

Novas terapias antimicrobianas em doenças da cavidade oral

Joaquim Fernando da Rocha Neves

Novas terapias antimicrobianas em doenças da cavidade oral

Universidade Fernando Pessoa
Faculdade de Ciências da Saúde
Porto, 2012

Novas terapias antimicrobianas em doenças da cavidade oral

Joaquim Fernando da Rocha Neves

Novas terapias antimicrobianas em doenças da cavidade oral

Universidade Fernando Pessoa
Faculdade de Ciências da Saúde
Porto, 2012

Joaquim Fernando da Rocha Neves

Novas terapias antimicrobianas em doenças da cavidade oral

Declaro que este trabalho foi realizado por mim e que todas as fontes utilizadas foram devidamente referenciadas na sua totalidade

(Joaquim Fernando da Rocha Neves)

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

RESUMO

A cárie dentária, a doença periodontal e a candidose oral assumem-se como as três principais doenças da cavidade oral, sendo que, a cárie dentária e a doença periodontal são as patologias de eleição devido à sua extensão e prevalência.

O tratamento destas infecções de origem microbiana tem sido tradicionalmente realizado através de métodos mecânicos de odontologia. Contudo, à medida que evolui o conhecimento científico acerca dos processos envolvidos nestas doenças, percebemos que existem vários factores que influenciam o início e desenvolvimento das infecções da cavidade oral.

O objectivo deste trabalho é efectuar uma revisão acerca do estado actual das novas abordagens existentes no tratamento e/ou prevenção destas doenças, passando por parâmetros fitoquímicos, o chá verde, os antioxidantes naturais, alguns açucares-alcóois, e os agentes probióticos.

Estudos futuros deverão ser realizados com o objectivo de explorar e comprovar os vários aspectos relativos a estas novas terapias. Todavia, o decréscimo a que se tem vindo a assistir no que respeita à prevalência da cárie dentária e da doença periodontal poderá atribuir-se não só à informação actualmente disponível, mas também a uma melhoria da higiene oral e dos cuidados dentários, assim como ao uso de algumas das novas abordagens.

Palavras-Chave: Doença Periodontal, Cárie Dentária, Fitoquímicos, Probióticos.

ABSTRACT

The main diseases of the oral cavity are dental caries, periodontal disease and oral candidosis being the first two the most prevalent.

The traditional treatment for these infections has been made by mechanical methods. However, as it evolves scientific knowledge about the processes involved in these diseases, we realize that there are several factors that influence the initiation and development of infections of the oral cavity.

The aim of this review is to consider the new approaches in the treatment and prevention of these pathologies by using for example, fitochemicals, green tea, natural antioxidants, some sugar-alcools and probiotic agents.

Future studies should be made to explore the anti-cariogenic properties of these new therapies. However, the decrease of the prevalence of dental caries and periodontal disease is due not only, to the information currently available on this matter and the improvement of oral hygiene and dental care, but also to these new approaches.

Keywords: Periodontal Disease, Dental Caries, Phytochemicals, Probiotics.

AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra. Cristina Pina e à Prof. Dra. Maria Pia Ferraz, pelo apoio, atenção, disponibilidade e conhecimentos transmitidos;

À minha família, pelo carinho incondicional, esforço, confiança e dedicação, e por permitirem que concretizasse este grande objectivo de vida;

À minha esposa e *companheira de viagem*, por estar presente em todos os momentos e partilhar as alegrias e dificuldades;

E a todos aqueles, que aqui não expressamente mencionados, contribuíram para que esta etapa fosse concluída.

ÍNDICE

Introdução	9
I. Doenças da cavidade oral	10
1. Cárie dentária	12
2. Doença periodontal	18
3. Candidose oral	24
4. Carcinoma oral	27
II. Tratamentos clínicos	28
1. Mecânicos e químico-mecânicos	28
2. Antibioterapia	29
III. Novas terapias antimicrobianas	30
1. Fitoquímicos	30
i. Fenólicos, polifenólicos, fenóis simples e fenóis ácidos	32
ii. Flavonas, flavonóides e flavonóis	33
iii. Chá verde	35
iv. Terpenos e óleos essenciais	39
v. Alcalóides	40
vi. Açúcares – álcool	41
vii. Antioxidantes	44
viii. Probióticos, Prebióticos e Simbióticos na saúde do hospedeiro	46
viii. a. Probióticos na cavidade oral	51
ix. Bacteriocinas	52
x. Outros compostos	56
IV. Metodologias de investigação: o caso da vacina contra a cárie dentária	57
V. Conclusão	61
VI. Bibliografia	62

INTRODUÇÃO

O tratamento e controlo das doenças associadas à placa bacteriana, tais como a cárie dentária e a doença periodontal, é tradicionalmente realizado através de métodos mecânicos de odontologia. Contudo, à medida que evolui o conhecimento científico acerca dos processos envolvidos nestas doenças, percebemos que a resposta individual do hospedeiro, a flora comensal, a dieta, ou outro tipo de factores podem influenciar o início e desenvolvimento destas infecções da cavidade oral. Sendo assim, as linhas de tratamento deverão ser mais amplas e a abordagem antimicrobiana, que inclui o uso de agentes antimicrobianos, pode representar um complemento valioso aos métodos clássicos. Neste sentido, torna-se imperativo considerar e explorar o estado actual da investigação no que respeita a esta abordagem e, neste contexto, sabemos que a manutenção de uma boa higiene oral diária inclui o uso de agentes antimicrobianos químicos. No entanto, o aumento dos problemas relacionados com a resistência aos antimicrobianos sintéticos tem encorajado a pesquisa por alternativas derivadas de produtos naturais, alternativas estas que merecerão um lugar de destaque no presente trabalho.

O presente estudo representa uma revisão da literatura científica existente acerca das novas terapias antimicrobianas em doenças da cavidade oral. Sendo assim, pareceu-nos pertinente começar por, num primeiro momento, abordar os processos envolvidos na cárie dentária e na doença periodontal, uma vez que estas representam, provavelmente, as doenças bacterianas da cavidade oral, mais comuns no Homem e distinguem-se devido à sua extensão e prevalência (Silva et al., 2010; Direcção-Geral da Saúde, 2008; Allaker & Douglas, 2008; Samaranayake, 2006; Aas et al., 2005; Byun et al., 2004; Draghinescu, 2004; Wilson, 2004; Socransky & Haffajee, 2002; Balakrishnan et al., 2000; Dutra et al., 1997). De seguida, e após uma breve abordagem dos métodos mecânicos tradicionalmente utilizados no tratamento destas doenças, abordaremos mais pormenorizadamente as terapias antimicrobianas existentes, com especial destaque para os agentes antimicrobianos derivados de produtos naturais.

A pertinência do presente trabalho sai reforçada com a constatação de que assistimos claramente a uma postura cada vez mais receptiva por parte da medicina tradicional no que respeita ao uso de antimicrobianos derivados de plantas. Contribuindo para tal, o facto dos antimicrobianos tradicionais se mostrarem ineficazes tanto nas existentes como em novas doenças microbianas (Allaker & Douglas, 2009).

No que diz respeito a estas novas terapias antimicrobianas, começaremos por abordar os fitoquímicos, podendo estes ser divididos em várias classes que merecerão a nossa atenção individualmente. De seguida, atentaremos nas propriedades antimicrobianas do chá verde, que tem sido alvo de inúmeros estudos, revelando ser útil no controlo da placa bacteriana.

Outro dos potenciais agentes antimicrobianos que merecerão a nossa especial atenção são os antioxidantes naturais, incluindo as vitaminas, o caseinomacropéptido, a lactoferrina e alguns açúcares-alcóois, como o xilitol.

Por fim, abordaremos o poder antimicrobiano dos agentes probióticos, nomeadamente as bacteriocinas geradas por bactérias do ácido láctico.

Os efeitos benéficos associados aos agentes nomeados, resultantes das propriedades específicas de cada composto, incluem a actividade antioxidante, actividade antimicrobiana, prevenção de carcinoma oral e de cáries dentárias. Para além disso, o decréscimo da prevalência da cárie dentária e doença periodontal poderá atribuir-se não só à informação disponível acerca de alimentos cariogénicos e à generalizada melhoria da higiene oral e dos cuidados dentários das populações (Samaranayake, 2006), mas também a todas estas novas abordagens.

I. DOENÇAS DA CAVIDADE ORAL

No presente capítulo, daremos conta das principais características das três doenças que nos parecem assumir maior relevo neste contexto, sendo elas a cárie dentária, a doença periodontal e a candidose oral. A cárie dentária e a doença periodontal merecerão um especial destaque, uma vez que são as patologias de eleição quando nos referimos a doenças

da cavidade oral, devido à sua extensão e prevalência (Silva et al., 2010; Allaker & Douglas, 2008; Direcção-Geral da Saúde, 2008; Samaranayake, 2006; Aas et al., 2005; Byun et al., 2004; Draghinescu, 2004; Wilson, 2004 Socransky & Haffajee, 2002; Dutra et al., 1997).

Contudo, pensamos ser pertinente fazer, em primeiro lugar, uma breve abordagem à composição da placa dentária, ou seja, o biofilme microbiano que constituirá a base da microflora presente nas infecções descritas.

A este respeito podemos mencionar que, através do uso de métodos moleculares de cultura independente, já foram detectadas mais de 500 espécies de bactérias na placa subgengival de indivíduos saudáveis ou com doença (Paster et al., 2001). Contudo, os dados da maioria dos estudos efectuados dão conta das espécies implicadas em doenças e infecções orais, existindo ainda uma quantidade reduzida de informação no que toca às espécies ligadas à cavidade oral saudável (Aas et al., 2005).

Aas et al. (2005) realizaram um estudo numa amostra constituída por cinco sujeitos saudáveis (sem sinais clínicos de doença da mucosa oral, sem cáries, com periodonto saudável e sem usarem antibióticos há pelo menos 6 meses) com o propósito de definir a flora bacteriana predominante na cavidade oral saudável. No referido estudo, foram detectados um total de 141 taxons diferentes, representando 6 filos de bactérias: *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Fusobacteria*, e filo TM7 (para o qual não existem representativos cultiváveis). Como seria de esperar, e uma vez que as bactérias orais colonizam preferencialmente diferentes superfícies da cavidade oral devido à adesão específica da superfície de cada uma delas a uma dada superfície oral (Mager et al., 2003), o perfil das 40 espécies diferiu marcadamente nas diferentes superfícies. Assim sendo, ainda que *Streptococcus mitis* e *Granulitacella adiacens* tenham sido detectadas na maioria das partes que constituem a cavidade oral, existiram várias espécies que demonstraram ter locais específicos, como por exemplo, *Rothia dentocariosa*, *Actinomyces* spp., *Stp. sanguinis*, *Stp. gordonii*, e *Abiotrophia defectiva* foram maioritariamente encontradas nos dentes, enquanto que *Stp. salivarius* no dorso da língua. Outras espécies parecem ter predilecção pelo tecido mole, *Stp. sanguinis* e *Stp. australis* não colonizam os dentes ou a fenda subgengival, já *Stp. intermedia* coloniza preferencialmente a placa subgengival. Por

outro lado, *Neisseria* spp. não foi encontrada na placa subgengival mas estava presente na maioria dos outros locais (Aas et al., 2005).

Poderemos então concluir que, há uma flora bacteriana distinta em cavidades orais saudáveis e nas com infecção oral. Para além disso, comprovou-se que algumas espécies preferem colonizar locais específicos, enquanto outras são específicas apenas de alguns sujeitos (Aas et al., 2005; Mager et al., 2003). Segundo os autores, é de extrema importância primeiramente definir a flora bacteriana da cavidade oral saudável antes de se poder determinar o papel das bactérias orais na doença (Aas et al., 2005).

