

José Manuel Afonso Basteiro

**O uso de Probióticos como agentes antimicrobianos na cárie dentária**



Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2011



José Manuel Afonso Basteiro

**O uso de Probióticos como agentes antimicrobianos na cárie dentária**

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2011

# **O uso de Probióticos como agentes antimicrobianos na cárie dentária**

**Autor:** José Manuel Afonso Basteiro

**Orientadora:** Professora Doutora Cristina Pina

**Co-orientadora:** Professora Doutora Maria João Coelho

O aluno,

---

*(José Manuel Afonso Basteiro)*

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

## **Resumo**

A saúde oral é um factor muito importante para todos nós, pois uma boca não cuidada pode desencadear problemas graves na saúde. A principal patologia associada à cavidade oral é a cárie dentária, sendo universalmente reconhecida como uma doença multifactorial, que afecta cerca de 80% da população mundial. É causadora da destruição localizada dos tecidos dentários duros, sensíveis ao ácido produzido pelo processo fermentativo bacteriano da flora comensal, predominantemente por *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* e *Lactobacillus spp.*, a partir dos hidratos de carbono acumulados num biofilme oral.

Os probióticos são definidos como microrganismos vivos que administrados em quantidades adequadas conferem um benefício à saúde do hospedeiro, os quais poderão ser num futuro próximo uma alternativa preventiva para a cárie dentária. O seu modo de acção pode variar dependendo da espécie, de factores fisiológicos, nutricionais e antimicrobianos, causando uma redução do número bactérias patogénicas na cavidade oral.

O objectivo deste estudo é a pesquisa bibliográfica de estudos científicos com bactérias probióticas como possíveis agentes antimicrobianos na cárie dentária.

**Palavras-Chave:** Probióticos; cárie dentaria; prevenção oral;

## **Abstract**

Oral health is a very important factor for all of us, as an untidy mouth can trigger serious health problems in general. The main pathology associated with the oral cavity is dental carie, which is universally recognized as a multifactorial disease, which affects about 80% of the world. It causes localized destruction of dental hard tissues due to the acid produced by bacterial fermentation process of the commensal flora, predominantly by *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* and *Lactobacillus* spp. from carbohydrates accumulated in oral biofilm.

Probiotics are defined as living microorganisms administered in adequate amounts which confer a health benefit to the host, and probably in the future could be used for the prevention of dental caries. Their mode of action may vary depending on the species, based on physiological factors, nutritional and antimicrobial, causing a reduction in pathogenic bacteria in oral cavity.

The objective of this study is to make a bibliografy research of the cientific studies of the probiotic bacteria used as antimicrobial agents in dental caries.

**Keywords:** Probiotics, dental caries, oral prevention

## **Agradecimentos**

Agradeço....

.... aos meus Pais por me acompanharem e apoiarem em todos os momentos da minha vida e pela grande ajuda na concretização do meu sonho pessoal.

.... à Marisa Loureiro, Amiga e Namorada pelo apoio incondicional ao longo destes seis anos, pelo carinho demonstrado, pela inestimável paciência, pela sua grande iniciativa e ajuda.

.... à minha Irmã por todo o companheirismo e amizade que me ofereceu neste percurso.

.... à minha família.

.... aos meus amigos pela paciência, pelo optimismo, pelo vosso ombro amigo.

.... aos meus colegas de faculdade.

.... à Professora Doutora Cristina Pina pelo seu dinamismo, entrega ao trabalho, conhecimento e sugestões transmitidas durante a elaboração da tese.

.... à Professora Doutora Maria João Coelho por todo o seu profissionalismo e apoio.

.... à Universidade Fernando Pessoa – Faculdade Ciências da Saúde pelo contributo para a minha formação pessoal e profissional.

Agradeço sem excepção a todos aqueles que sempre me apoiaram.

A todos o meu MUITO OBRIGADO!

## Índice

I – INTRODUÇÃO.....	1
II – PROBIÓTICOS .....	5
1. Origem e definição de probióticos .....	5
2. Critérios de selecção.....	8
2.1. Características dos probiótico.....	8
2.2. Segurança dos probióticos .....	9
3. Modo de acção dos probióticos.....	10
4. Tipos de Probióticos.....	12
4.1. Género <i>Bifidobacterium</i> .....	13
4.2. Género <i>Lactobacillus</i> .....	13
5. Formulações comerciais de probióticos .....	14
6. Efeitos adversos dos probióticos.....	16
III – CÁRIE DENTÁRIA.....	17
1. Definição de Cárie dentária.....	17
2. Origem e processo da Cárie Dentária.....	17
2.1. Factores de virulência de bactérias cariogénicas <i>Streptococcus</i> spp. ....	22
3. Estratégias clássicas de prevenção à cárie.....	22
3.1. Hábitos e higiene .....	22
3.2. Incorporação de flúor.....	23
3.3. Agentes Quimioprolácticos .....	23

3.4. Vacinas.....	24
IV – O USO DE PROBIÓTICOS DE CÁRIE DENTÁRIA.....	26
1. Modo de acção .....	26
2. Estudos laboratoriais .....	29
3. Limitações dos probióticos contra bactérias cariogénicas .....	35
V – CONCLUSÃO .....	36
VI – BIBLIOGRAFIA .....	38

## Índice de figuras

<b>Figura 1:</b> Interação dos principais factores etiológicos para o surgimento da cárie dentária .....	18
<b>Figura 2:</b> Etapas condutoras à colonização e infecção por <i>Streptococcus mutans</i> e outras bactérias produtoras de ácido, na superfície do dente.....	20
<b>Figura 3:</b> Cárie activa por baixo da placa espessa.....	21
<b>Figura 4:</b> Uma possível abordagem para o controlo da cárie dentária .....	27
<b>Figura 5:</b> Dispositivo médico contendo um probiótico com aplicação na cavidade oral.....	28
<b>Figura 6:</b> Possíveis actividades probióticas na cavidade oral.....	29

**Índice de tabelas**

**Tabela I:** Descrições e definições atribuídas aos probióticos ao longo dos anos .....6

**Tabela II:** Efeitos e mecanismos de acção dos probióticos em diferentes áreas clínicas.....11

**Tabela III:** Bactérias com actividade probiótica comprovada .....12

**Tabela IV:** Formulações comerciais de probióticos .....15

**Lista de abreviaturas**

BAL – Bactéria ácido-láctias

BSH – Hidrolase dos saís biliares

FAO - Organização para a Agricultura e Alimentação

GI – Gastrointestinal

IL-8 – Interleucina – 8

OMS – Organização Mundial de Saúde

TNF -  $\alpha$  – Factor de Necrose Tumoral - alfa

## I – Introdução

Uma saúde oral sã é extremamente importante, não apenas com o intuito de atingir um belo sorriso capaz de cativar muitos olhares como também, é sinal dum óptimo bem estar de saúde (Woestmann *et al.*, 2006).

A cavidade oral dos seres humanos é habitada por mais de mil espécies de bactérias, em que a maioria são comensais e essenciais para manter o equilíbrio da flora oral normal. Contudo, é certo que algumas das bactérias que constituem a cavidade oral têm um papel fundamental no desenvolvimento de doenças orais, nomeadamente a cárie dentária e doenças periodontais (Belda-Ferre *et al.*, 2011; He *et al.*, 2009 e Stamatova *et al.*, 2009).

As doenças orais resultam do crescimento da placa dentária, biofilme, formado pela acumulação de bactérias em conjunto com as glicoproteínas salivares e polissacarídeos e resíduos alimentares. Este ambiente propicia o desenvolvimento da cárie dentária, a qual é considerada a doença da cavidade oral mais disseminada de origem infecciosa no mundo, afectando mais de oitenta por cento da população humana (Belda-Ferre *et al.*, 2011; He *et al.*, 2009).

A cárie dentária provoca danos irreversíveis na dentição, o que condiciona posteriormente a capacidade de mastigação dos alimentos (Islam *et al.*, 2007).

A má saúde oral tem sido relacionada com outras doenças como (Petersen *et al.*, 2005):

- Úlceras do estômago;
- Carcinoma gástrico;
- Doenças do foro cardiovasculares.

O factor de risco mais prevalente na génese da cárie dentária é a deficiente higiene oral. Assim, o combate primário da cárie dentária passa por uma boa escovagem de forma

regular, com o uso de pasta dentífrica e/ou colutórios (Belda-Ferre *et al.*, 2011; Petersen *et al.*, 2005 e Razmienè *et al.*, 2011).

A cárie apresenta uma fisiopatologia complexa, sendo variável o seu modo de acção, e por isso necessário estudar a flora oral como um todo no seu habitat. Assim, a sua profunda compreensão permitirá efectuar diagnósticos de modo mais eficaz, bem como tornar esta informação uma ferramenta útil na prevenção das patologias orais (He *et al.*, 2009).

O surgimento dos probióticos como alternativa para combater a cárie dentária, advém de um contínuo estudo de encontrar novas alternativas como forma de tratamento e ou de prevenção face a infecções bacterianas (He *et al.*, 2009). Assim, as investigações científicas que estudam os probióticos poderão dar um importante contributo para uma melhoria da saúde oral e da qualidade de vida (Stamatova *et al.*, 2009).

A origem desta grande revolução no âmbito da microbiologia teve início há essencialmente um século com o senhor Henry Tissier em 1908, com o isolamento de uma *Bifidobacteria*. Mais tarde com o senhor Elie Metchnikoff (cientista e professor do Instituto Pasteur, em Paris), demonstrou que algumas bactérias com características ácido-láctias trazem benefícios para a saúde. Sugeriu-se que a proliferação bacteriana intestinal e a deterioração da flora intestinal poderia ser evitada utilizando organismos que iriam substituir as bactérias patogénicas com características proteolíticas, como o *Clostridium* (produtor de substâncias tóxicas), desenvolvendo uma dieta com leite fermentado (Guarner *et al.*, 2008).

Após estas primeiras descobertas surgem diversos estudos com outras bactérias com potencial benéfico, na flora intestinal do ser humano. Entre elas destacam-se as seguintes espécies, *Escherichia coli* e *Bacillus bifidus communis*, (Stamatova *et al.*, 2009). Há também outras investigações com outros géneros de bactérias como *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium* e *Streptococcus* (Bonifait *et al.*, 2009).

O termo “probiótico” surge pela primeira vez em 1965, com uma abordagem muito aproximada do que se define na actualidade, definindo-se um probiótico como um agente microbiológico que estimula o crescimento de outros organismos. Em 1989, Roy

Fuller enfatizou a viabilidade dos probióticos e introduziu a ideia de que estas têm um efeito benéfico para o hospedeiro (Guarner *et al.*, 2008).

Diariamente, o ser humano ingere enúmeras quantidades de microrganismos vivos, nomeadamente bactérias. Estes microrganismos estão naturalmente presentes nos alimentos, água, podendo também ser adicionados em alimentos como queijos, iogurtes, leite entre outros produtos alimentares (Bonifait *et al.*, 2009).

Diversas décadas passaram e muitos estudos clínicos foram efectuados com o intuito de demonstrar a vantagem do consumo de determinados alimentos como potenciais armas biológicas contra diversas patologias (Bonifait *et al.*, 2009). Estes estudos demonstraram a eficácia de certos probióticos no tratamento de doenças sistémicas e infecciosas, como por exemplo:

- agentes imuno-estimulantes desencadeando o alívio da sintomatologia e incidência da diarreia aguda (Vrese *et al.*, 2007),
- a aplicação como terapia adjunta à terapêutica medicamentosa na erradicação da *Helicobacter pylori* (Gotteland *et al.*, 2006; Guarner *et al.*, 2008; Lenoir-Wijinkoop *et al.*, 2007 e Sheu *et al.*, 2006),
- a capacidade de manutenção dos processos inflamatórios na doença inflamatória intestinal (Cummings *et al.*, 2003 e Guarner *et al.*, 2008),
- nas infecções urogenitais, o uso de *Lactobacillus* probióticos poderão ser capazes de reduzir o pH vaginal, equilibrando a flora comensal, uma vez que geralmente as infecções urogenitais devem-se ao desequilíbrio da flora (Anukam *et al.*, 2006; Lenoir-Wijinkoop *et al.*, 2007)
- intolerância à lactose com o uso de *Lactobacillus reuteri* pode reduzir a tensão abdominal, flatulência e dor (Guarner *et al.*, 2008).

