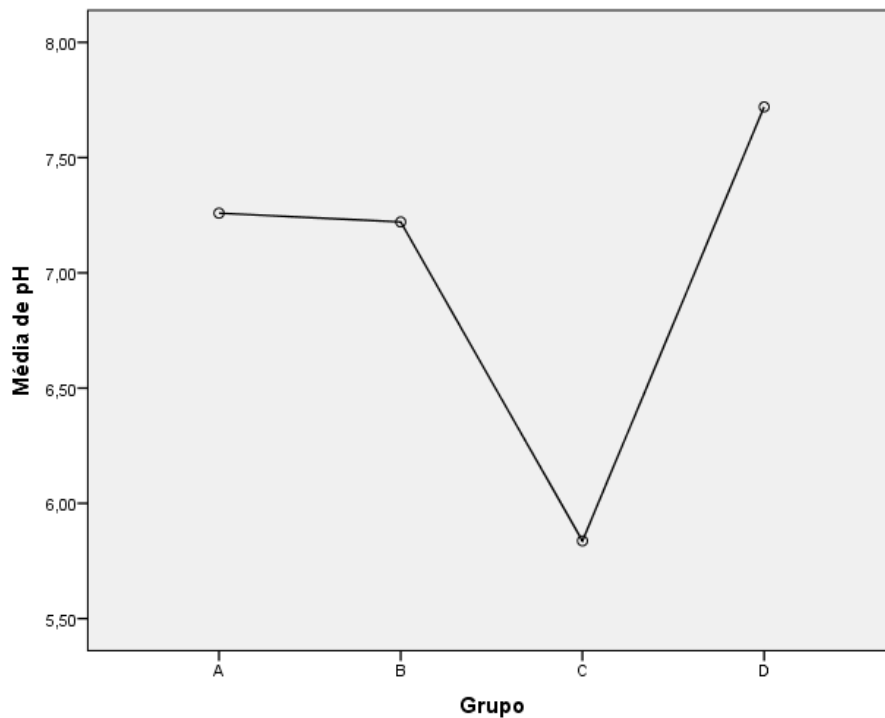


Figura 7 - Gráfico ilustrativo das médias de pH de cada grupo

Pela observação da tabela 7 onde nos é possível comparar as médias de pH entre grupos, podemos concluir que o grupo cuja média se destacou dos quatro, foi o grupo C, onde o seu valor foi bastante inferior em relação às médias dos grupos A, B e D.

O mesmo verificou-se através da observação do gráfico da figura 7, onde o grupo C alcançou a média mais baixa de todos. As médias dos grupos A, B e D foram entre 7,22 e 7,72, pelo que tiveram um intervalo alcalino semelhante, enquanto que a média do grupo C foi bastante inferior com o valor de 5,84 já num intervalo considerado ácido.

Para compararmos a variação do fluxo salivar, capacidade tampão e densidade de UFC de *Streptococcus mutans* e *Lactobacilos*, foram feitas tabelas cruzadas entre os 4 grupos.

Realizou-se o teste de Qui-Quadrado para determinar se houve semelhanças significativas no comportamento das variáveis descritas acima entre os 4 grupos ou não.

O teste de independência do Qui-Quadrado é um teste não paramétrico que se utiliza quando se pretende testar se duas variáveis qualitativas nominais são independentes.

Este teste tem como base a análise da tabela que relaciona as duas variáveis, denominada por tabela de contingência.

Deve verificar-se nesta tabela se existe em alguma das células o valor zero, pois nenhuma célula pode ter valor inferior à unidade. Caso tal suceda o teste Qui-Quadrado não é válido.

Outra condição que o teste exige é não existir mais de 20% das células com frequência inferior a cinco, neste caso analisa-se o valor exato do teste.

Não foi possível tirar conclusões sobre o fluxo salivar, capacidade tampão e densidade de UFC de Lactobacilos, devido ao tamanho da amostra ser demasiado pequeno em termos estatísticos, pelo que me baseei nas percentagens ou estatísticas descritivas evidentes.

3.2. Fluxo Salivar

		Fluxo salivar		Total
		Normal	Baixo	
Grupo A	Contagem	15	0	15
	% em Grupo	100,0%	0,0%	100,0%
	% em Fluxo salivar	32,6%	0,0%	25,0%
	% do Total	25,0%	0,0%	25,0%
B	Contagem	10	5	15
	% em Grupo	66,7%	33,3%	100,0%
	% em Fluxo salivar	21,7%	35,7%	25,0%
	% do Total	16,7%	8,3%	25,0%
C	Contagem	8	7	15
	% em Grupo	53,3%	46,7%	100,0%
	% em Fluxo salivar	17,4%	50,0%	25,0%
	% do Total	13,3%	11,7%	25,0%
D	Contagem	13	2	15
	% em Grupo	86,7%	13,3%	100,0%
	% em Fluxo salivar	28,3%	14,3%	25,0%
	% do Total	21,7%	3,3%	25,0%

Tabela 8 – Número de indivíduos que tinham fluxo salivar normal ou baixo por grupo

Na tabela 8 relativa ao fluxo salivar, nenhuma das condições impostas pelo teste do Qui-Quadrado é satisfeita, pelo que neste caso nos iremos basear na análise gráfica.