1. Cárie Dentária

A cárie dentária é definida como uma doença infecciosa endógena e transmissível causada pela flora residente da cavidade oral. A lesão provocada pela cárie é o resultado da colonização da superfície do esmalte por microrganismos – especialmente por bactérias do género *Streptococcus*, (*Stp. mutans*, *Stp. Sobrinus*) e *Lactobacillus* spp. (Silva et al., 2010; Allaker & Douglas, 2008; Byun et al., 2004; Ruby & Barbeau, 2002) – que na presença de hidratos de carbono fermentáveis (sacarose por ex.) produzem ácidos. Esses ácidos levam à dissolução do fosfato de cálcio das camadas superficiais da estrutura do esmalte - desmineralização do esmalte – e, posteriormente, da dentina (Riverón et al., 2006; Palmer, & Wolf, 2005; Ruby & Barbeau, 2002; Narvai, 2000). Contudo, o processo inicial de desmineralização do esmalte é, normalmente, seguido de remineralização, sendo que a cavitação ocorre quando o primeiro processo ultrapassa este último. Uma vez perdida a superfície de esmalte, a infecção, invariavelmente, progride para a dentina, desenvolvendo inflamação da polpa, e posterior necrose (Samaranayake, 2006).



Figura 1. Cárie Dentária

(<http://enquantoisso.com/curso-gratis-cariologia-online-e-onde-fazer/>)

A cárie é assim definida como uma destruição localizada dos tecidos do dente por fermentação bacteriana, sendo considerada um processo patológico complexo, de origem infecciosa e transmissível, que afecta as estruturas dentárias e se caracteriza por um desequilíbrio bioquímico (Riverón et al., 2006). Ainda que uma massa crítica de bactérias cariogénicas seja um pré-requisito, esta apenas se obtém na presença de sacarose, um substrato no qual a bactéria cariogénica se desenvolve. Desta forma, a infecção bacteriana é necessária mas não suficiente para o desenvolvimento da doença (Riverón et al., 2006; Narvai, 2000).

A cárie dentária pode ser classificada da seguinte forma, de acordo com o local da lesão:

- Cárie de depressão ou fissura – ocorre nos molares, pré-molares e na superfície lingual dos molares incisivos;
- Cárie de superfície lisa – ocorre principalmente em superfícies proximais mesmo abaixo do ponto de contacto;
- Cárie na raiz – ocorre no cimento ou dentina quando a raiz está exposta ao ambiente oral;
- Cárie recorrente – associada a uma restauração existente.

Uma lesão por cárie primária apresenta-se bem demarcada, uma mancha branca opaca na qual a superfície de continuidade do esmalte não foi rompida. Esta “mancha branca” da lesão pode curar ou remineralizar, ou seja, este estágio de doença é reversível. Contudo, à medida que a lesão desenvolve, a superfície fica acidentada e ocorre cavitação. Se esta lesão não for tratada a cavitação alastra para a dentina e eventualmente pode destruir a polpa dentária, levando finalmente ao desenvolvimento de um abscesso periapical e infecção purulenta (Samaranayake, 2006).

No que diz respeito aos factores mais importantes na sua etiologia, estes podem resumir-se a (Samaranayake, 2006):

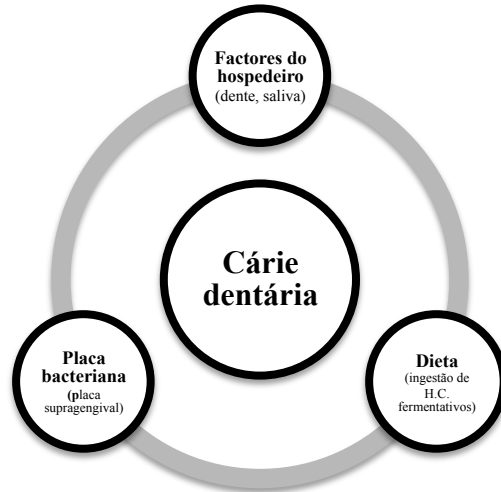


Figura 1 : Factores etiológicos da cárie dentária (adaptado de Samaranayake, 2006).

Da grande quantidade de bactérias que se encontram na cavidade oral, os microrganismos pertencentes ao género *Streptococcus* (*Stp. mutans*, *Stp. sanguis* e *Stp. sobrinus*) têm sido associados à cárie, tanto em animais de laboratório como em humanos. Os *Streptococcus* são bactérias que apresentam forma de cocos, crescem aos pares ou em cadeia, não têm forma de locomoção, não formam esporos e geralmente reagem positivamente à coloração de Gram. *Stp. mutans*, que tem sido a espécie mais isolada em lesões cariogénicas humanas, é a primeira a colonizar a superfície do dente depois da sua erupção. O nome atribuído a este género deve-se à sua capacidade de mudar de forma, podendo ser encontrada sob a forma de coco ou numa forma mais alongada, o bacilo (Riverón et al., 2006; Samaranayake, 2006).

Relativamente aos factores de virulência de *Stp. mutans*, os mais envolvidos na produção de cárie são:

1. Poder acidogénico: capacidade de fermentar os açúcares da dieta para produzir ácido láctico como produto final do metabolismo. Isto faz com que o pH baixe e ocorra a desmineralização do esmalte.
2. Poder acidúrico: capacidade de produzir ácido num meio com pH baixo.
3. Poder acidófilo: capacidade de resistir à acidez do meio libertando protões (H^+) para fora da célula.

4. Poder de síntese de glucanos e frutanos: por meio de enzimas como glucosil e frutossiltransferases (GTF e FTF), são produzidos os polímeros glucano e frutano a partir da sacarose. Os glucanos insolúveis podem ajudar a célula a aderir ao dente e serem usados como reserva de nutrientes.
5. Poder de síntese de polissacáridos intracelulares como o glicogénio: servem como reserva alimentar e mantêm a produção de ácido durante largos períodos de ausência de consumo de açúcar.
6. Poder de síntese de dextranase: além de mobilizar reservas de energia, esta enzima pode regular a actividade das glucosiltransferases removendo produtos finais de glucano (Riverón et al., 2006).

Além de todas estas capacidades, *Stp. mutans* obtém energia de vários alimentos que ingerimos, devido à sua flexibilidade genética que permite degradar uma vasta gama de hidratos de carbono. Entre as substâncias aproveitadas encontram-se a glucose, frutose, sacarose, galactose, maltose, rafinose, ribulose, melibiose e o amido. A bactéria fermenta todos estes compostos dispondo de uma vasta gama de enzimas, ou seja, proteínas que rompem as moléculas de hidratos de carbono e as convertem em vários subprodutos do seu metabolismo, como o etanol e o ácido láctico. Todos estes subprodutos acidificam o pH da cavidade oral, o que inibe outras bactérias de proliferarem, permitindo à *Streptococcus* manter uma posição de domínio ecológico. O passo mais importante para que se produza a cárie é a adesão inicial da *Stp. mutans* à superfície do dente. Esta adesão é mediada pela interacção entre uma proteína do microrganismo (PAC - *surface protein antigen*) e algumas da saliva que são adsorvidas pelo esmalte, e a capacidade de acumulação da placa, processo que ocorre quando o *Stp. mutans* produz glucanos solúveis e insolúveis utilizando as enzimas glucosiltransferases (GTF), a partir dos açúcares da dieta (Riverón et al., 2006).

A mudança do estilo de vida das populações determinou o aumento da prevalência da cárie dentária, nomeadamente, o aumento da porção na dieta de alimentos brancos que contêm hidratos de carbono (açúcar branco). Existe uma estreita relação entre o consumo de açúcar e a formação de cárie. Certas características dos alimentos açucarados (consistência, textura, adesão) e as condições nas quais são ingeridos tornam-se factores mais

determinantes no seu potencial cariogénico que a quantidade de açúcar que eles contêm (Riverón et al., 2006).

Os factores que estabelecem o potencial cariogénico dos alimentos açucarados são (Riverón et al., 2006):

- A consistência física da dieta: os alimentos adesivos são muito mais cariogénicos que os não retentivos. Por exemplo, uma bebida açucarada (ingerida rapidamente) é menos cariogénica que uma compota ou doce, independentemente da quantidade de açúcar que contenham.
- Momento da ingestão: os alimentos açucarados são mais perigosos se forem consumidos entre as refeições que durante as mesmas, sob a forma de sobremesa. Isto tem a ver com os mecanismos de defesa naturais da boca, que funcionam ao nível máximo durante as refeições e tendem a eliminar os restos de alimentos e neutralizar os ácidos que se podem formar. Por esta razão, o pior momento para ingerir um alimento cariogénico é imediatamente antes de se deitar porque a boca está quase em repouso completo durante o sono.
- A frequência: depois da ingestão de açúcar produz-se em poucos minutos uma redução do pH da placa que facilita a desmineralização do dente e favorece a cárie, desta forma, quanto mais frequente for a ingestão de açúcar, mais cariogénica se torna.

Dentro dos hidratos de carbono, a sacarose é o de maior capacidade cariogénica, provocando 5 vezes mais cáries que o amido. Está comprovado que um dos factores mais importantes na prevenção da cárie é fazer uma dieta equilibrada. O controlo da ingestão de açúcar pode ter um papel tão importante na redução da cárie como o uso de fluoreto. Este problema resulta da dificuldade em modificar os hábitos das populações de forma a conseguir um impacto na prevalência da doença (Riverón et al., 2006).

Nos últimos anos, tem-se implementado na nossa dieta o uso de edulcorantes como substitutos do açúcar, o que foi muito incentivado nomeadamente em indivíduos diabéticos, obesos ou com cárie dentária, no sentido de responder à necessidade de reduzir a ingestão de açúcar. As investigações centram-se principalmente nos polióis (sorbitol, manitol, maltitol e xilitol); amidos hidrolisados (lycasin); proteínas (monelina); sintéticos químicos

(sacarina, ciclamatos e aspartamos). A sua diferença em relação aos açúcares é que todos eles são reduzidamente metabolizados pelas bactérias orais, ou metabolizados por processos que não conduzem à formação ácida. Inclusive, alguns deles reduzem o metabolismo bacteriano e, conseqüentemente, o desenvolvimento da placa bacteriana (Riverón et al., 2006; Samaranayake, 2006).

O género *Lactobacillus* é outro dos agentes de relevo no que diz respeito à cárie dentária. Durante algum tempo, pensou-se que *Lactobacillus* seria o agente etiológico principal na cárie dentária, devido o facto de produzir elevadas quantidades de ácido na presença de açúcares, e ser capaz de sobreviver a valores de pH muito baixos. Contudo, os *Lactobacillus* têm geralmente uma baixa aderência à superfície do dente e não se acumulam em elevado número na placa bacteriana. Apesar destas bactérias colonizarem essencialmente a mucosa oral, estão presentes na maioria das lesões progressivas, acreditando-se que desempenham um papel mais importante na progressão da cárie dentária do que na sua iniciação (Balakrishnan et al., 2000). Quanto à sua forma de acção, assemelham-se às anteriormente descritas, todavia não se suspeita que estejam envolvidas em invasões bacterianas quando não há exposição da polpa do dente (Byun et al., 2004). As espécies de *Lactobacillus* mais presentes em infecções de cárie são: *L. acidophilus* sendo a espécie dominante, *L. paracasei*, *L. rhamnosus* e *L. fermentum* (Martin et al., 2002).

Na prevenção da cárie estão envolvidos vários comportamentos fundamentais, nomeadamente a ingestão de flúor na água ou na dieta e a educação nutricional e higiénica da família, isto é, uma correcta higiene oral com escovagem de dentes e limpeza com fio dental após todas as refeições e consultas de medicina dentária periódicas (Riverón et al., 2006; Balakrishnan et al., 2000; Mandel, 1988; Greene, 1963). Estes comportamentos inserem-se na filosofia actual ligada ao controlo e prevenção desta doença. Face às limitações das abordagens mecânicas tradicionais, surge a necessidade da adopção de novas estratégias que passam seguramente por uma detecção precoce, um diagnóstico preciso e uma prevenção activa (Allaker & Douglas, 2009; Samaranayake, 2006).