Os probióticos poderão ser úteis na prevenção de patologias orais, evitando a remoção mecânica da cárie dentária, e o recurso a antibióticos para o tratamento de abscessos

orais e de prevenção para outro tipo de patologias. Surge assim, a necessidade de desenvolver técnicas preventivas do uso de probióticos para a cárie dentária (Bonifait *et al.*, 2009).

Diversos estudos foram efectuados no âmbito da procura dos agentes responsáveis da cárie dentária, bem como actividade benéfica em interacção com outros probióticos (Zahradnik *et al.*, 2009; Bonifait *et al.*, 2009).

O principal objectivo deste trabalho é compilar os vários estudos científicos sobre o uso de probióticos como possíveis agentes anti-microbianos na cárie dentária.

## II – Probióticos

### 1. Origem e definição de probióticos

O interesse pelos probióticos tem cerca de um século como já referido na introdução (Tabela I). Em 1908, o senhor Henry Tissier isolou uma *Bifidobacteria* proveniente do leite materno, que denominou de *Bacillus bifidus communis*. Estas bifidobactérias eram capazes de eliminar as bactérias proteolíticas (*Clostridium difficile* e *Escherichia coli* hemorrágica) que causavam a diarreia nos lactentes (Guarner *et al.*, 2008; Kasper *et al.*, 2009 e Vasiljevic *et al.*, 2008).

Mais tarde, o senhor Elie Metchnikoff postulou que as BAL (*Bacillus* ácido-lácticas) poderiam contribuir com efeitos vantajosos para a saúde, permitindo até aumentar a esperança média de vida. Sugeriu que a proliferação de bactérias no conteúdo intestinal poderia ser suprimido pela modificação da flora comensal do intestino, utilizando microrganismos úteis para substituir as bactérias patogénicas como o *Clostridium difficile* – agente responsável pela produção de toxinas (nidois, fenóis e amónia) resultantes da degradação proteica, através de uma dieta à base de leite fermentado com bactérias, à qual denominou de “bacilo búlgaro”, teoria que mais tarde veio a ser posta em causa a sua viabilidade (Guarner *et al.*, 2008).

Contudo, em 1917, antes de Alexander Fleming descobrir a penicilina (antibiótico descoberto em 1928, a partir do fungo *Penicillium notatum*), o professor alemão, chamado Alfred Nissle, efectuou estudos com uma espécie não patogénica de *Escherichia coli* proveniente de fezes de um soldado da Primeira Grande Guerra Mundial, que não tinha contraído enterocolite (inflamação do intestino delgado e/ou cólon de origem bacteriana ou vírica). Neste caso, a resolução da enterocolite passava pelo uso de bactérias não patogénicas viáveis, e estas tinham como função mudar ou melhorar a microflora intestinal. Nissle participou desta maneira na demonstração de como a *Escherichia coli* é um exemplo de um probiótico não BAL eficaz no combate de enterites (Guarner *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2005 e Pereira *et al.*, 2005).

**Tabela I:** Descrições e definições atribuídas aos probióticos ao longo dos anos.  
(Adaptado de Vasiljevic *et al.*, 2008).

Ano	Descrição	Autores
1953	Os probióticos estão em alimentos vegetais como vitaminas, substâncias aromáticas, enzimas e outras substância possivelmente ligadas com os processos vitais	Kollath
1954	Probióticos são o oposto de antibióticos	Vergin
1955	Efeitos deletérios dos antibióticos podem ser prevenidos pela terapia probiótica	Kolb
1965	Um agente microbiológico que estimula o crescimento de outros organismos	Lilly e Stillwell
1971	Extractos de tecidos que estimulam o crescimento microbiano	Sperti
1973	Compostos para construir resistência à infecção no hospedeiro, mas não inibir o crescimento de microrganismos <i>in vitro</i>	Fujii e Cook
1974	Organismos e substâncias que contribuem para o equilíbrio microbiano intestinal	Parker
1992	Suplemento alimentar microbiano que afecta benéficamente o animal hospedeiro, melhorando o equilíbrio microbiano	Fuller
1992	Um ou mais indivíduos numa cultura mista de microrganismos que, aplicada em animais ou no homem, têm um efeito benéfico sobre o hospedeiro, melhorando as propriedades da microflora indígena	Havenaar e Huis
1996	Culturas vivas de “micróbios” ou produtos lácteos cultivados, que influenciam benéficamente a saúde e nutrição do hospedeiro	Salminen
1996	Microrganismos que após a ingestão de um determinado número, exercem benefícios à saúde além da nutrição básica inerente	Schaafsma
1999	Preparações de células microbianas ou componentes de células microbianas que têm um efeito benéfico sobre a saúde e o bem-estar do hospedeiro	Salminen, Ouwehand, Benno and Lee
2001	A preparação de um produto viável que contenha microrganismos em número suficiente, que alterem a microflora (por implantação ou colonização) num compartimento do hospedeiro e porque exercem efeitos benéficos à saúde nesta série	Schrezenmeir e de Vrese
2002	Microrganismos vivos, que quando administrados em quantidades adequadas conferem um benefício à saúde do hospedeiro,	FAO/OMS

A palavra probiótico, que deriva do latim e do grego que significa “pró vida” ou para a vida, foi introduzida pela primeira vez em 1953, pelo senhor Kollath, considerando que, eram alimentos vegetais como vitaminas, substâncias aromáticas, enzimas e outras substâncias possivelmente ligadas com os processos vitais (Kollath, 1953). No entanto, a afirmação mais aproximada à dos dias de hoje, atribuída pela FAO (Organização para a Agricultura e Alimentação) e pela OMS (Organização Mundial de Saúde), surge em 1965 por Lilly e Stillwell, referindo-se aos probióticos como bactérias que estimulam o crescimentos de outros organismos em prol da melhoria da patologia (Guarner *et al.*, 2008; Vasiljevic *et al.*, 2008).

No final da década de 80, Roy Fuller alertou para o benefício dos probióticos e que estes deveriam ser usados em preparações ou produtos que contivessem microrganismos viáveis em quantidades adequadas (Guarner *et al.*, 2008; Schrezenmeir *et al.*, 2001 e Vasiljevic *et al.*, 2008), e que procurassem realçar a actividade profilática e terapêutica desses microrganismos (Fioramonti *et al.*, 2003).

Nos dias de hoje, probióticos podem ser definidos como, microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas conferem um benefício à saúde do hospedeiro, podendo incluir-se em diversos alimentos e suplementos dietéticos. Devem compreender apenas uma pequena percentagem da nossa flora comensal, entre 1% a 13% (Balcão *et al.*, 2005; Fioramonti *et al.*, 2003; Goldin *et al.*, 2008; Guarner *et al.*, 2008; Sanders., 2003; Schrezenmeir *et al.*, 2001 e Vasiljevic *et al.*, 2008).

## 2. Critérios de selecção

### 2.1. Características dos probióticos

A selecção dos probióticos funcionais é feita mediante quatro características base: (Badaró *et al.*, 2008; Klaenhammer *et al.*, 1999).

- ✓ Adequação ao meio;
- ✓ Adequação tecnológica;
- ✓ Competitividade;
- ✓ Funcionalidade.

As culturas probióticas devem ser identificadas e classificadas, com base nas suas características fenotípicas e, principalmente, genotípicas. Neste tipo de caracterização genética é importante incluir também as análises filogenéticas (Stamatova *et al.*, 2009). Deverá ser uma espécie que não seja rejeitada pela flora comensal alvo, não patogénica ou tóxica. A adequação tecnológica significa que, a espécie probiótica tem que ter facilidade na produção em massa e seu armazenamento, fácil recuperação, capaz de sobreviver a temperaturas baixas, resistência à desidratação e geneticamente estável. Um probiótico deve ser competitivo, resistente ao meio onde irá co-habitar e colonizar-se na flora comensal onde é inserido. É também necessário que consiga exercer um ou mais benefícios à saúde devidamente documentados, como por exemplo: ser antagónico ao desenvolvimento de patologias, como é o caso do uso de *Lactobacillus rhamnosus* que antagonizam a colonização das bactérias cariogénicas. Este probiótico foi usado num grupo de crianças, em que lhe foi administrado leite com e sem *Lactobacillus rhamnosus* durante um período determinado. Os resultados obtidos mediante os critérios da OMS, para as crianças que consumiram *Lactobacillus rhamnosus* mostraram uma menor incidência de cárie dentária e um valor inferior de colónias de *Streptococcus mutans*, demonstrando a capacidade antagónica com efeitos benéficos sobre a saúde oral (Badaró *et al.*, 2008; Klaenhammer *et al.*, 1999; Näsé *et al.*, 2001 e Zago *et al.*, 2011).

Muitos critérios são usados para seleccionar um agente microbiano seguro e eficaz. A capacidade de sobreviver ao meio onde são pretendidos para co-habitar ou aos meios que precisam de passar até atingir o local alvo, torna-se num parâmetro muito importante para viabilizar a utilidade da bactéria. Os diferentes géneros de *Bifidobacterium* são um exemplo de probióticos que sobrevivem a diferentes meios até atingir o local alvo, onde são óptimas contribuintes para uma regulação do tracto gastrointestinal (GI) (Arboleya *et al.*, 2011; Tannock., 1998).

O conteúdo genético bacteriano está na base de cada mecanismo e dita o desempenho das culturas probióticas e as suas funções. Portanto, a escolha do probiótico exige uma sequenciação genómica com a capacidade funcional das bactérias e suas possíveis capacidades probióticas. Estudos realizados mostraram que a análise das espécies de *Bifidobacterium* que são capazes de agir como probióticos eficazes na terapêutica pretendida, segundo as diversas directrizes internacionais para os probióticos, verificaram que estas espécies apresentam diferenças tornando-as em sub-espécies com características e potencialidades probióticas diferentes (Arboleya *et al.*, 2011; Tannock., 1998).

## 2.2. Segurança dos probióticos

Directrizes internacionais delegam que a segurança dos probióticos deve também reunir um conjunto de princípios gerais e critérios práticos para fornecer orientações sobre a forma como um dado microrganismos com potencialidade a probiótico deve ser testado e comprovado a ter baixo risco em induzir patologia e não deve estar associado a um agente etiológico. No entanto, há espécies que exigem uma avaliação mais vigorosa que outros como avaliar a sua segurança em humanos. Informações recentes mostram que os *Lactobacillus* spp. têm uma longa história no uso como probióticos sem grandes riscos estabelecidos para os seres humanos, sendo esta estabilidade ao longo dos anos a melhor prova que são seguros. Além disso, são considerados não patogénicos e não virulentos (FAO/WHO, 2002; Ishibashi, *et al.*, 2001; Saarela *et al.*, 2000 e Von Wright, 2005).

Contudo, há declarações que afirmam que em determinadas e específicas condições, algumas espécies de *Lactobacillus* estão associados efeitos adversos, tais como, casos

raros de bacteriemia. No entanto, estudos epidemiológicos avaliaram que neste momento não há aumento da incidência ou frequência de bacteriemias com o uso de *Lactobacillus* como probióticos (FAO/WHO, 2002).

Tal como acontece com qualquer bactéria, a resistência a antibióticos existe. Deste modo, há um controlo sobre o uso de bactérias probióticas que contenham genes transmissíveis com resistência específica a determinados antibióticos, não podendo ser utilizados como probióticos em alimentos (FAO/WHO, 2002).

### **3. Modo de acção dos probióticos**

As estirpes bacterianas probióticas têm sido consideradas como agentes probióticos não apenas com acção preventiva, mas também com acção activa e mesmo curativa ou terapêutica (Balcão *et al.*, 2005). O modo de acção é variável (Tabela II), entre os vários tipos de estirpes estudadas podendo apresentar: (Balcão *et al.*, 2005; Heller., 2001 e Rowland *et al.*, 2008):

- acção digestiva melhorada, incluindo-se na degradação parcial de gorduras, hidratos de carbono e proteínas;
- actividade antagonista centrada nos microrganismos patogénicos, inibindo a proliferação de determinados microrganismos pertencentes à flora comensal, inibição da adesão e/ou activação de agentes patogénicos;
- melhoria na degradação de lactose, reduzindo o seu teor nos alimentos, e uma acréscimo de lactase;
- colonização do intestino, melhoria do trânsito intestinal;
- efeito anticariogénico, degradando ou convertendo os compostos pré-cariogénicos em compostos menos perigosos, (tema abordado no capítulo seguinte).

**Tabela II:** Efeitos e mecanismos de acção dos probióticos em diferentes áreas clínicas. (Adaptado de Rowland *et al.*, 2008).