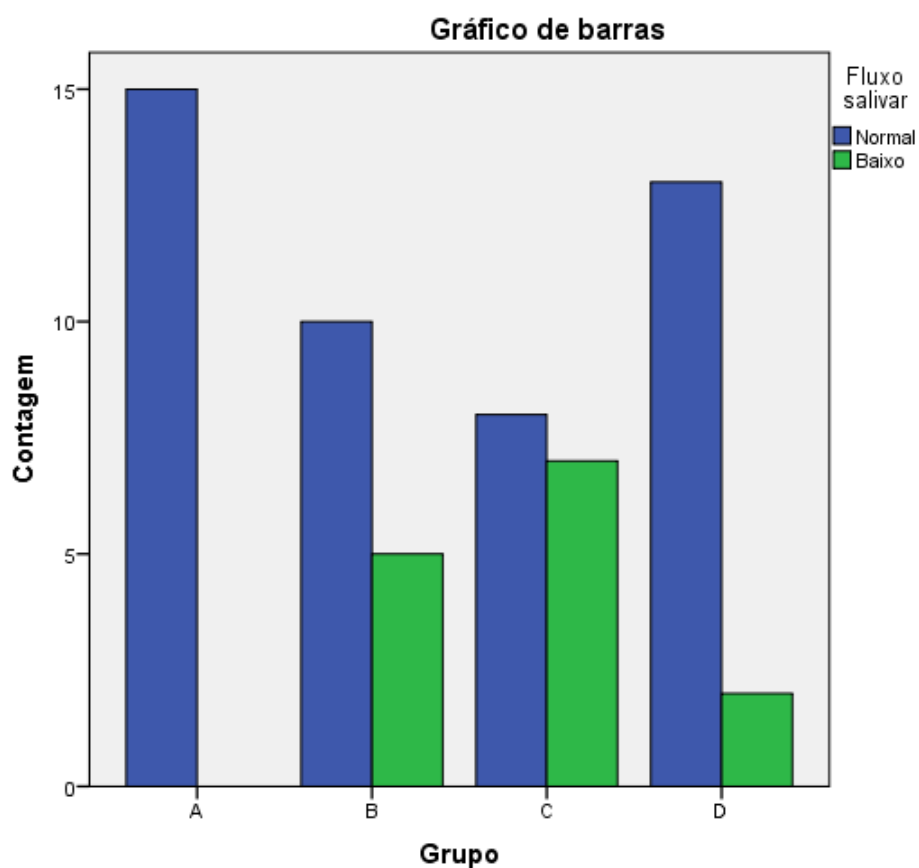


Figura 8 - Gráfico de barras de fluxo salivar com contagem de indivíduos com fluxo normal ou baixo por grupo

A partir da análise do gráfico da figura 8, podemos concluir que o fluxo salivar foi mais elevado no grupo A (pastilha com xilitol) e também no grupo D (pastilha de parafina e pasta de CPP-ACFP).

3.3. Capacidade Tampão

Para a variável ‘capacidade tampão’ mais uma vez as condições do teste não foram verificadas.

		Capacidade tampão			Total
		Elevado	Médio	Baixo	
Grupo A	Contagem	11	2	2	15
	% em Grupo	73,3%	13,3%	13,3%	100,0%
	% em Capacidade tampão	24,4%	20,0%	40,0%	25,0%
	% do Total	18,3%	3,3%	3,3%	25,0%
Grupo B	Contagem	14	1	0	15
	% em Grupo	93,3%	6,7%	0,0%	100,0%
	% em Capacidade tampão	31,1%	10,0%	0,0%	25,0%
	% do Total	23,3%	1,7%	0,0%	25,0%
Grupo C	Contagem	6	7	2	15
	% em Grupo	40,0%	46,7%	13,3%	100,0%
	% em Capacidade tampão	13,3%	70,0%	40,0%	25,0%
	% do Total	10,0%	11,7%	3,3%	25,0%
Grupo D	Contagem	14	0	1	15
	% em Grupo	93,3%	0,0%	6,7%	100,0%
	% em Capacidade tampão	31,1%	0,0%	20,0%	25,0%
	% do Total	23,3%	0,0%	1,7%	25,0%
Total	Contagem	45	10	5	60
	% em Grupo	75,0%	16,7%	8,3%	100,0%
	% em Capacidade tampão	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
	% do Total	75,0%	16,7%	8,3%	100,0%

Tabela 9 - Número de indivíduos com capacidade tampão elevada, média e baixa por grupo