2. Doença Periodontal

Em relação à doença periodontal, esta pode ser entendida como um conjunto de condições inflamatórias, de origem bacteriana, que afectam as estruturas de suporte dos dentes, ou seja, a gengiva, o ligamento periodontal e o osso alveolar de suporte. Esta condição clínica tem na sua origem microrganismos presentes na placa bacteriana e pode ficar confinada apenas à gengiva (gengivite), ou estender-se às estruturas de suporte mais profundas, acarretando a destruição do ligamento periodontal e do osso alveolar (periodontite) (Allaker & Douglas, 2008; Ruby & Barbeau, 2002). De mencionar que, a periodontite, normalmente, desenvolve-se a partir de uma gengivite pré-existente, contudo, o contrário nem sempre acontece, isto é, nem todas as gengivites desenvolvem periodontite (Samaranayake, 2006).



Figura 2. Periodontite

(<http://blogobocas.blogspot.com/2010/11/doencas-periodontais.html>)

Podemos classificar esta doença em dois grupos principais: gengivite e periodontite. Por sua vez, estas duas classificações poderão ainda ser subdivididas em numerosas categorias, dando origem a uma dificuldade considerável em obter uma classificação universalmente aceite. Esta dificuldade resulta dos diferentes critérios clínicos de classificação a ter em conta, tais como, o tipo de progressão da doença, a distribuição da lesão, o grupo etário do indivíduo e a associação com doenças sistémicas ou desenvolvimentais (Allaker & Douglas, 2009; Samaranayake, 2006).

Os principais agentes etiológicos da doença periodontal pertencem à microflora que habita nos sulcos gengivais nas bolsas periodontais entre os dentes e no epitélio sulcular

genvival não queratinizado (Balakrishnan et al., 2000). É de referir também que os animais isentos de germes (animais gnotobióticos) não têm doença inflamatória periodontal e que é indicado o uso de antibióticos para o controlo clínico desta patologia. Estes factores indicam que as bactérias são o principal agente etiológico da doença periodontal (Ruby & Barbeau, 2002). Os tecidos do hospedeiro e os seus mecanismos de defesa específicos e não-específicos são essenciais ao bem-estar contudo, podem contribuir para o desenvolvimento da doença (Samaranayake, 2006; Ruby & Barbeau, 2002).

O periodonto é formado pela gengiva, ligamento periodontal, cimento e osso alveolar, sendo possivelmente a junção dentogengival o local mais vulnerável ao ataque bacteriano, ataque este que não acontece desde que haja uma higiene oral satisfatória. Quando há uma acumulação de placa próxima da gengiva e as defesas do hospedeiro são ultrapassadas, dá-se uma inflamação gengival (gengivite), induzida por microrganismos residentes na placa acumulada na superfície subgengival do dente, e subsequente inflamação periodontal (periodontite), com possível evolução para periodontite crónica por separação da gengiva da superfície da raiz do dente, destruição do osso alveolar e, em casos extremos, perda do próprio dente (Allaker & Douglas, 2008; Samaranayake, 2006; Meisel & Kocher, 2005; Wilson, 2004; Loesche & Grossman, 2001).

A resposta específica (linfócitos B e T; anticorpos IgG, IgA e IgM) e não específica (macrófagos, sistema do complemento, proteases, lisozimas, lactoferrina) do hospedeiro à placa subgengival desempenha um papel crítico no início, progressão e recobro da doença periodontal. Gengivas clinicamente sãs contêm um pequeno número de leucócitos polimorfonucleares (PMNLs), este número aumenta significativamente durante a primeira fase da gengivite e periodontite. Quando os PMNLs encontram bactérias inicia-se a fagocitose, os organismos fagocitados são depois mortos por uma combinação de enzimas hidrolíticas e proteolíticas e outros agentes presentes nas células (peróxido de hidrogénio e ácido lácteo). Contudo, a fagocitose pode ocorrer na ausência do anticorpo, a presença de imunoglobulinas e do complemento maximiza o processo. A interacção entre os PMNLs e a placa bacteriana pode resultar na morte do microrganismo; na morte de leucócitos; ou na autólise de neutrófilos e libertação de enzimas lisossomais (hialuronidase, collagenase, elastase). No entanto, os PMNLs podem ter um efeito tanto protector como agressor no

tecido do hospedeiro. A fagocitose, que pode ocorrer dentro do tecido do hospedeiro e possivelmente na interface com a placa subgingival, é importante na prevenção da entrada dos microrganismos no tecido (Samaranayake, 2006).

Apesar de ser conhecido o envolvimento das bactérias no desenvolvimento da doença periodontal, existem pontos de vista que divergem na medida se estará apenas uma ou um limitado número de espécies envolvidas no desenvolvimento da doença, denominada hipótese de placa específica (Samaranayake, 2006; Loesche & Grossman, 2001; Balakrishnan et al., 2000); ou a doença será causada por qualquer combinação de uma vasta gama de bactérias não específicas, a hipótese de placa não específica (Samaranayake, 2006; Loesche & Grossman, 2001; Balakrishnan et al., 2000). Surgiu porém outra hipótese além das referidas anteriormente, a hipótese de placa ecológica, sendo esta uma hipótese simples contudo elegante, subentendendo que a doença periodontal é uma infecção endógena ou oportunista, causada por um desequilíbrio na composição da microflora residente, devida a uma alteração na ecologia do habitat local (Samaranayake, 2006; Marsh, 1994). A hipótese de placa não específica e a hipótese ecológica sugerem que a doença periodontal deva ser tratada por redução da placa até níveis aceitáveis ou por alcance de controlo de placa total. Em contraste, a hipótese de placa específica sugere que a terapia deva ser dirigida para a eliminação dos patógenos específicos, por exemplo usando terapia antimicrobiana específica (Samaranayake, 2006; Loesche & Grossman, 2001; Balakrishnan et al., 2000).

Os sulcos gengivais saudáveis têm uma flora dominada por proporções quase iguais de organismos Gram-positivos e anaeróbios facultativos; as espiroquetas e estirpes móveis perfazem menos de 5% desses organismos. Com o progresso da doença, as proporções de anaeróbios Gram-negativos estritos e estirpes móveis aumentam significativamente (Loesche & Grossman, 2001), como se pode observar na seguinte tabela que sintetiza os diferentes microrganismos associados aos vários tipos de doença periodontal, partindo da compilação efectuada por Samaranayake (2006).

Tabela 1. Microrganismos associados aos vários tipos de doença periodontal (adaptado de Samaranayake, 2006).

Condição	Microrganismos predominantes	Comentários
Flora normal	<i>Streptococcus sanguis</i> <i>Streptococcus oralis</i> <i>Actinomyces naeslundii</i> <i>Actinomyces viscosus</i> <i>Veillonella spp.</i>	Maioritariamente cocos Gram-positivos com algumas espiroquetas ou estirpes móveis
Gengivite marginal crónica	<i>Streptococcus sanguis</i> <i>Streptococcus milleri</i> <i>Actinomyces israelii</i> <i>Actinomyces naeslundii</i> <i>Prevotella intermedia</i> <i>Capnocytophaga spp.</i> <i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>Veillonella spp.</i>	Cerca de 55% de células Gram-positivas com raras espiroquetas e/ou estirpes móveis
Periodontite crónica	<i>Porphyromonas gingivalis</i> <i>Prevotella intermedia</i> <i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>Tannerella forsythia</i> <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> <i>Selenomonas spp.</i> <i>Capnocytophaga spp.</i> <i>Spirochaetes</i>	Cerca de 75% de células Gram-negativas (das quais 90% são estritamente anaeróbias). Estirpes móveis e espiroquetas são proeminentes
Periodontite agressiva	<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> <i>Capnocytophaga spp.</i> <i>Porphyromonas gingivalis</i> <i>Prevotella intermedia</i>	Entre 65-75% de bacilos Gram-negativos. Estão presentes poucas espiroquetas ou estirpes móveis. Estas doenças podem estar associadas a defeitos genéticos ou imunes.

A gengivite está relacionada com uma exposição prolongada dos tecidos do hospedeiro a uma mistura não específica de organismos de placa gengival. As propriedades microbiológicas do sulco gengival mudam necessariamente durante a transição da lesão inicial para a lesão estabelecida. Na fase inicial, organismos Gram-positivos e facultativos predominam, incluindo *Streptococcus* (Tabela 1.). Na lesão precoce, *Actinomyces* spp. aumenta juntamente com espécies capnofílicas tais como *Capnocytophaga* spp. e bactérias anaeróbias obrigatórias Gram-negativas. A título de exemplo, num estudo na fase inicial de gengivite não hemorrágica, as proporções de *Actinomyces israelii* e *A. naeslundii* quase duplicaram. Quando a doença progride para a fase de doença estabelecida, onde são observadas hemorragias, a flora sofre alterações e os níveis de anaeróbios pigmentados de negro tais como *Porph. gingivalis* e *Prevotella intermedia* aumentam consideravelmente, juntamente com espiroquetas (Samaranayake, 2006; Wilson, 2004; Loesche & Grossman, 2001).

Uma vasta gama de produtos microbianos potencialmente tóxicos para os tecidos do hospedeiro já foram identificados na placa bacteriana. Estes factores de virulência estão apresentados na seguinte tabela:

Tabela 2. Factores de virulência dos microrganismos associados à doença periodontal (adaptado de Samaranayake, 2006).

Adesão, colonização e formação de biofilme	Destruição de tecidos	Evasão da resposta imune
Fimbrias	Hialuronidase	Leucocidinas
Cápsulas	Colagenase	Proteases
Antagonismo e sinergismo microbiano	Fosfatase ácida	Citotoxinas
Coagregação de microrganismos	Toxinas células epiteliais	Sideróforos
"Mecanismos de sobrevivência" do biofilme		

Se estes produtos tóxicos são libertados para tecidos periodontais, pode-se prever que ocorrerá uma rápida inflamação destrutiva. Contudo, a destruição de tecidos é geralmente lenta, esporádica e episódica, sugerindo a existência de um poderoso mecanismo de defesa do hospedeiro, do qual pouco se conhece (Samaranayake, 2006).

O tratamento desta doença é feito por uma minuciosa remoção da placa e do cálculo, de todos os factores de retenção da placa e pela introdução de uma boa higiene oral (Allaker & Douglas, 2008; Samaranayake, 2006; Meisel & Kocher, 2005; Wilson, 2004; Marsh, 1994).

Os microrganismos implicados na periodontite crónica estão listados na tabela 1. A profundidade do sulco periodontal cria um local altamente anaeróbio com uma mudança de pH de neutro para básico (7,4-7,8). O fluido rico em proteínas presente no sulco estimula o crescimento de microrganismos anaeróbios, que possuem inúmeras enzimas proteolíticas. A placa subgingival tem duas zonas distintas: uma zona de cocos e bacilos Gram-positivos próxima na superfície do dente e uma zona de organismos Gram-negativos próxima da fenda gengival. Em sulcos activos podem estar presentes *Porph. gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia* e *Fusobacterium nucleatum*. Alguns microrganismos específicos serão abordados de seguida (Samaranayake, 2006; Wilson, 2004; Loesche & Grossman, 2001).

As espiroquetas estão presentes em números significativamente baixos no tecido periodontal saudável, quando comparado com locais com doença. Apesar de ter sido pensado que uma elevada percentagem de espiroquetas numa amostra subgingival sugere fortemente uma futura doença activa e destrutiva, é agora claro que o número de espiroquetas não pode prever uma periodontite activa e por isso, a evidência da "especificidade das espiroquetas" é conflituosa e confusa. É possível que uma ou mais *Treponema* spp. estejam envolvidas no processo de doença (Samaranayake, 2006; Wilson, 2004; Loesche & Grossman, 2001).