	<b>Condição</b>	<b>Mecanismo de acção</b>
Benefício geral para o intestino	Síndrome do intestino irritável, sintomas que geralmente afectam o tracto gastrointestinal (obstipação, diarreia não-patogénica, flatulência)	Alterações microbiológicas ou nas actividades intestinais
	Intolerância à lactose	Distribuição de organismos capazes de degradar a lactose
<b><u>Cárie dentária</u></b>	Alergia (eczema atópico, a alergia ao leite, artrite reumatóide)	Translocação; efeito de barreira
		Alterações nas populações e actividade das bactérias orais, ou modificação da capacidade de adesão aos dentes
	Cancro; Mutações; Tumores	Inibição da carcinogénese intestinal, estimulação do sistema imunológico; delecção mutagénica
	Diarreias causadas por antibióticos, diarreia por rotavírus, colite causada por <i>Clostridium difficile</i> , diarreia nosocomial	Exclusão competitiva; translocação ou efeito barreira, resposta imunológica
	<i>Helicobacter pylori</i>	Actividade anti-patogénica
	Imunomodulação (vacinação)	Interacção com células imunológicas ou célula receptoras que aumentam a fagocitose dos glóbulos brancos, aumento das IgA, indução da síntese de citocinas
	Inflamação intestinal; colite ulcerosa; Doença de Crohn	Regulação a reacção imunológica
	Crescimento excessivo de bactérias intestinais	Actividade anti-microbiana
	Vaginose; infecções urinárias	Actividade anti-patogénica; exclusiva competitividade
Outros Benefícios	Dislipidemia	Desconjugação dos ácidos biliares
	Hipertensão	Peptídeos derivados da fermentação agem como inibidores da enzima conversora de angiotensina

#### 4. Tipos de Probióticos

Os probióticos são compostos por diversos tipos de espécies, dividindo-se principalmente em dois grandes géneros: os *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*. No entanto, existem também outras espécies que não integram estes géneros como: *Streptococcus thermophilus* e *Escherichia coli*, estando associado o seu uso na terapêutica de outras patologias. A Tabela III, resume os diversos tipos de bactérias probióticas e o seu efeito terapêutico (Guarner *et al.*, 2008; Stamatova *et al.*, 2009).

**Tabela III:** Bactérias com actividade probiótica comprovada. (Adaptado de Stamatova *et al.*, 2009).

<b>Patologia</b>	<b>Probiótico</b>	<b>Efeito observado</b>
Doença inflamatória intestinal	<i>Bifidobacterium breve</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> , <i>Lactobacillus casei</i>	Redução dos sintomas na doença de Crohn em 7 de 10 doentes
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Manutenção da remissão em pacientes com colite ulcerosa
	<i>Escherichia coli</i>	Manutenção da remissão em pacientes com colite ulcerosa
	<i>Escherichia coli</i> , <i>Lactobacillus reuteri</i>	Aumento da proporção de CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> em células do sangue periférico
Vírus/organismos patogénicos ou diarreia causada por antibiótico	<i>Escherichia coli</i>	Redução da duração da diarreia em 2 a 3 dias
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Redução do risco de diarreia
	<i>Lactobacillus casei</i>	Efeito positivo sobre a consistência das fezes
Intolerância à lactose	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> ; <i>Streptococcus thermophilus</i>	Maior assimilação da leucina aguda
	<i>Bifidobacterium longum</i> , <i>Bifidobacterium Animalis</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i>	Alívio dos sintomas
Vaginoses	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Lactobacillus fermentum</i>	Estabilização da flora comensal
Alergias	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Bifidobacterium animalis</i>	Redução da formação eczema
	<i>Lactobacillus paracasei</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Bifidobacterium animalis</i> <i>subsp. lactis</i>	Modulação dos parâmetros imunológicos periféricos

#### 4.1. Género *Bifidobacterium*

As *Bifidobacterium* são caracterizadas por serem bactérias Gram-positivo, não formadoras de esporos, desprovidas de flagelos, catalase-negativas e anaeróbias (Gomes *et al.*, 1999). No que diz respeito à sua morfologia, podem ter várias formas incluindo bacilos curtos, curvados ou bifurcados. Actualmente, o género *Bifidobacterium* inclui cerca de trinta espécies, sendo de origem animal, origem em águas, águas residuais e de leite fermentado. Estas têm a particularidade de apresentar uma boa tolerância ao oxigénio, ao contrário de outras que integram este género. De entre as bactérias pertencentes ao género *Bifidobacterium*, destacam-se *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium longum* e *Bifidobacterium thermophilum* (Stamatova *et al.*, 2009). Cinco espécies de *Bifidobacterium* de origem humana (*Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis* e *Bifidobacterium adolescentis*) têm atraído a atenção da indústria para a produção de produtos lácteos fermentados com fins terapêuticos (Stamatova *et al.*, 2009). Actualmente, alguns estudos científicos efectuados *in vivo* utilizando animais e humanos têm demonstrado que o consumo destes microrganismos tem acção sobre a flora do tracto gastrointestinal (GI). Estirpes seleccionadas sobrevivem no estômago e no trânsito intestinal. Para resistir às condições do tracto GI devem ser ricas em proteases, apresentar uma boa tolerância ao suco biliar, assim como, a capacidade de resistir a condições ácidas. Conjuntamente, devem ser capazes de competir com a flora comensal e com os metabolitos provenientes dessa flora, nomeadamente bacteriocinas, ácidos orgânicos e agentes anti-microbianos (Klaenhammer *et al.*, 1999).

#### 4.2. Género *Lactobacillus*

O género *Lactobacillus* integra o centro dos agentes probióticos e foi isolado a partir das fezes de lactentes amamentados com leite materno. (Stamatova *et al.*, 2009). O género *Lactobacillus* conta hoje com cinquenta e seis espécies reconhecidas, das quais cinco contêm subespécies (*delbrueckii*, *aviarius*, *salivarius*, *coryniformis* e *paracasei*) (Gomes *et al.*, 1999). Dezoito destas subespécies estão presentes na flora intestinal dos humanos. De entre as bactérias lácteas, destacam-se *Lactobacillus acidophilus*,

*Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus casei* - *subsp. paracasei* e *subsp. tolerans*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus salivarius* (Stamatova *et al.*, 2009). O género *Lactobacillus* é composto por bacilos Gram-positivo, regulares e não esporulados. Possuem morfologia celular variada entre bacilos longos e finos e por vezes, pequenos bacilos curvados (Stamatova *et al.*, 2009).


Estas bactérias são micro-aeróbios que quando cultivados em meios sólidos, desenvolvem-se melhor em anaerobiose ou baixa pressão de oxigénio. Nos meios usuais de crescimento, os *Lactobacillus* raramente produzem pigmentos (cor da pigmentação amarelados, laranja-ferrugem ou vermelho-tijolo). Crescem a temperaturas que variam de 2°C a 53°C, com valores óptimos, geralmente, de 30°C a 40°C e pH óptimo entre 5,5 e 6,2. A taxa de crescimento é frequentemente reduzida em meios neutros ou alcalinos. Nas diversas espécies a redução do teor de nitrato não é positiva no seu crescimento. A identificação por este método bioquímico pode ser efectuada pela execução de diversos testes que avaliam as características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas caracterizando o probiótico fenotipicamente (Stamatova *et al.*, 2009).

## **5. Formulações comerciais de probióticos**

Actualmente, o estudo com probióticos já se encontra num nível avançado cientificamente e também industrialmente, com estudos já realizados *in vivo*. Com este desenvolvimento tecnológico a ciência já possibilitou várias formulações farmacêuticas para o uso humano no tratamento ou prevenção de várias doenças sendo considerados ingredientes da alimentação humana com funções terapêuticas (Kaur *et al.*, 2002).

Assim sendo, na Tabela IV estão disponíveis algumas formulações comerciais já disponíveis no mercado para uso humano.

**Tabela IV:** Formulações comerciais de probióticos. (Adaptado de: Kaur *et al.*, 2002; CulturedCare-ProbioticsGum, 2010).

Nome do produto	Bactérias probióticas presentes	Descrição e propriedades do produto
Probiata® tablets	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Bactérias pré-adaptadas para o crescimento no intestino humano. Cada comprimido contém um bilhão de células vivas, a preparação não necessita de refrigeração e é resistente ao calor. Sobrevive quando tomadas com alimentos resistentes ao ácido do estômago (pH 3-4)
TH1 Probiotics	<i>Bifidobacterium longum</i> , <i>Saccharomyces boulardi</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i>	Contém um bilhão <i>Bifidobacterium longum</i> por porção, juntamente com 1 a 2 bilhões <i>Saccharomyces boulardi</i> , <i>Lactobacillus casei</i> e <i>Lactobacillus plantarum</i> são tratadas termicamente, podendo ser seguro o uso em pessoas imunocomprometidas.
VSL#3®	Três espécies de <i>Bifidobacterium</i> , quatro espécies de <i>Lactobacillus</i> e <i>Streptococcus salivarius ssp. thermophilus</i>	Coloniza o intestino e ajuda na remissão da colite ulcerosa nos pacientes intolerantes ou alérgicas ao ácido 5-aminossalicílico.
BLIS  ™	<i>Streptococcus salivarius</i>	Um chiclete que contém uma espécie probiótica que produz naturalmente substâncias semelhantes a bacteriocinas inibidoras, promovendo uma saúde oral em geral e ajuda a prevenir cáries e periodontites.

## **6. Efeitos adversos dos probióticos**

Os probióticos actualmente usados têm a vantagem de não apresentarem efeitos secundários, em que o efeito benéfico é similar ao efeito dos microrganismos pertencentes à flora comensal. No entanto, a OMS teme a implantação destas novas terapias, podendo propiciar o surgimento de agentes patogénicos mais agressivos e resistentes à antibioterapia de primeira linha. No entanto, além da comprovação da actividade dos probióticos, um estudo mais aprofundado deve ser feito de modo, a compreender os mecanismos e os seus possíveis efeitos adversos inerentes (Badaró *et al.*, 2009).

### **III – Cárie Dentária**

#### **1. Definição de Cárie dentária**

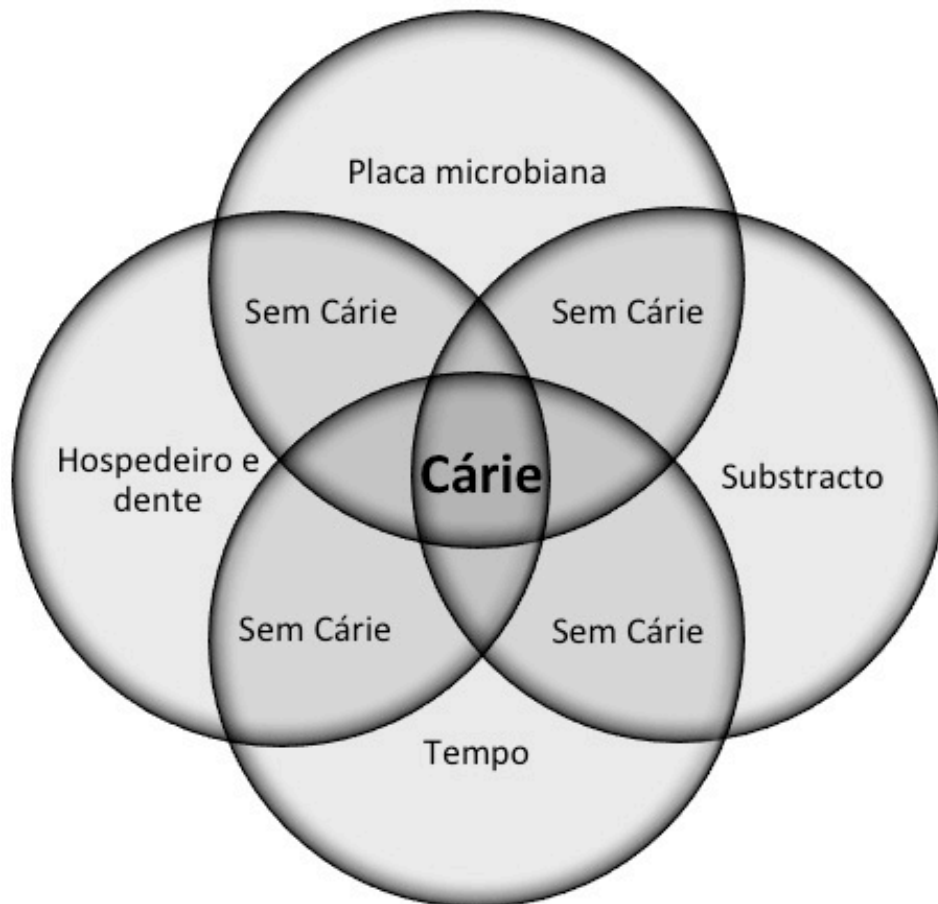
A definição da cárie dentária refere-se à destruição localizada dos tecidos dentários duros, sensíveis ao ácido, provocado pelos produtos da fermentação bacteriana a partir dos hidratos de carbono. Maioritariamente bactérias como *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* e *Lactobacillus spp.* presentes no biofilme dentário (descreve-se como uma comunidade microbiana relativamente indefinida associada a uma superfície do dente ou qualquer outro material) produzem ácidos orgânicos que desencadeiam a desmineralização da rede cristalina do dente (Chandki *et al.* 2011; Chen *et al.*, 2010; Chikindas *et al.*, 1997 e Islam *et al.*, 2007).