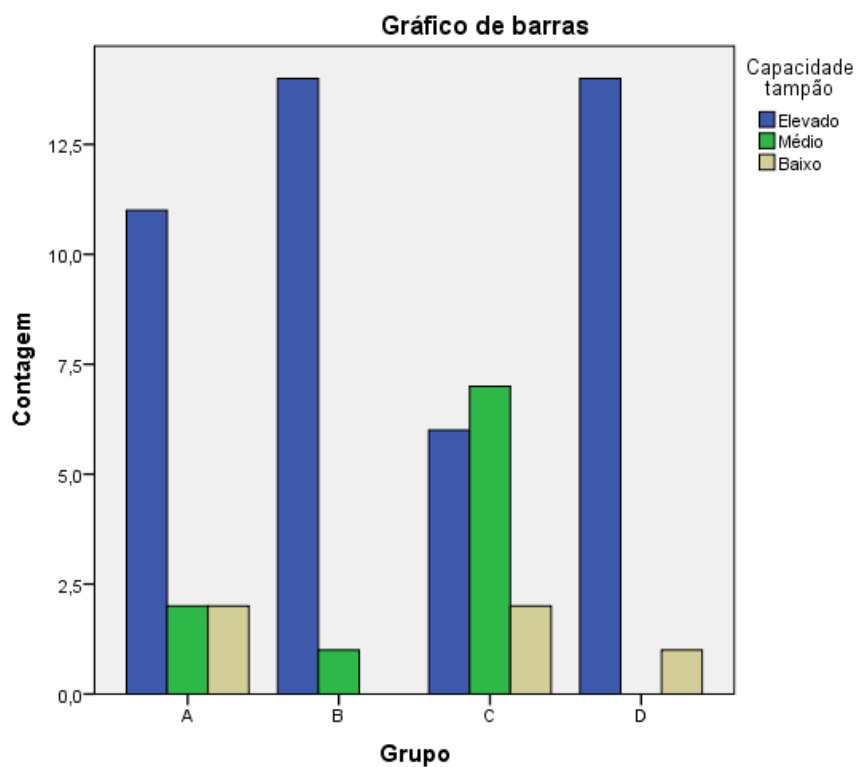


Figura 9 - Gráfico de barras da capacidade tampão elevada, média ou baixa por indivíduo de cada grupo

Pela observação do gráfico da figura 9, podemos concluir que a capacidade tampão foi igualmente elevada nos grupos B (pastilha com xilitol e pasta de CPP-ACFP) e D (pastilha de parafina e pasta de CPP-ACFP).

3.4. Estreptococos mutans

Crosstab

Grupo			S. mutans		Total
			Elevado	Baixo	
Grupo	A	Contagem	7	8	15
		% em Grupo	46,7%	53,3%	100,0%
		% em S. mutans	24,1%	25,8%	25,0%
		% do Total	11,7%	13,3%	25,0%
	B	Contagem	6	9	15
		% em Grupo	40,0%	60,0%	100,0%
		% em S. mutans	20,7%	29,0%	25,0%
		% do Total	10,0%	15,0%	25,0%
	C	Contagem	8	7	15
		% em Grupo	53,3%	46,7%	100,0%
		% em S. mutans	27,6%	22,6%	25,0%
		% do Total	13,3%	11,7%	25,0%
D	Contagem	8	7	15	
	% em Grupo	53,3%	46,7%	100,0%	
	% em S. mutans	27,6%	22,6%	25,0%	
	% do Total	13,3%	11,7%	25,0%	
Total	Contagem	29	31	60	
	% em Grupo	48,3%	51,7%	100,0%	
	% em S. mutans	100,0%	100,0%	100,0%	
	% do Total	48,3%	51,7%	100,0%	

Tabela 10 - Número de indivíduos com contagem de UFC de estreptococos mutans elevada e baixa por grupo

Neste grupo, pela análise da tabela 10, estão verificadas as condições exigidas para aplicação do teste Qui-Quadrado.

Testes qui-quadrado

	Valor	gl	Significância Assintótica (Bilateral)
Qui-quadrado de Pearson	,734 ^a	3	,865
Razão de verossimilhança	,738	3	,864
Associação Linear por Linear	,328	1	,567
Nº de Casos Válidos	60		

Tabela 11 - Teste de Qui-Quadrado sobre contagem de UFC de estreptococos mutans em todos os grupos