Apesar destes organismos (*Porphyromonas*, *Prevotella* e *Tannerella* spp.) estarem agora divididos em três espécies, anteriormente pertenciam a um único grupo de organismos denominados "espécies bacteróides pigmentadas de negro". Estas bactérias são geralmente isoladas a partir de sulcos periodontais em grande número e acredita-se que estejam

directamente associadas a todas as formas de periodontite (Samaranayake, 2006; Wilson, 2004; Loesche & Grossman, 2001).

Capnocytophaga spp. fazem parte da flora oral comensal e foram os primeiros patogéneos implicados nas infecções periodontais a determinada altura, especialmente na periodontite agressiva localizada. Várias bactérias corrosivas tais como *Wolinella* spp. e *Eikenella corrodens* têm sido associadas a várias formas de doença periodontal, contudo o seu papel específico é ainda incerto (Samaranayake, 2006; Wilson, 2004; Loesche & Grossman, 2001).

3. Candidose Oral

Outra das doenças orais que merece a nossa especial atenção é a candidose oral. A candidose oral é provocada por espécies de *Candida*, mais frequentemente *C. albicans*, e resulta da sua proliferação e penetração nos tecidos da boca, quando as defesas físicas e imunológicas do hospedeiro se encontram fragilizadas (Cannon et al., 1995).

Antes de mais, é importante salientar que actualmente é raro um adulto saudável apresentar uma candidose oral, a não ser que esta esteja associada ao uso de uma prótese removível. Por isso, este diagnóstico num adulto torna imperativo determinar o factor predisponente, seja ele local (alterações da flora microbiana oral, imunossupressões, alterações epiteliais endógenas, dieta rica em hidratos de carbono, irritantes locais crónicos, tabaco) ou sistémico (factores fisiológicos, distúrbios endócrinos, deficiências nutricionais, doenças malignas, imunossupressões, radioterapia da cabeça e pescoço) (Azul & Trancoso, 2006). Um dos indicativos de que será necessário um sistema imunitário devidamente funcional para prevenir esta doença é o facto da candidose oral ser um dos primeiros alertas da progressão do estado de seropositivo para SIDA, constituindo-se assim como um dos indicadores primários de disfunção imunitária (Cannon et al., 1995).

A cavidade oral apresenta várias superfícies de adesão para espécies de *Candida*, incluindo células epiteliais, compósitos usados no tratamento de cáries, próteses dentárias,

os próprios dentes e, até mesmo, bactérias orais. A presença de leveduras, por si só, não é indicador de infecção ou doença uma vez que, *C. albicans* pode ser detectada em 20% de indivíduos saudáveis. A taxa de colonização de espécies de *Candida* em indivíduos hospitalizados consegue mesmo superar os 40%, o que aponta para a aquisição nosocomial exógena de leveduras (Ruby & Barbeau, 2002).

A candidose pseudomembranosa constitui-se como a forma mais comum de candidose oral. Apresenta-se geralmente na forma aguda, podendo também, caso não seja tratada, evoluir para a forma crónica. Caracteriza-se pela presença de manchas brancas ou branco-amareladas, cremosas, que podem ser removidas por raspagem, deixando uma superfície eritematosa, por vezes, ligeiramente sangrante (Azul & Trancoso, 2006). As localizações mais frequentes das lesões são a mucosa jugal, a língua, o palato e os lábios. Pode ser totalmente assintomática ou causar leve sensação de queimadura e xerostomia (Azul & Trancoso, 2006).



Figura 3. Candidose Pseudomembranosa

(http://pozemedicale.org/Portugal/Doencas_da_pele/Candidiase_oral_fotos.html)

No que se refere à candidose eritematosa, esta caracteriza-se pela presença de zonas difusas, vermelhas e cujos limites são, normalmente, pouco definidos. Localiza-se preferencialmente na zona dorsal da língua, podendo também ser observada no palato. Tal como a anterior, existe na forma aguda ou crónica, sendo acompanhada, por vezes, de sensação de queimadura (Azul & Trancoso, 2006).



Figura 4. Candidose Eritematosa

(http://cac-php.unioeste.br/projetos/patologia/lesoes_fundamentais/mancha/imagem6.php)

A estomatite protética é uma desordem iatrogénica, que possui diversos factores contribuintes, tais como o uso de próteses removíveis mal adaptadas, com consequente trauma das mucosas, o uso nocturno de próteses e a colonização das próteses pela placa bacteriana e por fungos. Localiza-se no palato, na zona que contacta com a prótese, não se estendendo além dos limites desta. Clinicamente caracteriza-se pela presença de eritema e edema da mucosa, podendo ocorrer o desenvolvimento de nódulos inflamatórios, nos quais se alberga a *Candida*, sendo, nestes casos, difícil o tratamento com medicação tópica. É típica a ausência de sintomatologia (Azul & Trancoso, 2006).



Figura 5. Estomatite Protética

(http://www.ff.up.pt/toxicologia/monografias/ano0708/g46_docetaxel/gloss.htm)

A quarta e última candidose oral mais frequente é a queilite angular, uma doença de origem multifactorial em que as espécies de *Candida* actuam como co-factores causais. Encontra-se frequentemente associada ao uso prolongado de próteses parciais, surgindo por perda de dimensão vertical. A saliva humedece de um modo continuado as pregas das comissuras labiais, aumentando a propensão para a infecção. Manifesta-se clinicamente sob

a forma de fissuras vermelhas e dolorosas que irradiam das comissuras labiais, ocasionalmente cobertas por pontos ou placas amarelo-esbranquiçadas (Azul & Trancoso, 2006).



Figura 6. Queilite Angular

(<http://drajacquelinefidelis.blogspot.com/2011/06/algumas-doencas-bucaisqueilite-do.html>)

4. Carcinoma Oral

Parece-nos pertinente fazer ainda uma pequena alusão ao carcinoma oral, todavia, não pretendendo elaborar uma descrição pormenorizada dos factores inerentes e caracterizadores desta doença.

O cancro oral engloba as neoplasias malignas da cavidade oral e faringe. Cerca de 90% dos cancros da cavidade oral são carcinomas espino-celulares e estão associados ao consumo de tabaco e álcool, aumentando o risco com o abuso associado destas duas substâncias. Apesar dos avanços no tratamento desta patologia, a taxa de mortalidade aos 5 anos mantém-se nos 50-60%. A expressão clínica do cancro oral é muito variável e, por isso, lesões suspeitas na mucosa oral, como placa branca não destacável, lesão exofítica ou úlcera que não cicatriza, devem ser cuidadosamente investigadas, especialmente na ausência de etiologia local (trauma) associada. A metastização é essencialmente linfática e faz-se para os gânglios linfáticos regionais. A biópsia é mandatória em qualquer lesão suspeita (Azul & Trancoso, 2006).

II. TRATAMENTOS CLÍNICOS PARA DOENÇAS DA CAVIDADE ORAL

1. Mecânicos e químico-mecânicos

Tradicionalmente, o tratamento odontológico da cárie dentária, ou seja, a remoção do tecido cariado, é realizado mecanicamente, com recurso a curetas e instrumentos rotatórios de alta e baixa rotação. Contudo, estes métodos provocam geralmente dor e ansiedade aos pacientes, devido à necessidade de anestesia e até ao próprio ruído provocado por este tipo de instrumentos (Silva et al., 2010).

Por este motivo, tem vindo a ser implementados novos métodos com a finalidade de diminuir o desconforto decorrente deste método tradicional, incluindo abrasão de ar, LASER, tratamento restaurador atraumático (TRA) e métodos químico-mecânicos, merecendo estes últimos a nossa especial atenção. Para além do fornecimento de um maior conforto ao paciente, outro dos factores que contribuiu para o desenvolvimento destas técnicas menos invasivas foi a necessidade de adoptar um tratamento da dentina que remova somente o tecido infectado e o tecido mole irreversivelmente desmineralizado (Silva et al., 2010; Banerjee, 2000).

O sistema Caridex foi o primeiro método de remoção químico-mecânica da cárie dentária, este consistia em duas soluções, uma contendo hipoclorito de sódio e outra contendo glicerina, ácido aminobutírico, cloreto de sódio e hidróxido de sódio. Apesar deste sistema ter demonstrado alguma efectividade, acabou por fracassar devido à sua difícil manipulação, utilização e custo elevado. Precedendo o Caridex, surgiu na Suécia em 1990 o Carisolv, cuja principal diferença é a utilização de três aminoácidos o que produz uma melhor interacção com o colagénio degradado da lesão cariogénica. O Carisolv é apresentado na forma de dois géis, sendo que o incolor é composto por hipoclorito de sódio e o vermelho é composto por três diferentes aminoácidos (ácido glutâmico, leucina e lisina), hidróxido de sódio, cloreto de sódio, carboximetilcelulose, água e o corante eritrosina. Os três aminoácidos reagem com hipoclorito de sódio neutralizando o comportamento agressivo em tecidos saudáveis e permitindo também o aumento da velocidade de remoção da cárie dentária, conferindo ao gel a selectividade a ele inerente, o que resulta apenas na remoção do tecido cariado. Este tratamento é amplamente indicado na

odontologia, especialmente em odontopediatria, odontogeriatria, periodontia e endodontia (Silva et al., 2010).

Uma das grandes vantagens deste produto é a diminuição da necessidade do uso da anestesia local e dos instrumentos rotatórios, o que poderá levar a uma maior aceitação por parte do paciente. Outro factor importante que deve ser considerado é a sua acção antimicrobiana. Lima et al. (2005) verificaram que este método foi mais eficiente na eliminação total de *Stp. mutans*, quando comparado com o método tradicional com curetas e instrumentos cortantes rotatórios, contudo existem algumas desvantagens que revestem este processo de alguma controvérsia, tais como, o seu elevado custo, o facto de consumir mais tempo clínico de procedimento quando comparado ao método tradicional, e a necessidade do eventual uso de instrumentos cortantes rotatórios para complementar a remoção do tecido cariado (Silva et al., 2010; Brostek et al., 2006).

Podemos então concluir que, apesar do surgimento dos sistemas químico-mecânicos para a remoção da cárie dentária, com o objectivo de reduzir o desconforto do tratamento odontológico provocado pelos instrumentos rotatórios e pela necessidade de anestesia, revela-se ainda impossível a eliminação de tais procedimentos.

2. Antibioterapia

O uso de profilaxia com antibiótico em procedimentos dentários, especialmente nos que causam sangramento, tornou-se uma prática corrente entre os profissionais de saúde dentária (Tong & Rothwell, 2000) .

As situações que são geralmente consideradas pelos médicos dentistas como indicadas para o potencial uso de antibióticos incluem a prevenção da progressão dos organismos orais para partes sustentáveis no corpo e a redução de infecções locais associadas a procedimentos orais. Assim sendo, podemos afirmar que são, de forma geral, raras as situações em que é indicado o uso de profilaxia com antibiótico, exceptuando as que se referem a casos claramente definidos de endocardite e de infecções em próteses articulares tardias, não existe consenso entre os investigadores acerca do uso da profilaxia (Tong & Rothwell, 2000).

A ideia emergente recomenda que se deverá evitar o uso da profilaxia nos tratamentos dentários, a menos que haja a clara indicação de que se deve fazê-lo. Esta nova tendência resulta da inexistência de bases claras e científicas para o uso de antibióticos na medicina dentária. Acresce ainda o facto de que o risco da ocorrência de sua utilização inapropriada, e a possibilidade do aumento da resistência a antibióticos, se revelarem bem mais relevantes do que os seus possíveis efeitos benéficos (Tong & Rothwell, 2000).