Segundo o Senhor Keyes (1960), é uma patologia de carácter infeccioso, em que a consequência predominante é a degradação dos dentes. Embora não seja uma ameaça directa para vida humana, provoca dores e desconfortos físicos. A primeira etapa da cariogénese é detectável pelo aparecimento de uma mancha branca, que mais tarde causa cavitações e, depois perda do dente. Este tipo de lesões é normalmente indolor até atingir o sistema vascular e nervoso do dente (Islam *et al.*, 2007; Stamatova *et al.*, 2009).

#### **2. Origem e processo da Cárie Dentária**

A saúde oral procura uma prevenção das doenças orais, nomeadamente da cárie dentária. O seu difícil controlo constitui um dos maiores problemas da saúde humana oral para todo o mundo, sendo uma patologia que afecta todas as classes etárias e sociais (Almeida, 1999; Calado, 1993 e Islam *et al.*, 2007). A cárie é uma patologia multifactorial, em que cada factor é essencial e indissociável de todos os outros, ou seja, a origem da cárie deriva da junção de quatro grandes factores (Samaranayake, 2006):

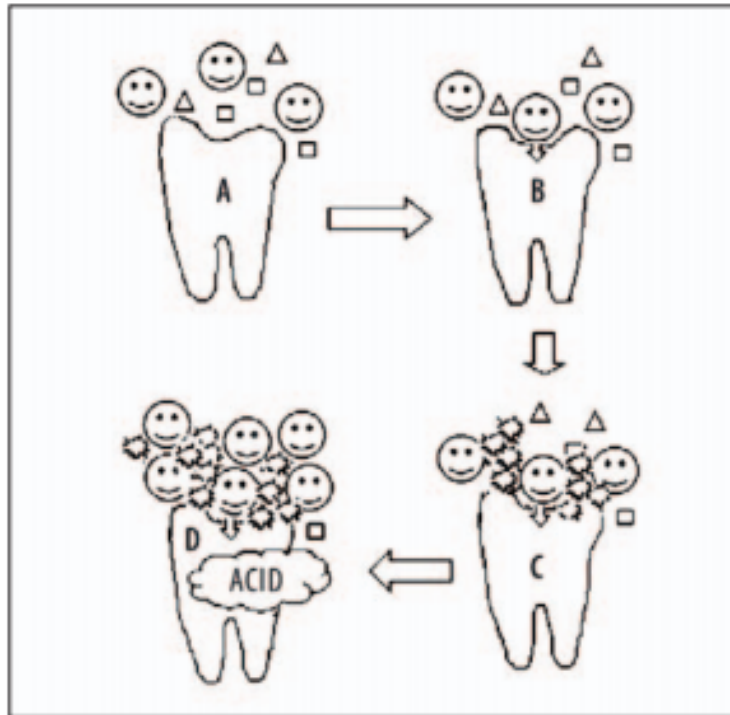
- o factor do hospedeiro, sendo necessário a existência de uma estrutura, alvo composta por esmalte e dentina, os dentes, uma higiene oral não cuidada, factores imunitários e genéticos (Samaranayake, 2006);
- a existência de uma dieta rica em açúcares, em que facilita o processo de adesão e despoleta a actividade cariogénica (Samaranayake, 2006);
- ambiente microbiológico específico, a existência de uma flora comensal rica em diversos agentes anaeróbicos, capazes de criar uma placa dentária (biofilme), que despoleta um ambiente propício para a iniciação desta patologia (Samaranayake, 2006);
- o tempo não é um factor físico, mas importante para a funcionamento de todos os factores (Samaranayake, 2006).



**Figura 1:** Interação dos principais factores etiológicos para o surgimento da cárie dentária (todos os quatro factores têm que actuar simultaneamente para que a cárie ocorra). (Adaptado de: Samaranayake, 2006).

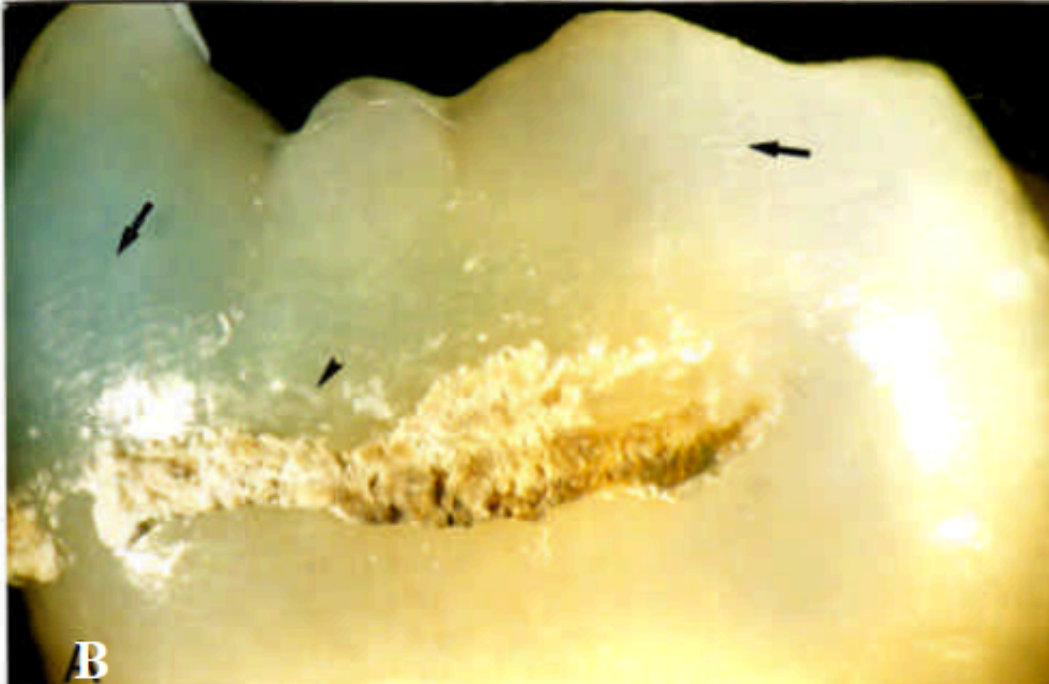
Assim, podemos descrever que a cavidade oral é um habitat bastante complexo sendo composta por uma grande diversidade de espécies microbianas, estima-se com mais de mil espécies de bactérias. Por exemplo, o dorso da língua possui um ambiente microbiológico único, em que um terço das espécies orais estão exclusivamente ancoradas na língua não podendo ser isoladas a partir de outro nicho oral (Aas *et al.*, 2005; Kazor *et al.*, 2003; Keijser *et al.*, 2008 e Stamatova *et al.*, 2009).

A presença de bactérias num ambiente propício à colonização pode desencadear a formação de um biofilme (denominado também de placa dentária), composto predominantemente por *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus constellatus*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus salivarius*, e *Streptococcus sanguis*, *Lactobacillus spp.*, e muitas outras espécies de bactérias, (cerca de trezentas, e resíduos orais acumulados) em torno do tecido dentário (Chikindas *et al.*, 1997; Islam *et al.*, 2007 e Stamatova *et al.*, 2009). À medida que aumenta a espessura do biofilme, cria-se uma barreira à entrada do oxigénio até às bactérias mais internas, formando-se um ambiente pobre em oxigénio. As bactérias totalmente aeróbias morrem e as anaeróbias facultativas, tal como *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* e *Lactobacillus salivarius* ganham competitividade, uma vez que o único processo possível é em anaerobiose - fermentação. Pelo processo fermentativo há a degradação dos açúcares, produzindo-se ácido láctico (figura 2) (Balakrishnan *et al.*, 2000; Islam *et al.*, 2007; Pham *et al.*, 2009 e Sousa, 2000).



**Figura 2:** Etapas condutoras à colonização e infecção por *Streptococcus mutans* e outras bactérias produtoras de ácido, na superfície do dente. A- Flora normal oral; B- Início da adesão, mediado por *Streptococcus mutans*; C- Síntese de açúcares extracelulares resultando na agregação de *Streptococcus mutans*; D- O ácido libertado pelas células agregadas leva a desmineralização do dente e cavitação. ☺ □ △ - *Streptococcus mutans* e outras bactérias; ↓- Processo de adesão; 🍬- Sacarose e placa dentária. (Adaptado de: Islam *et al.*, 2007).

Este ambiente, leva consequentemente à acumulação do ácido láctico, desencadeando uma redução do pH, causando uma reacção no esmalte dentário - a erosão. A acção do ácido aumenta os espaços intercrystalinos existentes entre os cristais do esmalte, permitindo a entrada aumentada de água entre eles, deixando-os mais desarranjados. Isto é denominado de lesão cariiosa activa (por debaixo do biofilme) (Figura 3) (Balakrishnan *et al.*, 2000; Islam *et al.*, 2007 e Sousa, 2000).



**Figura 3:** Cárie activa por baixo da placa espessa (seta mais pequena) (Adaptado de: Sousa, 2000).

Após alguns dias é possível detectar ao microscópio a presença da erosão cariosa no esmalte, colonizada por bactérias cariogénicas. Clinicamente a superfície do esmalte lesionada é vista como uma área opaca e sem brilho. Depois de algum tempo, a desmineralização progride para o interior do esmalte, permitindo a retenção de alguns iões que são liberados para o exterior. A camada superficial é menos desmineralizada que a camada interior que é o centro da lesão, no entanto, à medida que progride o processo a camada superficial sofre de igual modo erosão. O processo cariogénico prossegue cada vez mais até atingir o sistema vascular, aproximando a possível perda do dente. A gravidade desta patologia além da perda dentária é a criação de uma porta aberta à entrada de agentes infecciosos na corrente sanguínea (Islam *et al.*, 2007; Sousa, 2000).

### 2.1. Factores de virulência de bactérias cariogénicas *Streptococcus* spp.

As espécies pertencentes ao grupo *Streptococcus* spp., nomeadamente *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* são membros com elevada importância na flora comensal da boca, sendo consideradas bactérias virulentas. Sendo agentes anaeróbios facultativos, podem sobreviver em qualquer lugar da cavidade oral, onde fermentam a maioria dos açúcares, como a glicose, sacarose, lactose, álcoois entre outros. Nomeadamente, destas duas espécies de bactérias a mais importante na indução do processo de cárie é o *Streptococcus mutans*, uma vez que a sua superfície celular é composta por uma proteína que medeia a aderência no tecido dentário do hospedeiro (Islam *et al.*, 2007) e é o mais rápido e maior produtor de ácido láctico (Dinis *et al.*, 2009). O *Streptococcus sobrinus* segundo estudos, declaram que esta bactéria está mais associada a uma actividade cariogénica sobre cáries já activas. Deste modo, é importante a descoberta de métodos no combate à virulência destas bactérias (Dinis *et al.*, 2009; Islam *et al.*, 2007).

## 3. Estratégias clássicas de prevenção à cárie

### 3.1. Hábitos e higiene

Apesar das diferentes causas da cárie, a principal causa é a negligente higiene oral. Ou seja, uma escovagem frequente e cuidada é um bom método para remover bactérias e substâncias fermentáveis prevenindo assim, a formação da cárie dentária e outras patologias periodontais. A saliva é um fluido que tem diversas funções, uma delas é a capacidade tampão, uma outra é a capacidade de lavagem da boca. Durante o sono a saliva flui menos o que aumenta o período de permanência das bactérias e das substâncias fermentáveis (Stamatova *et al.*, 2009). A permanência de resíduos alimentares na boca (sendo compostos derivados de açúcares que desencadeia a fermentação em processo anaeróbio) ajuda no processo de cárie (Islam *et al.*, 2007).