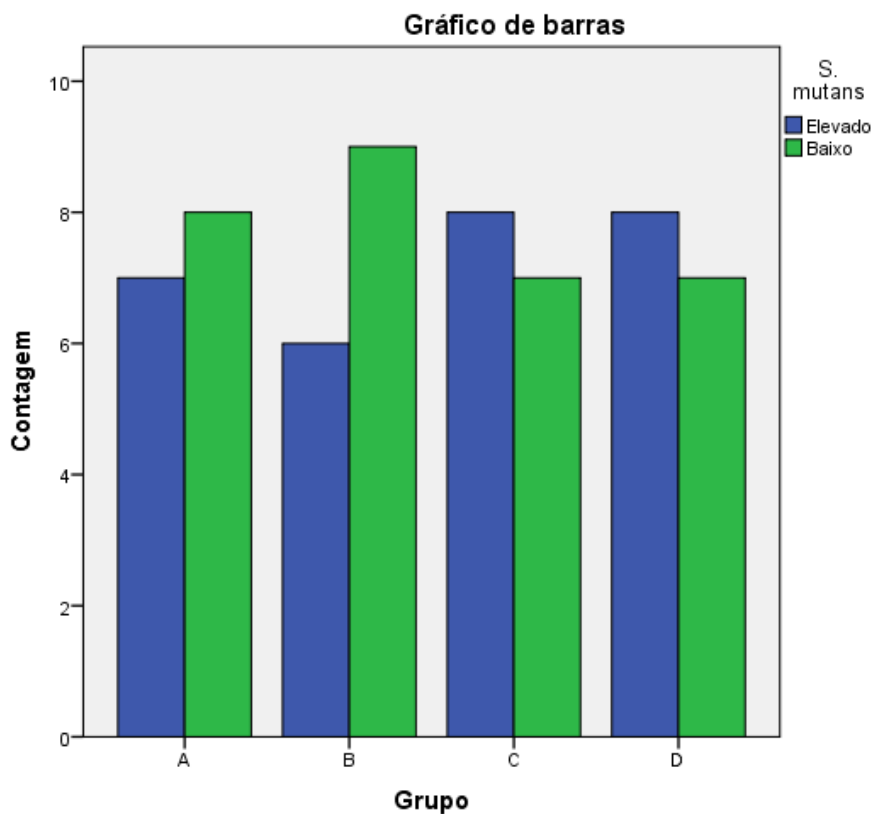


Figura 10 - Gráfico de barras de contagem de UFC de estreptococos mutans elevadas e baixas em cada grupo

Para um nível de significância de 0,05 não existem evidências estatísticas (Qui-Quadrado = 0,734; p-valor=0,865) para se afirmar que os estreptococos mutans e os grupos estão relacionados.

Através da observação da tabela 11, podemos verificar que $p > 0,05$ ($p=0,865$), isto em relação ao Estreptococos mutans, pelo que se confirma que as médias não estão associadas, pelo que não há semelhanças entre grupos.

Isto é a densidade de UFC de estreptococos mutans não está relacionada com o facto dos indivíduos mastigarem pastilha elástica ou pastilha de parafina.

É no grupo B que se verifica a maior percentagem de observações com densidade baixa de estreptococos mutans (60%) e, no lado oposto, são os indivíduos dos grupos que mastigaram a pastilha de parafina (C e D) que apresentam a maior percentagem de observações com densidade alta de estreptococos mutans (ambos com 53.3%).

3.5. Lactobacilos

Grupo		Lactobacilos		Total
		Elevado	Baixo	
A	Contagem	4	11	15
	% em Grupo	26,7%	73,3%	100,0%
	% em Lactobacilos	25,0%	25,0%	25,0%
	% do Total	6,7%	18,3%	25,0%
B	Contagem	3	12	15
	% em Grupo	20,0%	80,0%	100,0%
	% em Lactobacilos	18,8%	27,3%	25,0%
	% do Total	5,0%	20,0%	25,0%
C	Contagem	4	11	15
	% em Grupo	26,7%	73,3%	100,0%
	% em Lactobacilos	25,0%	25,0%	25,0%
	% do Total	6,7%	18,3%	25,0%
D	Contagem	5	10	15
	% em Grupo	33,3%	66,7%	100,0%
	% em Lactobacilos	31,3%	22,7%	25,0%
	% do Total	8,3%	16,7%	25,0%
Total	Contagem	16	44	60
	% em Grupo	26,7%	73,3%	100,0%
	% em Lactobacilos	100,0%	100,0%	100,0%
	% do Total	26,7%	73,3%	100,0%

Tabela 12 - Número de indivíduos com contagem elevada ou baixa de UFC de lactobacilos