III. NOVAS TERAPIAS ANTIMICROBIANAS

No presente capítulo, relativo às novas terapias antimicrobianas para infecções da cavidade oral, começaremos por abordar os fitoquímicos, podendo estes ser divididos em várias classes. De forma a conseguirmos uma descrição de cada uma destas classes, optamos por dividi-las em diferentes subcapítulos, nomeadamente: fenólicos, polifenólicos, fenóis simples e fenóis ácidos; flavonas, flavonóides e flavonóis; chá verde (*camellia sinensis*); terpenos e óleos essenciais; alcalóides; açúcares álcoois; anti-oxidantes; e outros compostos.

Por fim, abordaremos o poder antimicrobiano dos agentes probióticos, nomeadamente as bacteriocinas geradas por bactérias do ácido láctico.

1. Compostos Fitoquímicos

Desde sempre que as plantas medicinais têm vindo a ser usadas, em todo o mundo, em tratamentos tradicionais para numerosas doenças do ser humano. Nas zonas rurais dos países desenvolvidos elas continuam a ser uma fonte primária de tratamento, sendo que cerca de 80% da população, nestes países, usam medicamentos tradicionais à base de plantas em cuidados de saúde (Palombo, 2009; Ciocan & Bara, 2007). Os produtos naturais que derivam das plantas medicinais, têm mostrado ser uma fonte rica de compostos biológicos activos, muitos deles têm sido a base de desenvolvimento de novos químicos para a indústria farmacêutica (Palombo, 2009).

Historicamente, as plantas têm providenciado uma fonte de inspiração para a criação de novos compostos, os medicamentos derivados de plantas têm contribuído de forma determinante para a saúde e bem-estar do Homem. Actualmente, estima-se que,

materiais derivados de plantas estejam presentes ou tenham dado origem a cerca de 50% dos fármacos ocidentais, os benefícios primários do uso de fármacos derivados de plantas residem no facto destes serem relativamente mais seguros do que as alternativas sintéticas, e de fornecerem um tratamento mais acessível e com benefícios terapêuticos consistentes (Ciocan & Bara, 2007).

A nível mundial, temos assistido a um renovado interesse nos produtos naturais. Este interesse é o resultado da interacção de alguns factores, tais como: a crença do consumidor de que os produtos naturais são superiores; a insatisfação do consumidor com os medicamentos convencionais; preocupações nacionais com o custo de saúde pública (Ciocan & Bara, 2007).

No que diz respeito a doenças causadas por microrganismos, o aumento da resistência de vários agentes patogénicos à terapêutica normalmente utilizada, como os antibióticos e agentes antivirais, tem conduzido a um interesse renovado na descoberta de novos compostos anti-infecciosos. Existem aproximadamente 500 mil espécies de plantas em todo o mundo, destas apenas 1% foram objecto de investigação, ou seja, existe ainda um grande potencial para descobrir novos compostos bioactivos (Palombo, 2009).

Tem havido numerosos relatos acerca do uso de plantas tradicionais e produtos naturais para o tratamento das doenças da cavidade oral. Muitos dos medicamentos derivados de plantas usados nos sistemas de medicina tradicional, têm sido registados nas farmacopeias como agentes utilizados no tratamento de infecções, e a sua eficácia contra agentes patogénicos orais largamente testada (Palombo, 2009).

Desta forma, numerosas plantas medicinais têm sido avaliadas relativamente ao seu potencial de aplicação na prevenção e tratamento das doenças orais. Alguns estudos têm investigado a actividade de produtos e extractos destas plantas contra patógenos orais específicos, enquanto outros focam-se na capacidade destes produtos para inibir a formação do biofilme dentário, através da redução da adesão dos patógenos microbianos à superfície do dente, que por sua vez é a primeira fase da formação da placa bacteriana e possível evolução para cárie dentária e/ou doença periodontal. A maioria dos estudos realizados para testar as propriedades antimicrobianas de extractos de plantas medicinais e de produtos naturais no tratamento e prevenção das doenças orais, envolve a avaliação *in vitro*, da

capacidade do agente para inibir o crescimento do patógeno oral, como por exemplo a *Stp. mutans*., bactéria implicada na cárie dentária, e a *Porph. gengivalis*, bactéria implicada na doença periodontal (Silva et al., 2010; Palombo, 2009; Allaker & Douglas, 2008; Samaranayake, 2006; Byun et al., 2004; Ruby & Barbeau, 2002).

De seguida, descreveremos os fitoquímicos que demonstraram possuir uma acção antibacteriana contra patógenos da cavidade oral, organizando-os de acordo com a sua classe.

i. Fenólicos, polifenólicos, fenóis simples e fenóis ácidos

A maior parte dos fitoquímicos bioactivos mais simples consistem apenas num anel fenólico simples substituído. O ácido cinâmico e cafeico são os mais comuns representantes de um vasto grupo de compostos fenólicos derivados do propano, que se encontram no mais elevado estado de oxidação (Ciocan & Bara, 2007).

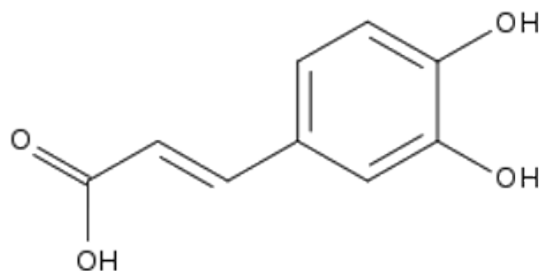


Figura 1. Ácido Cafeico

Ervas comuns com o estragão e o tomilho contêm ácido cafeico, que é eficaz contra vírus, bactérias e fungos. O catecol e o pirogalhol são fenóis hidroxilados que demonstram ser tóxicos para microrganismos. O catecol tem dois grupos hidroxilo (OH), enquanto que o pirogalhol tem três. O local de ligação e o número de grupos hidroxilo ligados ao fenol estão ambos relacionados com a sua relativa toxicidade para microrganismos, evidenciando que uma maior hidroxilação resulta numa maior toxicidade. Alguns autores acrescentaram ainda que quanto mais oxidado estiver o fenol, maior poder inibitório apresentará sobre os

microrganismos, sendo este o mecanismo que se pensa conferir a toxicidade dos grupos fenólicos (Ciocan & Bara, 2007).

ii. Flavonas, flavonóides e flavonóis

As flavonas são estruturas fenólicas contendo um grupo carbonilo, os flavonóides são também substâncias fenólicas hidroxiladas, mas ocorrem como uma unidade C6-C3 ligados a um anel aromático. Uma vez conhecida a sua síntese pelas plantas em resposta à infecção microbiana, será de esperar que sejam capazes de, *in vitro*, ter efeitos antimicrobianos contra um vasto número de microrganismos. A sua actividade está provavelmente relacionada com a sua capacidade de complexar com proteínas extracelulares solúveis e complexar com as paredes celulares bacterianas. Outros flavonóides lipofílicos podem também ser capazes de romper membranas microbianas (Ciocan & Bara, 2007).

As catequinas são a forma mais reduzida na unidade C3, em compostos flavonóides e merecem especial atenção. Estes flavonóides têm sido bastante estudados devido à sua presença em chás verdes "Oolong". Há muito que se tem constatado que os chás exercem uma actividade antimicrobiana e contêm uma mistura de catequinas. Estes compostos inibiram, *in vitro*, a *Vibrio cholerae*, *Stp. mutans*, *Shigella* e outras bactérias e microrganismos (Ciocan & Bara, 2007). Neste sentido, sabe-se que são vários os compostos do chá, *Camelia sinensis*, que exibem efeitos anticariogénicos através de vários modos de acção, incluindo: efeitos bactericidas em bactérias orais, prevenção da aderência das bactérias à superfície dentária, inibição da produção de glucano, e inibição de amilases (Hamilton-Miller, 2001). Polifenóis monoméricos, mais especificamente as catequinas simples, como a epicatequina galhato e epigalhocatequina galhato, acredita-se serem responsáveis por estes efeitos biológicos (Sasazuki et al., 2004; Hamilton-Miller, 2001). Contudo, abordaremos este tópico mais aprofundadamente no próximo ponto especificamente dedicado ao chá verde (*Camelia sinensis*).

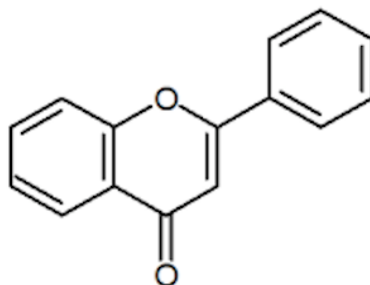


Figura 2. Flavona

A *Erythrina variegata* (*Leguminosae*) é usada na medicina popular nas regiões tropicais e subtropicais, e possui várias propriedades biológicas, incluindo a actividade antimicrobiana. Foram testados sete isoflavonóides isolados a partir da raiz desta planta relativamente á sua capacidade de inibir o crescimento de bactérias orais cariogénicas. Tendo-se chegado á conclusão que, de entre os sete testados, a ericristagalina demonstrou possuir a actividade inibitória mais potente ($MIC=1,56-6,25\mu g.mL^{-1}$), para além disso, a ericristagalina suprimiu completamente a incorporação da timidina e glucose (marcadas radiologicamente) na *Stp. mutans*, sugerindo que o composto interfere com a absorção bacteriana de metabolitos (Sato et al., 2002).

A naringina, um flavonóide polimetoxilado habitualmente encontrado nos citrinos e suplemento aprovado pela FDA (Food and Drug Association), demonstrou inibir o crescimento de patógeno periodontal e outros microrganismos orais comuns. A naringina mostrou-se particularmente eficiente contra *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Porph. gingivalis*, com uma significativa inibição de crescimento em 3h ou ainda maior inibição com aumento do tempo de incubação e concentração de naringina (Tsui et al., 2007).

Osawa et al. (1992) testaram a actividade antimicrobiana de 4 grupos de flavonóides contra uma selecção de *Streptococcus* cariogénicos orais. As isoflavanonas representaram o único grupo que demonstrou um forte potencial de actividade inibitória, enquanto que as flavonas, as isoflavanonas e as flavanonas não foram efectivas. Partindo destes resultados, os autores concluem que a ausência de uma dupla ligação em C2 do anel C, pode estar relacionado com a actividade antimicrobiana. Contrariando estes resultados, Cai et al (1996) detectaram que as duas flavonas canferol e miricetina, isoladas da *Syzygium aromaticum* revelaram actividade antimicrobiana contra a *Stp. mutans* e a *A. viscosus*.

Estruturalmente, estas flavonas eram diferentes das três testadas por Osawa et al. (flavona, apigenina e diosmina), as quais diferiam em C3 por conter um grupo hidroxil, motivo ao qual os autores atribuem a diferença observada na actividade antimicrobiana. Este estudo analisou 8 compostos isolados e identificados de um extracto de metanol derivado da *Syzygium aromaticum* relativamente à sua actividade inibitória contra *Porph. gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Stp. mutans* e *A. viscosus*. Todos os compostos demonstraram um poder inibitório menor em relação à *Stp. mutans* e *A. viscosus*, todavia os dois patogéneos periodontais (*Porph. gingivalis* e *Prevotella intermedia*) mostraram-se mais susceptíveis a estes compostos. De entre estes compostos, duas das três flavonas, canferol (3,5,7,4'-tetrahidroxiflavona) e miricetina (3,5,7,3',4',5'-hexahidroxiflavona), demonstraram a actividade inibitória mais forte contra as bactérias periodontais. A terceira flavona, ramnocitrina (canferol 7-metil éter) revelou um baixo nível de actividade antimicrobiana. Este resultado sugere que o grupo hidroxil livre em C7 no anel A contribui significativamente para a actividade antimicrobiana destes derivados estruturais dos flavonóides (Cai et al., 1996). Partindo destes resultados podemos concluir que o canferol, a miricetina e o ácido gálgico representam os componentes mais activos no extracto de metanol capazes de suprimir o crescimento dos patogéneos orais em questão.

iii. Chá Verde (*Camellia sinensis*)

O chá verde é uma das bebidas mais populares a nível mundial e o seu consumo habitual há muito que tem vindo a ser associado a benefícios para a saúde. Nos países asiáticos, onde o hábito de beber chá é um fenómeno cultural com mais de 4 mil anos, estudos epidemiológicos demonstram baixa incidência de certas doenças de foro oncológico e cardiovascular (Clement, 2009). A este respeito, é curioso e oportuno referir que a sabedoria popular japonesa afirma que beber chá verde "torna a boca limpa" e "os que bebem uma grande quantidade de chá verde terão uma menor decadência dentária" (Hamilton-Miller, 2001).