Alimentos que envolvam mastigação extensa estimulam a produção de saliva e, portanto, têm um baixo potencial cariogénico. Substituição dos hidratos de carbono fermentáveis por xilitol, sacarina e aspartame reduz a cárie (Naylor, 1986).

O consumo de maçãs e cenouras actua como escova de dentes natural e permite limpar a superfície do dente durante mastigação (Naylor, 1986).

### 3.2. Incorporação de flúor

A cárie dentária é essencialmente uma doença de desmineralização. O flúor actua como substância activa para remineralizar o dente. A administração tópica de flúor no dente após a sua erupção é mais eficaz do que a sua ingestão na dieta. Portanto, é importante que as pastas dentárias e os colutórios conttenham flúor, pois além da acção de remineralização também ajuda na inibição do metabolismo bacteriano (Islam *et al.*, 2007).

### 3.3. Agentes Quimioprolifáticos

Os quimioprolifáticos são agentes usados na prevenção da cárie dentária, como agentes catiónicos, tais como clorexidina e cloreto de cetilpiridínio, agentes aniónicos como o sulfato de sódio e agentes não-iónicos como triclosan. Estes agentes são geralmente usados em colutórios orais ou pastas dentífricas, mas também podem ser usados em forma de geles ou vernizes para uma libertação lenta de modo a alcançar um efeito inibidor prolongado (Chen *et al.*, 2010).

A clorexidina é um dos compostos mais estudados e usados com actividade contra a placa dentária. Foi possível mostrar que este composto tem capacidade de inibir o crescimento de bactérias e a formação do biofilme. É um agente com carga positiva que se liga à superfície das membranas dos *Streptococcus mutans*, causando a lise da parede celular (Chen *et al.*, 2010; Islam *et al.*, 2007).

O Triclosan é um outro composto que pode ser integrado nas pastas dentífricas que actua sobre a inibição da placa bacteriana, no entanto a sua estabilidade na boca está comprometida, e deste modo é necessário um copolímero que aumente o seu período de retenção. Diversos estudos ainda serão necessários para garantir a sua eficácia (Chen *et al.*, 2010).

Um dos problemas mais comuns no uso de compostos químicos na cárie dentária é a incapacidade de manter a concentração inibitória mínima de um agente na cavidade oral. A aplicação de cremes dentários ou colutórios tem um efeito benéfico momentâneo, pois no momento a seguir à sua aplicação a concentração inicial começa logo a diminuir devido à elevada dinâmica da cavidade oral (Chen *et al.*, 2010).

Diversos estudos já foram efectuados actuando sobre o *Streptococcus mutans* de modo a reduzir a sua actividade fermentadora evitando a redução do pH, por recurso a novas técnicas, como a encapsulação dos agentes quimioproliféricos. Porém, muitos outros estudos ainda são necessários para aprimorar as técnicas no combate à cárie dentária (Chen *et al.*, 2010).

#### 3.4. Vacinas

A cárie dentária é uma das doenças infecciosas mais prevalentes em seres humanos despoletando a necessidade científica do desenvolvimento de uma vacina contra a cárie dentária. *Streptococcus sobrinus* e *Streptococcus mutans* são conhecidos como os responsáveis primários pela cárie dentária. Os esforços efectuados para a criação de uma vacina eficaz e segura contra a cárie dentária tem-se direccionado para os factores de virulência destas bactérias (Dinis *et al.*, 2009).

Deste modo, têm sido investigadas terapêuticas orais de imunização particularmente contra *Streptococcus sobrinus* com o uso da proteína Enolase recombinante. É uma proteína ubíqua, sendo utilizada em várias doenças auto-imunes. Os resultados obtidos mostraram que houve uma redução significativa das pontuações sobre o esmalte e uma redução da colonização de *Streptococcus sobrinus*. Tudo isto devido à actividade de imunização induzida, desencadeada por esta proteína que despoleta uma elevada produção de anticorpos IgA específicos para rEnolase, estando este resultado directamente relacionado com a redução do número de bactérias e por consequência menor numero de lesões dentárias (Dinis *et al.*, 2004; Dinis *et al.*, 2009; Islam *et al.*, 2007 e Veiga-Malta *et al.*, 2004).

O interesse na proteína rEnolase como um antígeno para a criação de uma vacina é um forte candidato para o combate à cárie dentária induzida por bactérias do grupo

*Streptococcus* spp. No entanto, mais estudos serão necessários para a validação destes resultados (Dinis *et al.*, 2009).

## IV – O Uso de Probióticos na Cárie Dentária

### 1. Modo de acção

Com o desenvolvimento da tecnologia e o avanço na informação sobre as garantias dos probióticos, a indústria começou a efectuar várias experiências na incorporação deste tipo de microrganismos em produtos lácteos e fermentados, como por exemplo em iogurtes. Também surgiu a ideia de incorporar os probióticos em pastilhas mas, a sua ingestão é questionável devido ao período de permanência no organismo não garantindo a sua viabilidade (Stamatova *et al.*, 2009).

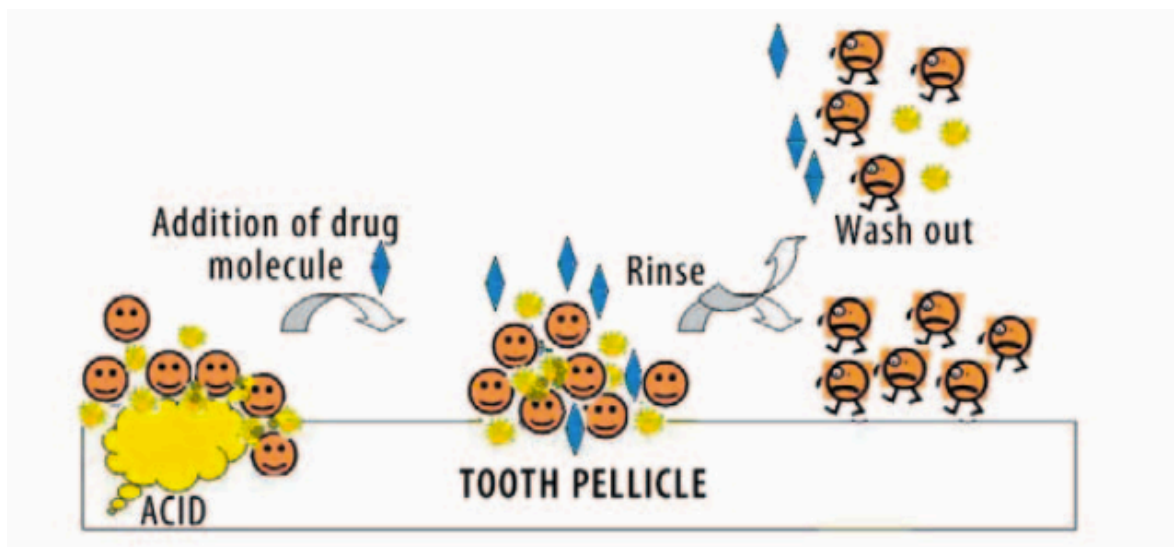
Logo após a entrada do probiótico na cavidade oral, este é exposto primeiro à saliva que medeia o contacto com os tecidos orais. Durante esta primeira etapa de contacto a sobrevivência e resistência a factores ambientais na boca são de grande importância. Proteínas salivares, tais como lisozima, lactoferrina, peroxidase, histatina salivar, cistatinas e secreção de IgA pode colectivamente afectar a viabilidade ou morfologia da superfície celular do probiótico, comprometendo a sua adesão e a actividade metabólica (Stamatova *et al.*, 2009).

O papel da saliva na proliferação microbiana pode ser contraditório, podendo ter um efeito benéfico ou efeito preventivo da cárie dentária. Contudo, o probiótico deve ser capaz de aderir a superfícies dentárias e integrar nas comunidades bacterianas que compõem o biofilme dentário, coisa que a saliva pode reduzir o seu período de permanência, comprometendo assim o modo de acção do probiótico (Chen *et al.*, 2010; Bonifait *et al.*, 2009 e Stamatova *et al.*, 2009).

Os probióticos podem apresentar uma capacidade de auto-agregação. Após, a ligação com as bactérias já co-agregadas (bactérias patogénicas), estes desencadeiam tensões de hidrofobicidade de superfície celular que pode melhorar a colonização do probiótico e reduzir as capacidades do agente patogénico, nomeadamente na formação de biofilmes comprometendo a formação da cárie dentária e de outras patologias (Stamatova *et al.*, 2009).

Estudos *in vitro*, relataram que o uso da agregação de probióticos do género *Lactobacillus* desencadeou diversos graus de hidrofobicidade dificultando a formação

do biofilme, reduzindo a criação de um ambiente ácido por parte do *Streptococcus mutans*. Ou seja, os probióticos têm uma acção inibidora na formação do ambiente bacteriano patogénico, através da competição dos locais de ligação das bactérias nos tecidos do hospedeiro e competição de nutrientes (figura 4), uma vez que os probióticos são capazes de utilizar nutrientes comuns aos dos agentes patogénicos (hidratos de carbono, por exemplo) diminuindo a produção de ácido (Badaró *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2010 e Bonifait *et al.*, 2009; Islam *et al.*, 2007 e Stamatova *et al.*, 2009).



**Figura 4:** Uma possível abordagem para o controlo da cárie dentária. 😊 / 😞 - *Streptococcus mutans* – Bactérias da cavidade oral, agregadas na superfície do dente, desencadeiam a fermentação dos açúcares (nutrientes), levando à produção de ácido, aumentando a patogencidade. 🟡 - Sacarose (nutrientes). 🔵 - Possível probiótico, agente capaz de competir com a bactéria reduzindo a produção de ácido. Despoleta uma inibição do processo de adesão e cariogénise. (Adaptado de: Islam *et al.*, 2007).

Os probióticos sobre as células epiteliais orais podem desempenhar um papel essencial na defesa contra os microrganismos através da produção de moléculas antimicrobianas, como citocinas e quimiocinas necessárias para o recrutamento de leucócitos (Kagnoff *et al.*, 1997).

Estudos demonstraram que o contacto de bactérias probióticas com epitélio oral induz a secreção de IL-8 e TNF- $\alpha$  (Stamatova *et al.*, 2009). O estímulo da imunidade do