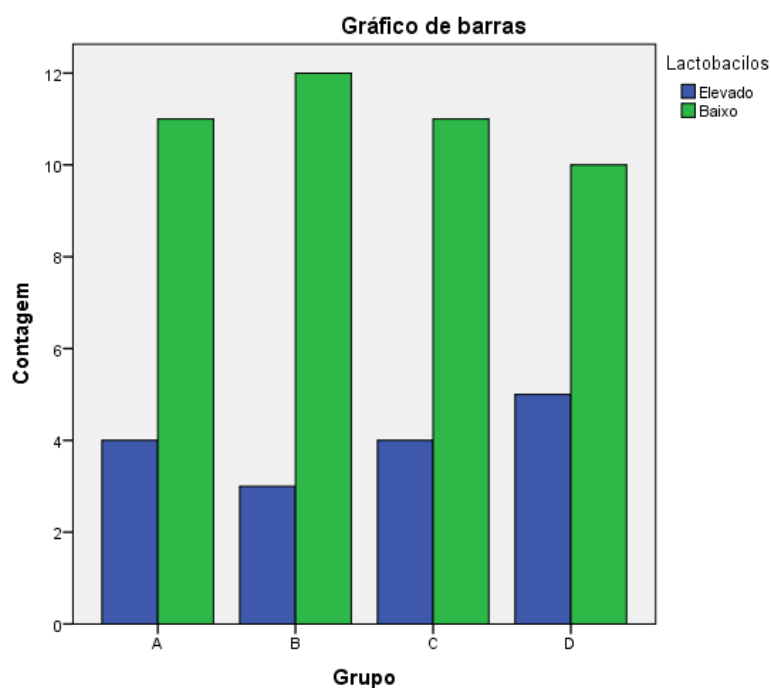


Figura 11 - Gráfico de barras de contagem elevada ou baixa de UFC de lactobacilos por grupo

Relativamente à densidade de UFC de Lactobacilos, estes foram predominantemente baixos nos quatro grupos, tendo sido no grupo B que se alcançaram valores mais baixos.

4- DISCUSSÃO

Este estudo tem como objetivo medir e comparar a taxa de fluxo salivar estimulado, pH, capacidade tampão e a densidade de UFC de *Streptococcus mutans* e *Lactobacilos* mastigando um *pellet* de parafina versus uma pastilha elástica com xilitol, em 4 grupos distintos, associando ou não uma pasta de CPP-ACFP.

Desta forma, foi possível entender em que condições o pH, fluxo salivar, capacidade tampão e densidade de UFC de *Streptococcus mutans* e *Lactobacilos*, favoreceram mais ou menos as condições que promovem o desenvolvimento de cárie dentária.

De acordo com vários autores, o consumo de pastilhas elásticas adoçadas com açúcar, provoca uma ligeira descida do pH da placa, o que por sua vez irá favorecer as condições para o aparecimento de cárie dentária. Por outro lado, também foi comprovado que o uso de pastilhas elásticas com adoçantes não cariogénicos, como o xilitol, provocam um aumento dos níveis de pH, devido à estimulação do fluxo salivar, o que aumenta também os níveis de bicarbonato, levando a uma redução da cárie (Ribelles et al., 2010).

As médias de pH dos grupos A e B (onde os indivíduos de ambos mastigaram pastilhas elásticas com xilitol e associaram uma pasta de CPP-ACFP no segundo) foram muito semelhantes entre si e mais elevadas que as do grupo C (indivíduos que mastigaram apenas uma pastilha de parafina). No entanto, a média do grupo D (indivíduos que mastigaram uma pastilha de parafina e que simultaneamente aplicaram uma pasta de CPP-ACFP) foi a mais elevada de todos os grupos, o que nos leva a crer que o aumento de pH não seja provocado pela presença do xilitol por si só, mas sim pelo estímulo da mastigação, que por sua vez estimula o aumento do fluxo salivar.

Vários autores consideram que as pastilhas elásticas com xilitol elevam o pH, assim como a capacidade tampão e o fluxo salivar, e atribuem estes factos às propriedades químicas do xilitol. Por outro lado, há autores que consideram que estes efeitos se devem sobretudo ao ato da mastigação em si (que aumenta o fluxo salivar) do que à composição do xilitol (Tanzer, 1995).

Apesar dos níveis de fluxo salivar terem sido mais elevados no grupo A, foram também bastante elevados no grupo D. Isto, por outro lado, pode significar que uma vez que a parafina é mais dura que a pastilha elástica, a primeira leva a um maior estímulo de mastigação, aumentando o fluxo salivar e o pH (Ribelles et al., 2010).

Podemos também concluir que tanto a pastilha de parafina como a pastilha elástica com xilitol, estimulam o fluxo salivar, aumentando o pH e a capacidade tampão, o que por sua vez vai facilitar o processo de remineralização dentária, prevenindo o aparecimento de cárie (Ribelles et al., 2010).

O facto de o pH ter atingido a média mais elevada no grupo D, pode dever-se sobretudo ao ato de mastigar a pastilha de parafina cuja dureza é superior, como foi referido anteriormente, mas no entanto o fluxo salivar foi superior no grupo A (que mastigou pastilha elástica com xilitol) cuja média de pH foi mais baixa, o que nos permite concluir que o aumento do fluxo salivar não é diretamente proporcional ao aumento do pH (Ribelles et al., 2010).

Concluindo, entendemos que o ato de mastigação, seja de uma pastilha de parafina ou pastilha elástica com xilitol, é essencial para aumentar o pH, independentemente da presença de xilitol ou não (Ribelles et al., 2010).

Relativamente à capacidade tampão, esta aumenta com o aumento de fluxo salivar. Também verificámos através dos resultados que quanto mais elevada for a capacidade tampão (mais elevada nos grupos B e D), maior será o pH (foi elevado no grupo B, mas destacou-se sobretudo no grupo D).