A maior parte dos efeitos benéficos do chá verde são atribuídos aos seus flavonóides polifenólicos, conhecidos como catequinas, incluindo a epicatequina (EC) epigallocatequina (ECG), epicatequina-3-galato (ECG) e o flavonóide major

epigalocatequina-3-galato (EGCG). Estes polifenóis contribuem com mais de 40% do peso seco do chá verde (Clement, 2009).

Na última década, o chá verde tem sido alvo de inúmeras investigações, contudo a maioria baseia-se em experiências animais ou *in vitro*. Estes estudos têm providenciado a evidência científica base que permite presumir as propriedades preventivas e benéficas do chá verde (Clement, 2009).

A literatura científica dá-nos conta dos efeitos antioxidantes dos polifenóis do chá verde, estes fitoquímicos modulam os processos bioquímicos e fisiológicos que conduzem o início e a propagação de doenças oncológicas e cardiovasculares (Clement, 2009; Kuzuhara et al., 2008). A título de exemplo podemos referir alguns estudos, um deles, realizado numa amostra de 8552 indivíduos seguidos ao longo de 9 anos demonstrou que o consumo habitual de chá verde estava associado a uma redução significativa da incidência de cancro, especialmente em mulheres que consomem mais de 10 chávenas deste chá por dia (Imai et al., 1997). Relativamente à doença cardiovascular uma meta-análise realizada por Arab et al. (2009), demonstrou que o consumo de chá verde causa uma redução significativa na pressão sanguínea e reduz o risco de trombose. Os estudos revistos dão-nos igualmente conta dos benefícios do chá verde na redução do colesterol LDL (Hooper et al., 2008), e dos efeitos contra a obesidade, que por sua vez é um importante factor de risco para o início e progressão da doença cardiovascular (Wolfram et al., 2006).

Assim, são vários os estudos que nos indicam que o consumo habitual de chá verde promove efeitos protectores nos sistemas cardio e cerebrovascular, reduzindo de forma significativa a incidência de hipertensão e trombose; além disso, estes estudos comprovam o efeito benéfico do consumo do chá verde na diminuição do colesterol LDL e colesterol total, assim como a sua utilidade na redução de peso em pacientes obesos (Clement, 2009; Kuzuhara et al., 2008).

Atentando, especificamente, nas doenças da cavidade oral, Hamilton-Miller (2001) elaborou uma revisão sistemática das propriedades anticariogénicas do chá verde (*Camellia sinensis*). O autor refere que, vários componentes do chá verde têm demonstrado interferir nos processos envolvidos na cárie dentária e que, para além destes efeitos potencialmente

anticariogénicos, têm também um efeito bactericida directo em *Stp. mutans*. Esta revisão da literatura dá-nos conta de vários estudos que sugerem que o consumo de chá verde ou uso de extractos específicos deste chá previne ou desacelera a progressão da cárie. Experiências realizadas em animais têm tido sucesso ao demonstrar que vários extractos de chá pode prevenir ou reduzir a formação de cárie, estas experiências foram realizadas maioritariamente em ratos ou hamsters e encontram-se compiladas na tabela seguinte:

Tabela 3. Propriedades anticariogénicas do chá verde (adaptado de Hamilton-Miller (2001).

Animal e indução de cárie	Intervenção	Resultado
ratos SPF, <i>Stp. mutans</i>	Sunphenon* 0,05%	40% de diminuição de cáries nas superfícies sulcal, bucal e proximal
ratos, dieta, <i>Stp. mutans</i>	Infusão de chá verde	Redução de 25% na taxa de cárie sulcal
hamster, dieta	Chá ácido (ph 3,6) 120mL/dia	Redução de 33-47% da taxa de cárie
ratos, dieta	Infusão de chá 3%	Controlo: 71 lesões em 17 animais Teste: 22 lesões em 9 animais

SPF, specific pathogen-free

*Mistura de catequinas monoméricas de chá verde

Na opinião de Hamilton-Miller (2001), os estudos realizados em humanos não produzem resultados tão satisfatórios como os realizados em animais. Contudo, o autor não deixa de referir alguns estudos que merecem especial relevo. De entre eles, destacamos o estudo realizado por Onisi et al. (1985) que demonstrou, numa amostra de crianças japonesas em idade escolar, que uma chávena de chá verde por dia, durante 250 dias, reduz em 50% os tipos de lesões cariogénicas mais comuns, quando comparado com um grupo controlo não consumidor de chá verde, para além disso a redução de incidência da cárie durante o primeiro ano manteve-se posteriormente.

Hirasawa et al. (2002) levaram a cabo um estudo com o propósito de determinar a utilidade da catequina do chá verde para a melhoria da doença periodontal, para isso,

determinaram a MIC (concentração mínima inibitória) e a actividade bactericida da catequina do chá verde contra a bastonetes anaeróbios, Gram-negativos, pigmentados de negro (BPR), tendo como amostra 6 voluntários (3 homens e 3 mulheres), com idades compreendidas entre os 41-61 anos, e diagnosticados com periodontite avançada. Os autores relatam a conhecida associação da BPR com várias formas de doença periodontal e concluem que o chá verde tem um efeito antibacteriano na BPR, sendo que, o rácio de BPR era de 10,6% inicialmente e decresceu significativamente para 0,02% no final do período experimental.

Um estudo prospectivo realizado no Japão por Ide et al. (2007), examinou a relação do consumo de chá verde com a carcinogénese oral, analisando dados de um total de 20550 homens e 29671 mulheres, com idades compreendidas entre os 40-79 anos, sem historial de cancro oral. O período de seguimento foi de cerca de 10 anos e foram identificados 37 casos de carcinogénese oral. Os sujeitos da amostra foram categorizados em quatro grupos de acordo com o seu nível de consumo de chá verde: menos de uma chávena por dia, 1-2 chávenas por dia, 3-4 chávenas por dia e 5 ou mais chávenas por dia, sendo controladas as seguintes co-variáveis: sexo, idade, hábitos tabágicos, consumo de álcool e consumo diários de vegetais, fruta e café. Os resultados demonstraram uma tendência para a redução do risco nas mulheres, mais ainda, os sujeitos que consomem 5 ou mais chávenas por dia têm claramente um risco reduzido de cancro oral quando comparados com os que consomem menos de uma chávena por dia. Os autores concluem que existirá um efeito preventivo e anticancerígeno do chá verde, ressaltando que o efeito protector do consumo de chá verde estará indirectamente associada com a carcinogénese oral pelo papel que este exerce na prevenção da cárie e doença periodontal.

Por último, é de referir um estudo realizado por Magalhães et al. (2009), que teve como objectivo analisar o impacto da clorhexidina e do extracto de chá verde na redução do desgaste da dentina. Os autores começam por referir que a degradação orgânica da dentina pode ser afectada por enzimas do hospedeiro como as MMPs (metaloproteínases de matriz) que estão presentes na saliva e nos tecidos dentários duros, e têm um importante papel na patogénese da cárie dentária, podendo assim ser responsáveis pela degradação da matriz nas lesões de cárie na dentina. Através do estudo realizado, concluem que tanto a clorhexidina, como o extracto de chá verde mostram-se capazes de reduzir a degradação

da dentina, sugerindo que a inibição das MMPs por estas duas soluções poderá ser um possível mecanismo de acção que conduzirá à redução da perda da dentina.

iv. Terpenos e óleos essenciais

A fragrância das plantas está armazenada na chamada *quinta essencia*, ou fracção de óleo essencial (Ciocan & Bara, 2007). Os óleos essenciais são complexas estruturas de compostos orgânicos que representam os princípios odoríferos das plantas, e, desde sempre, que são usados no controlo do hálito e dor. Apesar do seu uso habitual na higiene oral e prática dentária, são poucos os dados quantitativos existentes acerca dos efeitos dos óleos essenciais ou dos componentes derivados destes óleos contra os microrganismos supra ou subgingivais (Shapiro et al., 1994). Estes óleos são metabolitos secundários muito ricos em compostos à base de isopreno, denominados de terpenos. A sua estrutura química geral é $C_{10}H_{16}$ e podem ocorrer como diterpenos, triterpenos, e tetraterpenos (C₂₀, C₃₀ e C₄₀, respectivamente), assim como hemiterpenos (C₅) e sesquiterpenos (C₁₅). Quando estes compostos contêm elementos adicionais, geralmente oxigénio, são denominados de terpenóides (Ciocan & Bara, 2007).

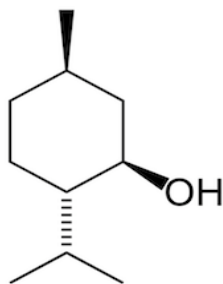


Figura 3. Mentol

Shapiro et al. (1994), realizaram um estudo no qual analisaram as propriedades antimicrobianas de alguns óleos essenciais e da acção conjunta de pares de óleos essenciais, em relação a algumas bactérias orais implicadas no desenvolvimento e/ou progressão de doença oral. Três dos óleos essenciais analisados (*australian tea tree oil*, *peppermint oil* e *sage oil*) mostraram-se inibitórios contra as estirpes laboratoriais de anaeróbios obrigatórios testados. O tomilho, um monoterpénóide aromatizado, revelou-se activo contra todas a

bactérias analisadas, o que vai de encontro ao estudo realizado por Saeki et al. (1989) no qual o tomilho demonstrou um poder inibidor contra todas as 27 estirpes bacterianas estudadas, enquanto que o óleo de hortelã-pimenta (*peppermint oil*) mostrou maior poder inibitório apenas contra as bactérias Gram-negativo, e o eugenol apenas exerceu poder inibitório em 4 das estirpes estudadas.

Os terpenóides são sintetizados a partir de grupos acetato, como tal, eles partilham as suas origens com ácidos gordos. Eles diferem dos ácidos gordos pelo facto de conterem uma extensa ramificação e serem cíclicos. Exemplos de terpenóides comuns são: metanol e cânfora (monoterpenos), e fernesol e artemisina (sesquiterpenóides). Terpenos ou terpenóides são activos contra bactérias, fungos, vírus e protozoários. Em 1977, foi descrito que 60% de derivados de óleos essenciais, examinados até à data, continham poder inibitório para fungos, enquanto que 30% inibiram bactérias. A fracção orgânica do trevo da pradaria roxo contém um terpenóide denominado petalostemumol mostrou ter excelente actividade contra *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* e uma menor actividade contra bactérias Gram-negativo, (Ciocan & Bara, 2007). Dois diterpenos isolados por Batista et al. (1994) revelaram-se mais democráticos, reagindo de forma significativa contra *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida spp.*.