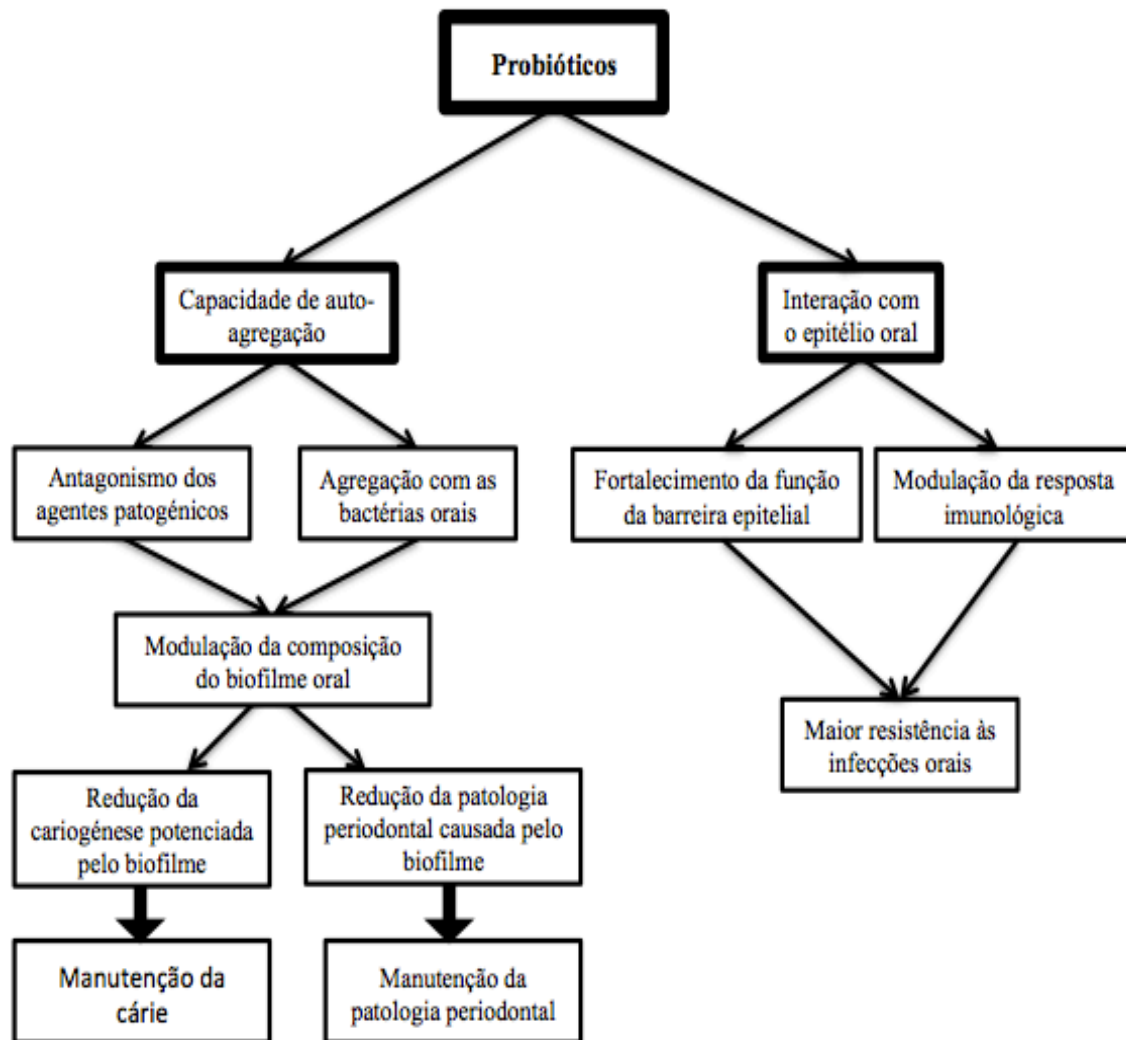
hospedeiro, através do aumento dos níveis de anticorpos e o aumento da actividade dos macrófagos, tornando-se num mecanismo antimicrobiano com acção no combate à cárie dentária (Chen *et al.*, 2010; Saad, 2006).

Estes probióticos podem ser administrados por diversos veículos, como queijos, iogurtes, leites ou então, podem também ser veiculados em, soluções aquosas, através de uma palhinha, pastilhas, gelatinas e chupetas (Çaglar *et al.*, 2008a). Na Figura 5 representa um estudo efectuado com um dispositivo que contém uma bolsa com um probiótico. Tem 10 orifícios, cada um com cerca de 0,5 mm de diâmetro, por onde o probiótico é totalmente dissolvido até à cavidade oral em aproximadamente dez a doze minutos. Este estudo envolveu vinte mulheres jovens saudáveis, divididas em dois grupos de dez indivíduos. O grupo A foi sujeito a um dispositivo médico contendo o probiótico e o grupo B foi sujeito a um dispositivo médico placebo, sendo o grupo controlo. Ambos os grupos administraram este dispositivo durante dez dias. Os resultados foram significativamente positivos em que houve uma redução do número de colónias de *Streptococcus mutans* para o grupo A. É um estudo piloto em que demonstra um possível dispositivo médico eficaz em veicular um probióticos com aplicação na cavidade oral (Çaglar *et al.*, 2008a).



**Figura 5:** Dispositivo médico contendo um probiótico com aplicação na cavidade oral. (Adaptado de: Çaglar *et al.*, 2008a).

Assim sendo, o espectro de actividade dos probióticos pode ser dividido em efeitos nutricionais, fisiológicos e antimicrobianos como se mostra na Figura 6 (Chen *et al.*, 2010; Saad, 2006).



**Figura 6:** Possíveis actividades probióticas na cavidade oral. (Adaptado de Stamatova *et al.*, 2009).

## 2. Estudos laboratoriais

A cariogénese é um problema de saúde grave, indolente, mas que despoleta aos investigadores o interesse de efectuar diversos estudos, de modo, a descobrir o efeito deste tipo de microrganismo biológico, os probióticos, sobre o crescimento de microrganismos cariogénicos, principalmente *Streptococcus mutans* e *Streptococcus*

*sobrinus*. Esta evolução foca terapias bacteriostáticas ou bactericidas, uma vez que a cárie dentária é uma doença infecciosa em que a actividade dos antibióticos não é bem sucedida (Badaró *et al.*, 2009; Çaglar *et al.*, 2005a e Jeon *et al.*, 2011).

Os *Lactobacillus* tem sido relacionados já à diversas décadas como bactérias que permitem o melhoramento da funcionalidade de sistema gastrointestinal, portanto este pode ter um importante papel na flora comensal da boca reduzindo o processo de formação da cárie dentária (Çaglar *et al.*, 2005a; Hojo *et al.*, 2005). Estas bactérias são produtoras de ácido láctico, sendo bactérias comensais muito acídicas. Um estudo investigou que os *Lactobacillus salivarius* são altamente cariogénicos em ratos, mesmo com a administração de sete espécies de probióticos do género *Lactobacillus*, a quantidade de *Lactobacillus salivarius* aumentou e o número de *Streptococcus mutans* não sofreu qualquer alteração. Ao contrário deste resultado, há muitos estudos sobre os probióticos com potencialidades terapêuticas (Pham *et al.*, 2009). Para o *Lactobacillus spp.* existem várias espécies já utilizadas com efeito probiótico, sendo eles *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, bactérias da flora comensal da boca como *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus crispatus* e *Lactobacillus rhamnosus*, podem ser encontradas, embora não são espécies específicas da flora oral (Badaró *et al.*, 2009; Çaglar *et al.*, 2005a; Hojo *et al.*, 2005 e Pham *et al.*, 2009).

O desenvolvimento de novos caminhos e técnicas para o bloqueio das patologias orais infecciosas podem reduzir a destruição dos tecidos associados à infecção oral ou à inflamação crónica. Tem sido estudada através do uso dos *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus johnsonii* e *Bifidobacterium lactis* avaliando o efeito dos probióticos na indução e manutenção da tolerância oral com acção nas beta-globulinas de bovinos estudadas em camundongos, sendo possível observar efeitos positivos (Prioult *et al.*, 2003)

Estudos efectuados em *Lactobacillus* avaliaram o efeito destas bactérias sobre o modo de acção na competição de nutrientes. Foi possível observar que desencadeiam a hidrólise de proteínas em aminoácidos e dipéptidos, estimulando o crescimento dos *Streptococcus*, devido à redução do pH na cavidade oral. No entanto, a alteração de pH permitiu que houvesse uma aumento significativo das bactérias probióticas, enquanto que o número de *Streptococcus mutans* não sofreu qualquer alteração. Assim sendo, a

colonização pelos probióticos sobrepôs-se à cultura de *Streptococcus*, permitindo reduzir a acção cariogénica sobre o tecido dentário (Çaglar et al., 2005a).

Vários estudos efectuados sugerem que os biofilmes desenvolvidos nos dentes ou gengivas são um óptimo alvo a atingir, uma vez que as bactérias que estão presentes nestes biofilmes são maioritariamente patogénicas. A capacidade de incorporar uma bactéria probiótica no interior do biofilme desencadeia a expulsão das bactérias patogénicas devido a ocupação do espaço pelos probióticos (Çaglar et al., 2005a).

Um estudo efectuado, utilizado desta vez o *Lactobacillus rhamnosus* permitiu testar a capacidade no meio e constatou-se que o *Lactobacillus rhamnosus* consegue inibir a colonização dos agentes patogénicos. Em 23 microrganismos lácteos estudados, dois apresentaram efeito positivo, sendo capazes de aderir à saliva. Esta adesão deve-se, essencialmente, ao facto destes microrganismos serem revestidos por hidroxiapatite com receptores iguais aos do *Streptococcus sobrinus*. O *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus lactis* foram incorporados com sucesso num biofilme em conjunto com mais cinco espécies bacterianas provenientes da flora comensal da placa supragengival. Neste sistema, os *Lactobacillus lactis* foram capazes de controlar o crescimento das bactérias orais e em particular diminuir a colonização de *Streptococcus oralis*, *Veillonella dispar*, *Actinomyces naeslundii* e de *Streptococcus sobrinus*, espécies capazes de desenvolver cáries (Çaglar et al., 2005a).

O efeito inibidor do *Lactobacillus* contra supostos agentes patogénicos orais, foi comprovado num estudo recente com dez espécies orais de *Lactobacillus*, mais especificamente *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus mucosae*, *Lactobacillus oris*, *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus vaginalis*. O efeito inibitório contra a actividade patogénica de periodontite e cárie dentária, na maioria dos *Lactobacillus* estudados. No entanto, a maior actividade contra estas patologias foi associada aos *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus salivarius*, os quais foram capazes de inibir o crescimento de *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, bem como, Gram-negativo anaeróbios associados a infecções periodontais, tais como, *Porphyromonas gingivalis* e *Actinobacillus Aggregatibacter* (Teanpaisan et al., 2011).

Um estudo recente investigou as propriedades adesivas dos *Lactobacillus*, sendo um factor importante para a sua selecção. Deste modo, avaliou-se a formação de um biofilme num vidro e em discos que continham saliva com hidroxiapatite, tendo-se demonstrado a capacidade de adesão por parte de algumas das bactérias na amostra de saliva com hidroxiapatite. Estes resultados mostram uma possível técnica de selecção na escolha do tipo de probióticos (Samot *et al.*, 2011).

Outro estudo recente teve como objectivo principal avaliar o efeito de um probiótico sobre *Streptococcus mutans* em crianças. O estudo compreendia 150 crianças divididas em três grupos. Ao grupo A foi-lhe administrado um placebo. O grupo B recebeu uma mistura composta por uma combinação de *Lactobacillus rhamnosus* e uma outra espécie do género Bifidobacterium. Ao grupo C administrou-se uma mistura aquosa com um pó liofilizado com *Bacillus coagulans*. Este método foi efectuado durante catorze dias para todos os grupos. Os resultados foram significativamente positivos, tendo-se observado uma redução do número de colónias de *Streptococcus mutans* tanto para o grupo B e C, o que estima a possibilidade do uso de *Bacillus coagulans* como agentes terapêuticos. Este estudo deixa em aberto a possibilidade do surgimento de novos probióticos mesmo não integrando os géneros predominantes já referidos, como o grupo *Bifidobacterium spp.* e *Lactobacillus spp.* (Jindal *et al.*, 2011).

Um outro estudo avaliou se o consumo de gelados contendo *Bifidobacterium* pode ou não ajudar na prevenção da cárie. Deste modo, o estudo baseou-se num grupo sujeito a dez dias de experiência com a ingestão de 100 mL de gelado contendo *Bifidobacterium lactis* uma vez por dia. Um segundo grupo serviu de controlo. Os resultados foram estatisticamente significativos, verificando-se uma redução do número de *Streptococcus mutans* após a ingestão do gelado composto por *Bifidobacterium*. Deste modo, o consumo diário de gelados compostos por bactérias probióticas pode reduzir os níveis de agentes patogénicos na boca (Çaglar *et al.*, 2008b).

Mediante estas investigações inovadoras, que comprovam a actividade e segurança probiótica dos *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, outros estudos têm surgido no sentido que verificar se o uso de probióticos conjugados com agentes químicos usados na actividade preventiva das patologias orais. O intuito é despoletar efeitos sinérgicos benéficos para a prevenção e tratamento da cárie dentária e outras patologias associadas (Aminabadi *et al.*, 2011).

Deste modo, investigou-se a eficácia da clorexidina, colutório desinfectante sobre a estabilidade de *Lactobacillus* probióticos. Este estudo envolveu 105 crianças em três grupos. O grupo A recebeu clorexidina durante duas semanas, o grupo B recebeu iogurte probiótico, constituído por *Lactobacillus rhamnosus*, durante três semanas, o grupo C recebeu clorexidina tal como o grupo A e depois de duas semanas receberam iogurte probiótico tal como o grupo B. Foram avaliados os valores de *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus rhamanosus* uma semana e cinco semanas após o término de cada grupo. A contagem de *Streptococcus mutans* foi significativamente reduzida 24 horas após a interrupção da clorexidina no grupo A, e constante durante cinco semanas. No grupo B, as contagens de *Streptococcus mutans* não apresentaram diferenças significativas cinco semanas após o término do consumo do probiótico, mas o número de *Lactobacillus rhamanosus* foi maior, embora não constante ao longo de cinco semanas. No grupo C, houve uma redução significativa na contagem de *Streptococcus mutans*, um valor constantemente reduzido durante cinco semanas e um aumento significativo na contagem de *Lactobacillus rhamanosus*, durante cinco semanas. A comparação entre os grupos mostrou um aumento significativo de *Lactobacillus rhamanosus* para os grupos B e C, no entanto, este aumento não foi constante no grupo de tratamento B. A clorexidina antes da ingestão de probióticos induz uma colonização mais estável para os *Lactobacillus rhamanosus*, do que a administração do probiótico sozinho. Assim, esta combinação reduz a produção do agente patogénico (na cárie dentária) e induz a estabilidade da colonização agente probiótico (Aminabadi *et al.*, 2011).