Segundo Burt (2006), a mastigação de qualquer tipo de pastilha leva a um aumento da capacidade tampão, graças à estimulação do fluxo salivar, neutralizando o pH da placa. Isto pode justificar o facto do grupo D ter sido um dos quais apresentou maior capacidade tampão, tendo sido mastigada uma pastilha de parafina apenas. No entanto, Ramon e Montserrat (2000), demonstraram que as pastilhas com xilitol elevavam a capacidade tampão, o que suporta os resultados no grupo B (onde foram mastigadas pastilhas elásticas com xilitol), tendo atingido média semelhante ao grupo D em relação à capacidade tampão.

Apesar do aumento do fluxo salivar aumentar a capacidade tampão, no presente estudo não foi possível estabelecer essa relação entre estes dois fatores, uma vez que no grupo onde o fluxo salivar foi maior (grupo A), não foi onde se verificou a capacidade tampão mais elevada. No entanto, no grupo onde obtivemos taxa de fluxo salivar menor (grupo C) foi onde também houve capacidade tampão mais baixa, o que seria de esperar de acordo com vários estudos.

Verificámos ainda que a capacidade tampão foi mais elevada nos grupos que aplicaram uma pasta de CPP-ACFP (grupos B e D). Este fenómeno pode ser devido ao mecanismo de ação do CPP-ACP, que estabiliza o cálcio e o fosfato na saliva, elevando a capacidade tampão do pH da placa, aumentando assim a quantidade de cálcio e fosfato na mesma. A concentração elevada destes dois compostos na superfície das lesões leva à sua remineralização (Farooq et al., 2013).

Em relação à influência do CPP-ACFP na densidade de UFC de *Streptococcus mutans* e *Lactobacilos* não pareceu exercer grande influência nos mesmos. Os níveis de *Streptococcus mutans* foram predominantemente baixos no grupo B, mas elevados no grupo D. Em relação aos *Lactobacilos*, foi no grupo B que mais uma vez se verificaram menores níveis, mas foram mais elevados no grupo D. Apesar de vários estudos terem comprovado que o CPP-ACP diminui mais a quantidade de *Streptococcus mutans* salivares do que o xilitol, isso não se verificou neste estudo.

No presente estudo concluímos que a densidade de UFC de *Streptococcus mutans* não está relacionada com o facto de os indivíduos mastigarem uma pastilha elástica com xilitol ou uma pastilha de parafina, pelo que podemos atribuir que as mudanças significativas ocorridas se devam à presença do CPP-ACFP. No entanto, os *Streptococcus mutans* foram mais baixos no grupo B, onde os indivíduos mastigaram uma pastilha elástica com xilitol e aplicaram simultaneamente a pasta de CPP-ACFP, levando-nos a crer que esta seria a melhor associação. Já os *Lactobacilos*, apesar de predominantemente baixos no geral, atingiram também a média mais baixa no grupo B (onde se associou o xilitol ao CPP-ACFP). Perante estes resultados, mais uma vez parece haver suporte de que a melhor associação seria a pastilha com xilitol e a aplicação de pasta de CPP-ACFP, uma vez que foi no grupo B que se atingiram valores mais baixos de *Streptococcus mutans* e *Lactobacilos*.

Um estudo realizado para avaliar os efeitos de duas pastilhas elásticas sem açúcar, uma contendo CPP-ACP e outra xilitol, demonstrou haver diferenças significativas na contagem de estreptococos mutans. O consumo diário de pastilha elástica com CPP-ACP e xilitol, demonstrou haver diminuição dos níveis de estreptococos mutans, mas a pastilha com CPP-ACP revelou maior redução que a pastilha com xilitol. Isto pode ser devido às propriedades antibacterianas do CPP-ACP, assim como ao seu efeito tampão na placa, evitando o crescimento e adesão de estreptococos mutans à superfície dentária (Shen, Cai, Nowicki, Vincent, & Reynolds, 2001).

Num outro estudo, concluí-se também que tanto o xilitol como o CPP-ACP reduzem o número de estreptococos mutans salivares, mas que mais uma vez, seria o CPP-ACP o que teria maior impacto nesta redução, quando consumido diariamente durante 3 semanas (Emamieh, Goudarzi, Baghban, & Khaterizadeh, 2015).

Relativamente aos lactobacilos, vários estudos concluíram que a utilização moderada de xilitol parece não alterar significativamente o seu número. Nesta investigação verificámos que não parece ter havido grande efeito sobre estes microrganismos, uma vez que foram predominantemente baixos, não se tendo verificado diferenças significativas nos mesmos (Neves et al., 2001).

Uma vez que no presente estudo, todas as medições foram efetuadas logo após mastigar a pastilha e/ou aplicar a pasta com CPP-ACFP, não me foi possível avaliar os seus efeitos a longo prazo, mas sim apenas de forma imediata, pelo que não concluí com os meus resultados que o CPP-ACFP iria provocar uma maior redução na contagem de estreptococos mutans, mas sim que a sua associação ao xilitol traria melhores resultados.