Liu et al. (2006) purificaram 7 novos diterpenóides do tipo *ent*-rosano e um novo diterpeno do tipo labdano a partir da planta chinesa *Sagittaria sagittifolia* (Alismaceae). Destes compostos, 4 destes (sagittine A-D) exibiram actividade antibacteriana contra *Stp. mutans* e *A. naeslundii* (com valores de MIC compreendidos entre 62,5-125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), enquanto outro (sagittine E) foi apenas activo contra *A. naeslundii* (MIC=62,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Estes mesmos autores, mais recentemente, identificaram 5 novos diterpenóides provenientes da *Sagittaria pygmaea*, 4 destes mostraram-se activos contra *A. viscosus* e 3 activos contra *Stp. mutans*, sendo que o que se revelou mais activo foi o 18- β -D-3',6'-diacetoxiglucopiranosil-*ent*-kaur-16-eno (MIC=15,6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (Liu et al., 2007).

v. Alcalóides

Os alcalóides são considerados como as mais substâncias derivadas de plantas com maior relevância terapêutica. Estes representam um grupo muito diversificado de compostos orgânicos com nitrogénio (Ciocan & Bara, 2007).

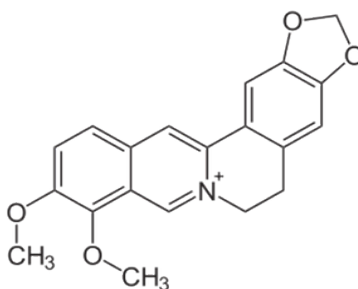


Figura 4. Berberina

Geralmente, os alcalóides são extremamente tóxicos e contém um efeito terapêutico significativo em quantidades diminutas. Desta forma, plantas que contém alcalóides não eram normalmente usadas na medicina popular, sendo aplicadas apenas em uso externo. Por todo o mundo, alcalóides puros, isolados de plantas, e os seus derivados sintéticos são usados como agentes básicos medicinais, devido aos seus efeitos analgésicos, antiespasmódicos e bactericidas.

O alcalóide berberina, isolado a partir de *Coptidis rhizoma* (Ranunculacea), mostrou actividade bacteriana contra bactérias orais, com maior actividade sobre *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (MIC=13 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e *Porph. gingivalis* (MIC=20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), contudo muito menor actividade foi observada contra espécies de *Lactobacillus* e *Streptococcus*. A berberina também foi capaz de inibir a actividade da collagenase de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Porph. gingivalis* (Hu et al., 2000).

vi. Açúcares-Álcoois

O xilitol é um açúcar-álcool que tem sido usado como um adoçante artificial desde há muito anos, e é encontrado em muitos frutos, bagas e vegetais (Palombo, 2009; Makinen & Soderling, 1980).

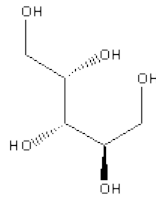


Figura 5. Xilitol

Investigadores como Arends et al. (1984) documentaram que o xilitol, através da sua capacidade de formar complexos com iões cálcio (Ca^{2+}) (Makinen & Soderling, 1984) e de penetrar em esmalte desmineralizado (Arends et al., 1984), poderia ter um papel importante na prevenção contra cáries, agindo como um carregador de iões cálcio e como um agente capaz de concentrar cálcio, retardando assim a desmineralização. Os autores colocaram a hipótese do xilitol inibir a erosão do esmalte causada por bebidas ácidas, através do mecanismo de acção anteriormente referido. As propriedades anticariogénicas do xilitol foram investigadas adicionando 0,78-50% de xilitol a meios de cultura de *Stp. mutans*, *Stp. salivarius* e *Stp. sanguis*, incubados a 37°C por 18h e determinando a densidade óptica das culturas. A *Stp. mutans* foi a única bactéria significativamente inibida pelo xilitol a 1,56%, enquanto que todas as outras bactérias apresentaram inibição estatisticamente significativa apenas a partir de 1,56%. Este estudo concluiu que o xilitol exhibe efeitos anticariogénicos por inibição do crescimento de *Stp. mutans*, não afectando no entanto outros *Streptococcus* orais pertencentes à flora normal (Palombo, 2009).

O consumo de bebidas e refrigerantes acídicos, especialmente bebidas cítricas como o sumo de laranja natural, é um factor de risco conhecido para o desenvolvimento de erosão dentária (Jarvinen et al., 1991). Com base nas suas propriedades anticariogénicas, vários estudos demonstraram o efeito antierosivo do fluoreto como um aditivo em bebidas acídicas. (Sorvari et al., 1994; Gedalia et al., 1981; Lehman et al., 1974; Spencer & Ellis, 1950).

Nesta linha de investigação, um estudo realizado por Amaechi et al. (1995), teve como objectivo determinar o efeito do xilitol, fluoreto e xilitol/fluoreto combinados na erosão do esmalte dentário por sumo de laranja natural *in vitro*. Quatro agentes erosivos foram preparados da seguinte forma: (A) sumo de laranja natural simples; (B) sumo de

laranja natural com 25% (w/v) de xilitol; (C) sumo de laranja natural com fluoreto (0,5 partes/10⁶); e (D) sumo de laranja natural com xilitol/fluoreto (25% e 0,5 partes/10⁶ respectivamente). As quatro amostras de porção de dente foram emparelhadas com os quatro preparados já descritos, de forma aleatória, sendo imersas 6 vezes por dia nos respectivos agentes erosivos. Cada imersão tinha a duração de 5min, sendo armazenadas em saliva artificial nos intervalos entre exposições e durante as 12h nocturnas, este procedimento repetiu-se por 24 dias, perfazendo um total de 12h de exposição ao respectivo agente erosivo (estas condições tentaram simular as condições *in vivo*, daí a exposição dos dentes ao agente erosivo e saliva artificial ser cíclica e por um período de 12h). A redução da desmineralização na amostra de esmalte foi estatisticamente significativa (cerca de 35,8%) no grupo D (xilitol/fluoreto), enquanto que as reduções com o xilitol e o fluoreto em separado foram baixas (cerca de 3% para o xilitol e 8,6% para o fluoreto), quando comparadas com o grupo A (sumo de laranja natural simples). Os valores obtidos podem ser considerados pela seguinte ordem decrescente de capacidade inibitória de desmineralização: grupo D < grupo C < grupo B < grupo A. Partindo destes resultados, foi possível concluir que o xilitol e o fluoreto têm um efeito sinérgico na redução da erosão dentária por sumo de laranja natural *in vitro*, sendo este efeito plausível considerando os seus mecanismos de acção.

Um estudo realizado por Hietala et al. (1995) debruçou-se sobre a capacidade de uma baixa concentração de xilitol, prevenir a cárie dentária. Para tal, dividiram um grupo de 49 ratos por dois grupos controlo e três grupos experimentais. Podemos descrever os dois grupos controlo e os dois grupos experimentais da seguinte forma: grupo controlo com dieta rica em sacarose (43%); grupo controlo com dieta rica em amido (43%); grupo experimental com 38% sacarose e 5% de xilitol; grupo experimental com 38% amido e 5% xilitol; foi ainda acrescentado um grupo de referência de ratos alimentados com ração comercial sem sacarose. O amido foi usado nas dietas como um hidrato de carbono não cariogénico. Para a indução da cárie administrou-se em cada animal 2-3 gotas de meio de cultura fresco de *Stp. sobrinus* (humano). Após 7 semanas os ratos foram decapitados sob efeito anestésico de CO₂ e o seu sangue foi colhido e centrifugado. Os resultados demonstraram a capacidade do xilitol na redução da progressão de cárie, no grupo com dieta rica em sacarose e 5% de xilitol, o que indica que não será necessário substituir ou

eliminar todos os hidratos de carbono fermentáveis numa dieta que contenha xilitol para que se consiga uma redução efectiva da cárie.

vii. Anti-oxidantes

O papel preventivo e terapêutico dos anti-oxidantes tem sido alvo de grande atenção por parte de inúmeros investigadores nos últimos anos (Alviano et al., 2008).

Os anti-oxidantes constituem uma importante parte da nossa dieta e estes, aliados aos anti-oxidantes intracelulares e dos sistemas enzimáticos, podem prevenir vários processos inflamatórios, infecciosos ou tumorais. Dentro de todos estes mecanismos, têm-se revelado particularmente importantes os sistemas anti-oxidantes de baixo peso molecular, que parecem representar a última linha de defesa com lesões celulares significativas (Uberos et al., 2008).

Um estudo recente realizado por Alviano et al. (2008) teve como objectivo avaliar a acitividade anti-oxidante e antibacteriana de extractos aquosos de *Cocos nucifera*, *Ziziphus joazeiro*, *Caesalpinia pyramidalis* e de extractos alcoóis de *Aristolochia cymbifera* contra *Stp. mutans* e *L. casei*, pelo facto de representarem os principais agentes etiológicos da cárie dentária, e contra *Prevotella intermédia*, *Porph. gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, devido a à sua importância no desenvolvimento da doença periodontal. Os resultados permitiram concluir que três (*Cocos nucifera*, *Caesalpinia pyramidalis*, *Aristolochia cymbifera*) dos quatro extractos avaliados têm uma acção antimicrobiana efectiva e poderão ser utilizados futuramente como agentes terapêuticos na inibição do crescimento de bactérias orais, o que reforça o uso destes extractos como agentes anti-infecciosos. Para além disso, os resultados sugerem que, a par do seu potencial antimicrobiano, os extractos de *Cocos nucifera*, *Caesalpinia pyramidalis* e *Aristolochia cymbifera* podem ser usados como anti-oxidantes adjuvantes em soluções de lavagem oral, para além de se revelarem novas possíveis formas de tratamento da doença periodontal.

Liskmann et al. (2006) avaliaram os níveis de vários anti-oxidantes na saliva no sentido de identificar as diferenças entre a saliva de pacientes com tecidos peri-implantares saudáveis e a saliva de pacientes com doença periimplantar. Os autores constataram que os doentes com doença periimplantar tinham níveis significativamente mais baixos de anti-oxidantes presentes na saliva do que os indivíduos saudáveis. Estes resultados sugerem que,

apesar de ser necessário uma melhor compreensão dos processos envolvidos na doença em questão, o seu tratamento deve incluir o suplemento de anti-oxidantes adjuvantes.

No que diz respeito à importância da capacidade anti-oxidante da saliva no desenvolvimento da cárie dentária, esta parece ainda não estar efectivamente estabelecida (Uberos et al., 2008).

Têm-se realizado estudos sobre os anticorpos anti-*Stp. mutans* presentes na saliva, que demonstram o papel importante que esta desempenha na resposta imune frente aos microrganismos causadores da cárie dentária. Para que a resposta imune possa efectuar a sua acção protectora, tem que chegar ao lugar onde se produz a cárie dentária, que será diferente segundo a localização da lesão. Assim, a protecção frente às cáries que se desenvolvem na saliva, dependerá da acção da IgA, que pode inibir a adesão dos microrganismos à superfície dentária e a acção da glucosiltransferase, podem aglutinar e opsonizar os microrganismos que seriam fagocitados pelos fagócitos presentes no líquido gengival (Riverón et al., 2006).

Segundo os autores, a ausência de saliva é um condicionante para a formação de cáries, sendo que é a saliva que mantém a integridade dentária devido aos diversos papéis que desempenha, tais como, a acção de limpeza mecânica, a remoção de hidratos de carbono, a maturação pós-eruptiva do esmalte, a regulação do meio iónico para fornecer a capacidade de remineralização sem a precipitação espontânea dos seus componentes, e a limitação da difusão ácida. A saliva previne assim a desmineralização do esmalte uma vez que contém cálcio, fosfato e flúor. As concentrações de cálcio e fosfato mantêm a saturação da saliva no que respeita aos minerais do dente, todavia têm um importante papel na formação de cálculo ou tártaro. O flúor está presente em concentrações de saliva muito baixas, contudo é determinante na remineralização (Riverón et al., 2006).