Na Rússia foram usadas espécies lácteas não patogénicas, administradas sob a forma de pastilhas probióticas no tratamento da peridontite e gengivite. No grupo controlo foi administrado um colutório comercial "Tantum Verde®". O resultado foi positivo, evidenciando que o probiótico permitiu a normalização da microflora oral (Çaglar *et al.*, 2005a; Grudianov *et al.*, 2002).

Um outro estudo investigou num curto prazo de tempo, o efeito do consumo de iogurte composto por *Bifidobacterium*, probiótico nos níveis salivares de *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus*. O estudo incidiu sobre 21 indivíduos saudáveis divididos em dois grupos: um grupo ingeriu 200 g de iogurte contendo *Bifidobacterium* uma vez por dia e o segundo grupo (controlo) ingeriu iogurte sem bactérias probióticas. Os resultados

obtidos determinaram que houve uma redução estatisticamente significativa de *Streptococcus mutans*. Este estudo demonstrou que as *Bifidobacterium* veiculadas num iogurte podem reduzir os níveis de cárie (Çaglar *et al.*, 2005b).

Um estudo avaliou o impacto causado por dois veículos diferentes para a administração de um probiótico *Lactobacillus reuteri*. Reuniu 120 jovens adultos saudáveis, divididos em quatro grupos. Ao grupo A administrou-se 200 ml de água com o probiótico através de uma palhinha. O grupo B bebeu 200 ml de placebo através de uma palhinha. O grupo C tomou um chiclete composto pelo probiótico e ao grupo D foi dado um chiclete placebo. Todos os grupos foram sujeitos a este estudo durante três semanas. Os resultados mostraram que tanto o grupo A e C sofreram uma redução estatisticamente significativa no número de colónias de *Streptococcus mutans*. Assim, num curto prazo de tempo a ingestão diária deste probiótico veiculado por uma solução e bebido através de uma palhinha ou por chicletes reduzem os níveis de *Streptococcus mutans* (Çaglar *et al.*, 2006).

Um estudo avaliou o efeito do xilitol e de bactérias probióticas veiculadas em chicletes, sobre *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus*. O estudo usou 80 jovens adultos, divididos em quatro grupos. Foram administrados do seguinte modo: grupo A chiclete com bactérias probióticas, grupo B, chiclete com xilitol, grupo C chiclete com xilitol e bactérias probióticas e grupo D, chiclete placebo, durante três semanas após refeições. Os resultados foram estatisticamente significativos, uma vez que houve uma redução salivar de *Streptococcus mutans* para os grupos A e B, o grupo C não obteve alterações significativas. Os valores de *Lactobacillus* não sofreram grandes alterações. Deste modo, este estudo vem comprovar a possibilidade de veicular um probióticos em chicletes, no entanto, combinação com xilitol não parece aumentar o efeito (Çaglar *et al.*, 2007).

Segundo estudos efectuados pelo professor John Tagg, mostram que BLIS K12™ controla bactérias indesejáveis que causam mau hálito, garganta inflamada, aftas, infecções respiratórias e em simultâneo promove uma saúde oral em geral e ajuda a prevenir cáries e periodontites. Veicula esta formulação comercial através de um chiclete considerando a método ideal de "semear" o probiótico por todo o tracto digestivo superior, onde pode colonizar e crescer (CulturedCare-ProbioticsGum, 2010).

De um modo geral, os probióticos devem aderir ao tecido dentário para estabelecer um efeito cáriostático. Portanto, poderão um dia, fazer parte do biofilme no combate às bactérias cariogénicas. Um factor importante é o período de tempo em que o probiótico está em contacto com o dente, sendo ele muito reduzido, assim como, a acção inibidora e preventiva do processo da cárie. Assim sendo, se os probióticos forem incorporados no ambiente da flora comensal da boca, a sua actividade aumentará em prol da melhoria das alternativas terapêuticas das doenças orais (Çaglar et al., 2005a; Grudianov *et al.*, 2002).

### **3. Limitações dos probióticos contra bactérias cariogénicas**

Devem ser tomadas precauções no uso de probióticos para a finalidade de prevenir doenças bucais. Diferentes espécies de bactérias não possuem características que lhes permitam ser seriadas, pois a selecção é rigorosa e complexa (Koduganti *et al.*, 2011; Reid *et al.*, 2006). A maioria das bactérias probióticas tem capacidade proteolítica mínima. Há a possibilidade de invasão bacteriana associada ao uso de probióticos, em indivíduos imunocomprometido ou imunodeficientes, - o caso de um indivíduo ter contraído endocardite com *Lactobacillus rhamnosus*, após tratamento dentário. É necessário uma selecção cuidadosa do agente probiótico a usar, nomeadamente o tipo, o tempo, modo de administração, a idade e a saúde do indivíduo. Por isso, é um desafio muito grande a criação de um probióticos eficaz com tempo de retenção, exposição de modo a colonizar eficazmente no local alvo garantindo um sucesso do mecanismo (Koduganti *et al.*, 2011; Reid *et al.*, 2006).

## V – Conclusão

A preocupação de ter uma boca sã não se limita ao aspecto visual e estético, mas deve existir um cuidado de saúde e higiene oral, pois, a cárie é universalmente reconhecida como uma doença oral multifactorial, em que cada factor exerce a sua própria influência, podendo desencadear problemas graves para a saúde em geral.

O processo de cariogénese é uma patologia indolente e assintomática. No entanto, no seu estado avançado pode atingir a zona vascular e nervosa do dente, causando sintomatologia, caracterizada por dor, desconforto e sensibilidade dentária. O agente responsável por esta patologia, é predominantemente liderado por um conjunto de bactérias autóctones da flora comensal oral, sendo *Streptococcus mutans*, a que apresenta uma elevada capacidade de adesão à superfície do dente aumentando a capacidade de formação de biofilmes. Além disso, estas bactérias têm a capacidade de degradar os açúcares pelo processo de fermentação láctica. Esta potencialidade desencadeia uma diminuição do pH, factor que despoleta a desmineralização do dente, causando desarranjos na estrutura mineral, facilitando a invasão do *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, entre outras bactérias patogénicas associadas.

Como a cavidade oral é composta por uma flora comensal própria, a formação de biofilmes sobre os tecidos dentários é uma constante presença. Esta estrutura, formada naturalmente pela actividade de todos os microrganismos que a compõem, é o principal factor etiológico para despoletar a cárie dentária. Para os profissionais de saúde oral, esta estrutura é um factor preocupante que desencadeia uma batalha na constante informação para um maior cuidado da higiene oral.

Deste modo, há diversos anos que as investigações têm-se dirigido no sentido de conhecer melhor a composição dos biofilmes, e os factores que despoletam este processo. Até aos dias de hoje já foram criados diversos métodos de combate a esta patologia, muitos deles usados em formulas comerciais, como colutórios, pastas dentífricas, entre outros. No entanto, ainda não são alternativas suficientemente capazes de garantir a eficácia num combate preventivo da cárie dentária, abrindo portas para a necessidade de criar novas técnicas mais eficientes.

O surgimento dos probióticos age em prol de uma inibição dos agentes bacteriológicos que despoletam a cárie dentária, pela redução da capacidade de adesão ao dente, por

estruturas imunológicas, por luta de nutrientes e de espaço. A prevenção com probióticos pode ser uma alternativa interessante e promissora para o futuro da saúde oral.

Finalizando, há estudos científicos que mostram boas razões para acreditar no mecanismo de acção dos probióticos, na sua capacidade preventiva e terapêutica da cárie dentária, num futuro próximo.

## VI – Bibliografia

- Aas, J. A., Paster, B. J., Stokes, L. N., Olsen, I., Dewhirst, F. E. (2005). Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, pp. 5721-5732.
- Almeida, C. (1999). *Prevalência em Portugal das doenças orais*. Simpósio de promoção de saúde oral nas escolas e jardins de infância, II, Lisboa.
- Aminabadi, N. A., Erfanparast, L., Ebrahimi, A., Oskouei, S. G. (2011). Effect of chlorhexidine pretreatment on the stability of salivary lactobacilli probiotic in six- to twelve-year-old children. *Caries Research*, 45(2), pp. 148-154.
- Anukam, K. C., Osazuwa, E. O., Ahonkhai, I., Reid, G. (2006). *Lactobacillus* vaginal microbiota of women attending a reproductive health care service in Benin city, Nigeria. *Sexually Transmitted Diseases*, 33(1), pp. 59-62.
- Arbolea, S., Ruas-Madiedo, P., Margolles, A., Solís, G., Salminen, S., Reyes-Gavilán, C. G., Gueimonde, M. (2011). Characterization and in vitro properties of potentially probiotic Bifidobacterium strains isolated from breast-milk. *International Journal of Food Microbiology*, 149(1), pp. 28-36.
- Badaró, A. C. L., Guttierres, A. P. M., Rezende, A. C. V., Stringheta, P. C. (2008). Probiotics Foods: Application as the Promoters of the Humana health – Part 1. *Revista Digital de Nutrição*, 2(3), pp. 1-29.
- Badaró, A. C. L., Guttierres, A. P. M., Rezende, A. C. V., Stringheta, P. C. (2009). Probiotics Foods: Application as the Promoters of the Humana health – Part 2. *Revista Digital de Nutrição*, 3(4), pp. 396-416.
- Balakrishnan, M., Simmonds, R. S., Tagg, J. R. (2000). Dental caries is a preventable infectious disease. *Australian Dental Journal*, 45(4), pp. 235-245.
- Balcão, V., Moutinho, C., Matos, C., Almeida, C. (2005). Alimentos Potenciadores de saúde. *Revista da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa*, 2, pp. 21-32.

Belda-Ferre, P., Alcaraz, L. D., Cabrera-Rubio, R., Romero, H., Simón-Soro, A., Pignatelli, M., Mira, A. (2011). The oral metagenome in health and disease. *Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology*, pp. 1–11.

Bhatia, M., Neoptolemos, J. P., Slavin, J. (2001). Inflammatory mediators as therapeutic targets in acute pancreatitis. *Current Opinion in Investigational Drugs*, 2(4), pp. 496-501.

Bonifait, L., Chandad, F., Grenier, D. (2009). Probiotics for Oral Health: Myth or Reality?. *Journal of the Canadian Dental Association*, 75(8), pp. 585-590.

Calado, R. (1993). Programa de cuidados de saúde oral do Cartaxo. Avaliação do seu impacto. *Acta médica portuguesa*, 6, pp.115-122.

Chandki, R., Banthia, P., Banthia, R. (2011). Biofilms: A microbial home. *Journal of Indian Society of Periodontology*, 15(2), pp. 111-114.

Chen, F., Wang, D. (2010). Novel technologies for the prevention and treatment of dental caries: a patent survey. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 20(5), pp. 681-694.

Chikindas, M. L., Novák, J., Caufield, P. W., Schilling, K., Tagg, J. E. (1997). Microbially-produced peptides having potential application to the prevention of dental caries, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 9, pp. 95- 105.

CulturedCare-ProbioticsGum. (2010). [Em linha] Disponível em <<http://culturedcare.com>>. [Consultado em 11/11/2011].

Cummings, J. H., Macfarlane, G. T., Macfarlane, S. (2003). Intestinal bacteria and ulcerative colitis. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 4(1), pp. 9-20.

Çaglar, E., Cildir, S. K., Ergeneli, S., Sandalli, N., Twetman, S. (2006). Salivary mutans streptococci and lactobacilli levels after ingestion of the probiotic bacterium *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 by straws or tablets, *Acta Odontologica Scandinavica*, 64(5), pp.314-318.

Çaglar, E., Kargul, B., Tanboga, I. (2005a). Bacteriotherapy and probiotics role on oral health. *Oral Diseases*, 11(3), pp. 131–137.