5 – CONCLUSÕES

Através deste estudo podemos concluir que o ato de mastigar qualquer pastilha, independentemente desta conter ou não xilitol, é essencial para aumentar o fluxo salivar e a capacidade tampão.

Concluiu-se também que a associação do xilitol ao CPP-ACFP demonstrou ser a mais benéfica, uma vez que foi nestas condições que a densidade de microrganismos cariogénicos (*estreptococos mutans* e *lactobacilos*) foi mais baixa, e a capacidade tampão foi mais elevada, sendo todos fatores ótimos não favoráveis à desmineralização dentária e à cárie.

Contudo, devido ao tamanho da amostra ter sido demasiado pequena em termos estatísticos, não foi possível concluir de forma mais apurada a influência do xilitol e do CPP-ACFP no fluxo salivar, capacidade tampão e densidade de UFC de *lactobacilos*.

Como foi também referido anteriormente, não foram encontrados estudos que suportassem de forma clara os resultados obtidos, uma vez que a maioria referente ao tema, foram efetuados de forma a estudar os efeitos do xilitol e do CPP-ACP a longo prazo, e não de forma imediata como foi realizado neste projeto.

BIBLIOGRAFIA

- Arianto, Y., Triaminingsih, S., Asada, S., & Saeki, Y. (2016). Combination Concentration Effects of Calcium hydrogen phosphate on Human Enamel Remineralization by Xylitol and Funoran. *Journal of International Dental and Medical Research*, 9(3), 189-194.
- Burt, B. A. (2006). The use of sorbitol-and xylitol-sweetened chewing gum in caries control. *The Journal of the American Dental Association* 137(2): 190-196.
- Cardoso, C., Cassiano, L., Costa, E., Souza-e-Silva, C., Magalhães, A., Grizzo, L., Buzalaf, M. (2016). Effect of xylitol varnishes on remineralization of artificial enamel caries lesions in situ. *Journal of dentistry*, 50, 74-78.
- Caufield, P., Schön, C., Saraithong, P., Li, Y., & Argimón, S. (2015). Oral lactobacilli and dental caries: a model for niche adaptation in humans. *Journal of dental research*, 94(9_suppl), 110S-118S.
- Cocco, F., Carta, G., Cagetti, M. G., Strohmenger, L., Lingström, P., & Campus, G. (2017). The caries preventive effect of 1-year use of low-dose xylitol chewing gum. A randomized placebo-controlled clinical trial in high-caries-risk adults. *Clinical Oral Investigations*, 1-8.
- Damle, S., Loomba, A., Dhindsa, A., Loomba, A., & Beniwal, V. (2016). Correlation between dental caries experience and mutans streptococci counts by microbial and molecular (polymerase chain reaction) assay using saliva as microbial risk indicator. *Dental research journal*, 13(6), 552.
- Damle, S. G., Bector, A., Damle, D., & Kaur, S. (2016). Effect of dentifrices on their remineralizing potential in artificial carious lesions: An in situ study. *Dental research journal*, 13(1), 74.
- Emamieh, S., Goudarzi, H., Baghban, A. A., & Khaterizadeh, Y. (2015). Comparison of the Effect of Recaldent and Xylitol on the Amounts of Salivary Streptococcus Mutans. *Novelty in Biomedicine*, 3(1), 33-37.

- Esfahani, K. S., Mazaheri, R., & Pischevar, L. (2015). Effects of treatment with various remineralizing agents on the microhardness of demineralized enamel surface. *Journal of dental research, dental clinics, dental prospects*, 9(4), 239.
- Farooq, I., Moheet, I. A., Imran, Z., & Farooq, U. (2013). A review of novel dental caries preventive material: Casein phosphopeptide–amorphous calcium phosphate (CPP–ACP) complex. *King saud university journal of dental sciences*, 4(2), 47-51.
- Garcia, L. B., Bulla, J. R., Kotaka, C. R., Tognim, M. C. B., & Cardoso, C. L. (2009). Testes salivares e bacteriológicos para avaliação de risco de cárie. *Rev. bras. anal. clin*, 41(1), 69-76.
- García-Godoy, F., & Hicks, M. J. (2008). Maintaining the integrity of the enamel surface: the role of dental biofilm, saliva and preventive agents in enamel demineralization and remineralization. *The Journal of the American Dental Association*, 139, 25S-34S.
- Gueimonde, L., Vesterlund, S., García-Pola, M. J., Gueimonde, M., Söderling, E., & Salminen, S. (2016). Supplementation of xylitol-containing chewing gum with probiotics: a double blind, randomised pilot study focusing on saliva flow and saliva properties. *Food & function*, 7(3), 1601-1609.
- Hegde, R. J., & Thakkar, J. B. (2017). Comparative evaluation of the effects of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate (CPP-ACP) and xylitol-containing chewing gum on salivary flow rate, pH and buffering capacity in children: An in vivo study. *Journal of Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry*, 35(4), 332.
- Lima, J. E. d. O. (2007). Cárie dentária: um novo conceito. *Rev. dent. press ortodon. ortopedi. facial*, 12(6), 119-130.
- Mäkinen, K. (2009). Xylitol-associated remineralization of caries lesions. *Oralprophylaxe Kinderzahnheilkd*, 31, 66-75.
- Matthews, F. (2015). Use of sugar-free gum as complement in the prevention of dental caries. Narrative review. *Journal of Oral Research*, 4(2), 129-136.