Çaglar, E., Sandalli, N., Twetman, S., Kavaloglu, S., Ergeneli, S., Selvi, S. (2005b). Effect of yogurt with Bifidobacterium DN-173 010 on salivary mutans streptococci and lactobacilli in young adults, *Acta Odontol Scand, Acta Odontologica Scandinavica*, 63(6), pp. 317-320.

Çaglar, E., Kavaloglu, S. C., Kuscu, O. O., Sandalli, N., Holgerson, P. L., Twetma, S. (2007). Effect of chewing gums containing xylitol or probiotic bacteria on salivary mutans streptococci and lactobacilli, *Clinical Oral Investigations*, 11(4), pp. 425-429.

Çaglar, E., Kuscu, O. O., Cildir, S. K., Kuvvetli, S. S., Sandalli, N. (2008b). A probiotic lozenge administered medical device and its effect on salivary mutans streptococci and lactobacilli, *International Journal of Paediatric Dentistry*, 18, pp. 35–39.

Çaglar, E., Kuscu, O. O., Kuvvetli, S., Kavaloglu Cildir, S., Sandalli, N., Twetman, S. (2008b). Short-term effect of ice-cream containing Bifidobacterium lactis Bb-12 on the number of salivary mutans streptococci and lactobacilli. *Acta Odontologica Scandinavica*, 66(3), pp. 154-158.

Dinis, M., Tavares, D., Fonseca, A. J., Faria, R., Ribeiro, A., Silvério Cabrita, A. M., Ferreira, P. (2004). Therapeutic vaccine against Streptococcus sobrinus–induced caries, *Journal of Dental Research*, 83, pp. 354– 358.

Dinis, M., Tavares, D., Veiga-Malta, I., Fonseca, A. J. M. M., Andrade, E. B., Trigo, G., Ribeiro, A., Videira, A., Cabrita, A. M. S., Ferreira, P. (2009). Oral Therapeutic Vaccination with Streptococcus sobrinus Recombinant Enolase Confers Protection against Dental Caries in Rats, *Journal of Infectious Diseases*, 199(1), pp. 116-123.

FAO/WHO. (2002). Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, *Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting*, pp.1-11.

Fioramonti, J., Theodorou, V., Bueno, L. (2003). Probiotics: what are they? What are their effects on gut physiology?. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 17(5), pp. 711-724.

Goldin, B. R., Gorbach, S. L. (2008). Clinical Indications for Probiotics: An Overview. *Tufts University School of Medicine*, 46, pp. S96-S100.

Gomes, A. M. P., Malaca, F. X. (1999), Agentes probióticos em alimentos: aspectos fisiológicos e terapêuticos, e aplicações tecnológicas. *Biotechnologia Alimentar: Boletim de Tecnologia*, 64, pp. 12–22.

Gotteland, M., Brunser, O., Cruchet, S. (2006). Systematic review: are probiotics useful in controlling gastric colonization by *Helicobacter pylori*?. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 23(8), pp. 1077-1086.

Guarner, F., Khan, A.G., Garisch, J., Eliakim, R., Gangl, A., Thomson, A., Krabshuis, J., Mair, T. L. (2008). Practices guides: Probiotics and Prebiotics. *World Gastroenterology Organisation*, pp. 1-22.

Grudianov, A. I., Dmitrieva, N. A., Fomenko, E. V. (2002). Use of probiotics Bifidumbacterin and Acilact in tablets in therapy of periodontal inflammations. *Stomatologiia (Mosk)*, 81(1), pp. 39-43.

He, X., Lux, R., Kuramitsu, H.K., Anderson, M.H., Shi, W. (2009). Achieving Probiotic Effects via Modulating Oral Microbial Ecology. *Advances in Dental Research*, 21(1), pp. 53-56.

Heller, K. J. (2001). Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2), pp. 374S-379s.

Hojo, K., Taketomo, N., Ohshima, T. (2005). *Lactobacillus* species isolated from the mouth saliva and plaque. *Caries Research*, 23, pp. 159-164.

Ishibashi, N., Yamazaki, S. (2001). Probiotics and safety, *American Journal of Clinical Nutrition*, 73, pp. 465S-470S.

Islam, B., Khan, S. N., Khan, A. U. (2007). Dental caries: from infection to prevention. *Med Sci Monit*, 13(11), pp. 196-203.

Jeon, J. G., Rosalen, P. L., Falsetta, M. L., Koo, H. (2011). Current (Limited) Knowledge, Challenges and Future Perspective. *Caries Research*, 45(3), pp. 243-263.

Jindal, G., Pandey, R. K., Agarwal, J., Singh, M. (2011). A comparative evaluation of probiotics on salivary mutans streptococci counts in Indian children. *European Archives of Paediatric Dentistry*, 12(4), pp. 211-215.

Kagnoff, M. F., Eckmann L. (1997). Epithelial cells as sensors for microbialinfection. *Journal of Clinical Investigation*, 100, pp. 6-10.

Kasper, D. L., Braunwald, E., Fauci, A. S., Hauser, S. L., Longo, D. L., Jameson, J. L. (2009). *Harrison Medicina Interna*. São Paulo, McGraw-Hill.

Kaur, I. P., Chopra, K., Saini, A. (2002). Probiotics: potential pharmaceutical applications. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 15, pp. 1-9.

Klaenhammer, T. R., Kullen, M. J. (1999). Selection and design of probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 50(1-2), pp. 45-57.

Kazor, C. E., Mitchel, P. M., Lee, A. M., Stokes, L. N., Loesche, W. J., Dewhirst, F. E., Paster, B. J. (2003). Diversity of bacterial populations on the tongue dorsa of patients with halitosis and healthy patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(11), pp. 558-563.

Keijser, B. J., Zaura, E., Huse, S. M., Vossen, J. M., Schuren, F. H., Montijn, R. C., Cate, J. M., Crielaad, V. V. (2008). Pyrosequencing analysis of the oralmicroflora of healthy adults. *Journal of Dental Research*, 87(10), pp. 1016-1020.

Koduganti, R. R., Sandeep, N., Guduguntla, S., Chandana Gorthi, V. (2011). Probiotics and prebiotics in periodontal therapy. *Indian Journal of Dental Research*, 22(2), pp. 324-330.

Kollath, W. (1953). Nutrition and the tooth system; general review with special reference to vitamins. *Dtsch Zahnarztl Z*, 8(11), pp. 7-16.

Lenoir-Wijnkoop, I., Sanders, M. E. Cabana, M. D., Çaglar, E., Corthier, G., Rayes, N., Sherman, P. M., Timmerman, H. M. Vaneechoutte, M., Van Loo, J., Wolvers, D. A. (2007). Probiotic and prebiotic influence beyond the intestinal tract. *Nutrition Reviews*, 65(11), pp. 469-489.

Little, W. A., Thomson, L. A., Bowen, W. H. (1979). Antibiotic Susceptibility of *Streptococcus mutans*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 15(3), PP. 440-443.

Naylor, M. N. (1986). Diet and the prevention of dental caries. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 79(14), pp. 11-14.

Näse, L., Hatakka, K., Savilahti, E., Saxelin, M., Pönkä, A., Poussa, T., Korpela, R., Meurman, J. H. (2001). Effect of long-term consumption of a probiotic bacterium, *Lactobacillus rhamnosus* GG, in milk on dental caries and caries risk in children. *Caries Research*, 35(6), pp. 412-420.

Oliveira, N. D., Miyoshi, M. H. (2005). Advances in necrotizing enterocolitis. *Jornal de Pediatria*, 81(1), pp. s16-s22.

Pereira, A. L., Pita, J. R. (2005). Alexander Fleming (1881-1955)-Da descoberta da penicilina (1928) ao Prémio Nobel (1945). *Revista Faculdade de Letras*, 6(3), pp. 129-151.

Petersen, P. E., Bourgeois, H., Estupinan-Day, S., Ndiaye, C. (2005). The global burden of oral diseases and risks to oral health. *Bulletin of the World Organization*, 83(9), pp. 661-669.

Pham, L. C., Van Spanning, R. J. M., Roling, W. F. M., Prosperi, A. C., Terefework, Z., Ten Cate, J. M. Crielaard, W., Zaura, E. (2009). Effects of probiotic *Lactobacillus salivarius* W24 on the compositional stability of oral microbial community, *Archives of oral biology*, 54, pp. 132-137.

Prioult, G., Fliss, I., Pecquet, S. (2003). Effect of Probiotic Bacteria on Induction and Maintenance of Oral Tolerance to  $\beta$ -Lactoglobulin in Gnotobiotic Mice. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 10(5), pp. 787-792.

Razmienė, J., Vanagas, G., Bendoraitienė, E., Vyšniauskaitė, A. (2011). The relation between oral hygiene skills and the prevalence of dental caries among 4 - 6-year-old children. *Baltic Dental and Maxillofacial Journal*, 13(2), pp. 62-67.

Reid, G., Kim, S. O., Köhler, G. A. (2006). Selecting, testing and understanding probiotic microorganisms. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 46(2), pp. 149-157.

Rowland, I., Gray, J., Melton, L., Emeritus, C. B., Hickson, M. (2008). The role of probiotics in preventive health. *Geriatric Medicine. Midlife and Beyond*.

- Saad, S. M. I. (2006) Probióticos e prebióticos: o estado da arte. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 42(1), pp. 01-16.
- Saarela, M., Mogensen, G., Fonde, R., Maltto, J., Mattila-Sandholm, T. (2000). Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, 84, pp. 197–215.
- Samaranayake, L. (2006). *Essential Microbiology for Dentistry*, London, Churchill Livingstone Elsevier.
- Schrezenmeir, J., Vrese, M. (2001). Probiotics, prebiotics, and synbiotics - Approaching a definition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73, pp. 361-364.
- Samot, J., Lebreton, J., Badet, C. (2011). Adherence capacities of oral lactobacilli for potential probiotic purposes. *Anaerobe*, 17(2), pp. 69-72.
- Sheu, B. S., Cheng, H. C., Kao, A. W., Wang, S. T., Yang, Y. J., Yang, H. B., Wu, J. J. (2006). Pretreatment with Lactobacillus and containing yogurt can improve the efficacy of quadruple therapy in eradicating residual Helicobacter pylori infection after failed triple therapy. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 83(4), pp. 864-869.
- Sousa, F. B. (2000). *Cariologia: Bases histopatológicas para decisões clínicas*. João Pessoa, Universidade Federal da Paraíba.
- Stamatova, I., Meurman, J. H. (2009). Probiotics: Health benefits in the mouth. *American Journal of Dentistry*, 22 (6) pp. 329-338.
- Tannock, G. W. (1998). Studies of the Intestinal Microflora: A Prerequisite for the Development of Probiotics. *International Dairy Journal*, 8(5,6), pp. 527-533.
- Teanpaisan, R., Piwat, S., Dahlén, G. (2011). Inhibitory effect of oral Lactobacillus against oral pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 53(4), pp. 452-459.
- Vasiljevic, T., Shah, N.P. (2008). Probiotics - From Metchnikoff to bioactives. *International Dairy Journal*, 18, pp. 714–728.

- Veiga-Malta I, Duarte, M., Dinis, M., Tavares, D., Videira, A., Ferreira, P. (2004). Enolase from *Streptococcus sobrinus* is an immunosuppressive protein, *Cellular Microbiology*, 6(1), pp. 79–88.
- Von Wright, A. (2005). Regulating the Safety of Probiotics – The European Approach, *Current Pharmaceutical Design*, 11, pp. 17-23.
- Vrese, M., Marteau, P. R. (2007). Probiotics and Prebiotics: Effects on Diarrhea. *The Journal of Nutrition*, 137, pp. 803S–811S.
- Woestmann, U., Pieper, C., Schmidt-Fuchs, R. (2006) Dentes Sadios. *Comité para Terapias Microbiológicas*, 7, pp. 1-8.
- Zago, M., Fornasari, M. E., Carminati, D., Patricia Burns, P., Suárez, V., Vinderola, G., Reinheimer, J., Giraffa, G. (2011). Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from cheeses. *Food Microbiology*, 28, pp. 1033-1040.
- Zahradnik, R. T., Magnusson, I., Walker, C., McDonell, E., Hillman, C. H., Hillman, J. D. (2009). Preliminary assessment of safety and effectiveness in humans of ProBiora3, a probiotic mouthwash, *Journal of Applied Microbiology*, 107(2), pp. 682-690.