- Melo, L. F. B. d., Azevedo, T. D. P. L., Melo, J. F., Lima, S. M. d. F., Bezerra, A. C. B., & Toledo, O. A. d. (2015). Efeito remineralizador da caseína fosfato de cálcio fosfopeptídeo amorfo em dentes decíduos e permanentes in vivo. *Revista da Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas*, 69(3), 302-306.
- Moreira Gomes Monteiro Montanuci, L., Ricci Volpato, L. E., Campos França, D. C., Herondina Coelho Ávila de Aguiar, S. M., & de Andrade Moreira Machado, M. A. (2013). Efeito de diferentes gomas de mascar sobre o pH salivar de crianças. *Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada*, 13(1).
- Nakano, K., Nomura, R., Nakagawa, I., Hamada, S., & Ooshima, T. (2005). Role of glucose side chains with serotype-specific polysaccharide in the cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Caries research*, 39(4), 262-268.
- Nayak, P. A., Nayak, U. A., & Khandelwal, V. (2014). The effect of xylitol on dental caries and oral flora. *Clinical, cosmetic and investigational dentistry*, 6, 89.
- Oliveira, G. M., Ritter, A. V., Heymann, H. O., Swift, E., Donovan, T., Brock, G., & Wright, T. (2014). Remineralization effect of CPP-ACP and fluoride for white spot lesions in vitro. *Journal of dentistry*, 42(12), 1592-1602.
- Paiva, E., Ferreira, L. P., & Pessoa, F. (2009). 'Avaliação do risco de cárie em Odontopediatria: A sua utilidade como meio de prevenção. *Acta Pediátrica Portuguesa*, 40, 59-64.
- Peterson, S. N., Snesrud, E., Liu, J., Ong, A. C., Kilian, M., Schork, N. J., & Bretz, W. (2013). The dental plaque microbiome in health and disease. *PloS one*, 8(3), e58487.
- Pinheiro, S. L., Azenha, G. R., Araujo, G., & Puppim, R. R. (2017). Effectiveness of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate and lysozyme, lactoferrin, and lactoperoxidase in reducing *Streptococcus mutans* counts in dentinal caries. *General dentistry*, 65(2), 47.
- Pitts, N., Amaechi, B., Niederman, R., Acevedo, A.-M., Vianna, R., Ganss, C., Honkala, E. (2011). Global oral health inequalities: dental caries task group—research agenda. *Advances in dental research*, 23(2), 211-220.

- Porcaro Bretas, L., Esteves Rocha, M., Sant'Ana Vieira, M., & Peres Rodrigues, A. C. (2008). Fluxo salivar e capacidade tamponante da saliva como indicadores de susceptibilidade à doença cárie. *Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada*, 8(3).
- Rahiotis Christos, V. G. (2007). Effect of a CPP-ACP agent on the demineralization and remineralization of dentine in vitro. *J Dent*, 35, 695-698.
- Ribelles, L. M., Guinot, J. F., Mayné, A. R., & Bellet, D. L. (2010). Effects of xylitol chewing gum on salivary flow rate, pH, buffering capacity and presence of *Streptococcus mutans* in saliva. *European journal of paediatric dentistry: official journal of European Academy of Paediatric Dentistry*, 11(1), 9-14.
- Salli, K. M., Gürsoy, U. K., Söderling, E. M., & Ouwehand, A. C. (2017). Effects of Xylitol and Sucrose Mint Products on *Streptococcus mutans* Colonization in a Dental Simulator Model. *Current Microbiology*, 1-7.
- Shen, P., Cai, F., Nowicki, A., Vincent, J., & Reynolds, E. (2001). Remineralization of enamel subsurface lesions by sugar-free chewing gum containing casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate. *Journal of dental research*, 80(12), 2066-2070.
- Söderling, E. (2009). Xylitol, mutans streptococci, and dental plaque. *Advances in dental research*, 21(1), 74-78.
- Syed, M., & Shafi, M. (2017). Assessing the effect of xylitol chewing gum on salivary *Streptococcus mutans* levels in 8 to 12 year old Children. *Journal of Advanced Medical and Dental Sciences Research* | Vol, 5(3).
- Tanzer, J. (1995). Xylitol chewing gum and dental caries. *International dental journal*, 45(1 Suppl 1), 65-76.