A saliva é igualmente essencial no controlo do pH da placa bacteriana. As bactérias acidogénicas metabolizam rapidamente os hidratos de carbono, obtendo ácido como produto final, disto resulta um rápido decréscimo do pH da placa bacteriana, que apenas restabelece os seus níveis normais passado cerca de 30 minutos. Contudo, para que este restabelecimento se concretize é fundamental o papel compensador da saliva, que inclui bicarbonato, fosfatos e proteínas. A diminuição do fluxo de saliva, como é óbvio, diminui

drasticamente o seu papel protector, sendo que um reduzido fluxo resulta num aumento do número de *Stp. mutans* e lactobacilos (Riverón et al., 2006).

viii. Probióticos, Prebióticos e Simbióticos na saúde do hospedeiro

Os **probióticos** são definidos como microrganismos vivos, administrados em quantidades adequadas, que conferem benefícios à saúde do hospedeiro (Sanders, 2003; World Health Organization, 2001). De entre as bactérias usadas como probióticos destacam-se as pertencentes aos géneros *Bifidobacterium* como sendo as mais frequentemente empregues em alimentos e *Enterococcus faecium* mas em menor escala. A escolha destas bactérias foi feita na medida em que podem ser isoladas de todas as porções do tracto gastrointestinal de um indivíduo saudável (Bielecka et al., 2002; Charteris et al., 1998). De entre as bactérias pertencentes ao género *Bifidobacterium*, destacam-se *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. lactis*, *B. animalis*, *B. longum* e *B. thermophilum*. De entre as bactérias lácticas pertencentes ao género *Lactobacillus*, destacam-se *L. acidophilus*, *L. helveticus*, *L. casei* - subsp. *paracasei* e subsp. *tolerans*, *L. paracasei*, *L. fermentum*, *L. rhamnosus* e *L. salivarius* (Sanders & Klaenhammer, 2001; Collins et al., 1998).

O mecanismo de acção dos probióticos ainda não é totalmente conhecido por isso foi-lhes atribuído três mecanismos de acção possíveis: 1- supressão do número de células viáveis através da produção de compostos com actividade antimicrobiana, a competição por nutrientes e a competição por sítios de adesão; 2- alteração do metabolismo microbiano através do aumento ou da diminuição da actividade enzimática; 3- estímulo da imunidade do hospedeiro através do aumento dos níveis de anticorpos e pelo aumento da actividade dos macrófagos (Fuller, 1989).

O espectro de actividade dos probióticos pode ser dividido em efeitos nutricionais, fisiológicos e antimicrobianos (Fuller, 1989).

A resistência aumentada contra patogéneos é a característica mais promissora no desenvolvimento de probióticos eficazes. O emprego de culturas probióticas exclui microrganismos potencialmente patogénicos e reforça os mecanismos naturais de defesa do organismo (Puupponen-Pimia et al., 2002).

Os probióticos ajudam na reposição da flora intestinal através da adesão e colonização da mucosa intestinal, acção esta que impede a adesão e subsequente produção

de toxinas ou invasão das células epiteliais (dependendo do mecanismo de patogenicidade) por bactérias patogénicas. Adicionalmente, os probióticos competem com bactérias indesejáveis pelos nutrientes disponíveis no nicho ecológico. O hospedeiro fornece as quantidades de nutrientes que as bactérias intestinais necessitam e estas indicam activamente as suas necessidades. Essa relação simbiótica impede uma produção excessiva de nutrientes, a qual favoreceria o estabelecimento de competidores microbianos com potencial patogénico. Além disso, os probióticos podem impedir a multiplicação dos seus competidores através de compostos antimicrobianos, principalmente as bacteriocinas (Guarner & Malagelada, 2003; Calder & Kew, 2002; Kopp-Hoolihan, 2001), assunto que será adiante desenvolvido mais pormenorizadamente.

O desequilíbrio da flora intestinal causa alterações como diarreia associada a infecções ou ao tratamento por antibióticos, alergia alimentar, eczema atópico, doenças inflamatórias intestinais e artrite. Assim sendo, a correcção das propriedades de uma flora autóctone em desequilíbrio constitui-se a base da terapia por probióticos (Isolauri et al., 2004).

O efeitos dos probióticos sobre a resposta imune tem sido bastante estudado. Grande parte das experiências em sistemas *in vivo* e de modelos animais e humanos sugere que os probióticos podem estimular tanto a resposta imune não-específica como a específica. Acredita-se que esses efeitos sejam mediados por uma activação dos macrófagos, por um aumento nos níveis de citocinas, por um aumento da actividade das células destruidoras naturais (NK - "natural-killer") e/ou dos níveis de imunoglobulinas. Merece especial atenção o facto desses efeitos positivos dos probióticos sobre o sistema imune ocorrerem sem o desencadeamento de uma resposta inflamatória prejudicial. No entanto, nem todas as estirpes de bactérias lácticas são igualmente efectivas. A resposta imune pode ser aumentada, quando um ou mais probióticos são consumidos concomitantemente e actuam sinergeticamente como se pensa ser o caso dos *Lactobacillus* administrados em conjunto com *Bifidobacterium* (Calder & Kew, 2002; Kopp-Hoolihan, 2001).

Outros possíveis efeitos dos probióticos são a sua participação na prevenção do cancro, na modulação de reacções alérgicas, na melhoria da saúde urogenital de mulheres (Kopp-Hoolihan, 2001), nos níveis sanguíneos de lípidos (Pereira & Gibson, 2002) e efeitos anti-hipertensivos (Kopp-Hoolihan, 2001). É provável que o efeito benéfico dos

probióticos na modulação de reacções alérgicas seja exercido através do desenvolvimento da função de barreira da mucosa. Outra possibilidade é que um estímulo microbiano reduzido durante a infância resulte numa maturação mais lenta do sistema imune, devido ao facto de ter sido observado que crianças alérgicas eram menos frequentemente colonizadas por *Lactobacillus*, predominando os coliformes e *Staphylococcus aureus*. Assim sendo, os probióticos serão capazes de atenuar a inflamação intestinal e as reacções de hipersensibilidade em pacientes com alergia alimentar, funcionando como um meio de prevenção primária da alergia em indivíduos susceptíveis (Kopp-Hoolihan, 2001).

Apesar de poucos estudos clínicos de curta duração terem sido realizados, todos mostram que a ingestão de probióticos exerceu uma influência benéfica na concentração sanguínea de lípidos, reduzindo os níveis de colesterol total, de colesterol LDL e de triglicéridos (Kopp-Hoolihan, 2001). As bactérias probióticas fermentam os hidratos de carbono não-digeríveis provenientes dos alimentos no intestino. Os ácidos gordos de cadeia curta resultantes dessa fermentação possivelmente causam diminuição das concentrações sistémicas dos lípidos sanguíneos através da inibição da síntese de colesterol hepático e/ou redistribuição do colesterol do plasma para o fígado (Pereira & Gibson, 2002). Entretanto, é importante salientar que diversas hipóteses alternativas têm sido levantadas e que o efeito real dos probióticos no controle do colesterol ainda é questionável (Lourens-Hattingh & Viljoen, 2001).

Os seus efeitos são largamente conhecidos sobre a flora intestinal humana, os quais incluem efeitos antagónicos, competição e efeitos imunológicos, resultando num aumento da resistência contra patogéneos. (Ziemer & Gibson, 1998). Assim, a utilização de culturas bacterianas probióticas estimula a multiplicação de bactérias benéficas, em detrimento da proliferação de bactérias potencialmente prejudiciais, reforçando os mecanismos naturais de defesa do hospedeiro (Isolauri et al., 2004; Fioramonti et al., 2003; Puupponen-Pimia et al., 2002; Ziemer & Gibson, 1998).

Em condições normais, inúmeras espécies de bactérias estão presentes no intestino, a maioria delas anaeróbias estritas. Essa composição torna o intestino capaz de responder a possíveis variações anatómicas e físico-químicas. A flora intestinal exerce uma influência significativa sobre uma série de reacções bioquímicas do hospedeiro. Paralelamente, quando em equilíbrio, impede que microrganismos potencialmente patogénicos que possam

estar presentes, exerçam efeitos patogénicos. Por outro lado, o desequilíbrio dessa flora pode resultar na proliferação patogénica, com consequente infecção bacteriana (Ziemer & Gibson, 1998).

A flora saudável é definida como flora normal que conserva e promove o bem-estar e a ausência de doenças, como a do tracto gastrointestinal e da cavidade oral. A correcção das propriedades da flora autóctone desequilibrada constitui a razão do uso da terapia por probióticos (Isolauri et al., 2004).

Estudos clínicos controlados com lactobacilos e bifidobactérias não revelaram efeitos prejudiciais causados por estes microrganismos. Paralelamente, apesar de muitas estirpes de bactérias lácticas, particularmente as de *Lactobacillus* spp., serem resistentes a determinados antibióticos, essa resistência normalmente não é mediada por plasmídeos, não sendo portanto transmissível. No entanto, há descrição de estirpes portadoras de plasmídeos de resistência, particularmente estirpes de *Enterococcus* resistentes à vancomicina. Estirpes com plasmídeos de resistência não devem ser usados como probióticos humanos ou animais, por serem, possivelmente, capazes de transmitir os factores de resistência para bactérias patogénicas, dificultando a cura de infecções (Saarela et al., 2000; O'Brien et al., 1999; Salminen et al., 1998). Apesar das culturas probióticas de *Lactobacillus* spp. e de *Bifidobacterium* spp. serem consideradas seguras (GRAS - "generally recognized as safe"), é necessária a determinação da segurança na utilização da estirpe antes do lançamento e da divulgação de um novo produto. Assim, uma avaliação crítica da segurança tornará os benefícios dos probióticos acessíveis ao consumidor (O'Brien et al., 1999; Salminen et al., 1998).

No que se refere aos **prebióticos**, estes são componentes alimentares não digeríveis que afectam benéficamente o hospedeiro, uma vez que estimulam selectivamente a proliferação ou actividade de populações de bactérias desejáveis no cólon. Adicionalmente, o prebiótico pode inibir a multiplicação de patogéneos, garantindo benefícios adicionais à saúde do hospedeiro (Mattila-Sandholm et al., 2002; Roberfroid, 2001; Gibson & Roberfroid, 1995). Os prebióticos avaliados em humanos constituem-se dos frutanos e dos galactanos (Cummings & Macfarlane, 2002). Os frutanos são fibras solúveis e fermentáveis, as quais não são degradadas pela α -amilase nem por enzimas hidrolíticas,

como a sacarase, a maltase e a isomaltase, na parte superior do tracto gastrointestinal, são considerados ingredientes funcionais, uma vez que exercem influência sobre processos fisiológicos e bioquímicos no organismo, resultando numa melhoria da saúde e numa redução do risco de aparecimento de diversas doenças. Os frutanos são os polissacarídeos mais abundantes na natureza, a seguir ao amido. Eles estão presentes em numa grande variedade de vegetais e também nalgumas bactérias e fungos (Carabin & Flamm, 1999).

Em relação ao mecanismo de acção dos prebióticos, estes exercem um efeito osmótico no tracto gastrointestinal, enquanto não são fermentados, como ocorre no caso de outros hidratos de carbono não digeríveis. Os prebióticos, quando fermentados pela flora endógena aumentam a produção de gás e por isso apresentam o risco teórico de provocar a diarreia em alguns casos (efeito osmótico) e de serem pouco tolerados por pacientes com síndrome de intestino irritável. Contudo, a tolerância a doses baixas de prebióticos é geralmente excelente. Os probióticos, por outro lado, não apresentam esse inconveniente teórico e têm sido eficazes na prevenção e no alívio de diversos episódios clínicos, envolvendo diarreia (Marteau & Boutron-Ruault, 2002).

A aplicação de frutanos como aditivos alimentares é também de elevada importância na prevenção da cárie, pelo facto de serem uma fonte de hidratos de carbono não cariogénica, uma vez que não são utilizados como substrato por *Stp. mutans*. Em virtude de possuírem cadeias de diferentes tamanhos, a inulina e a oligofrutose conferem propriedades distintas aos produtos alimentícios aos quais são adicionadas (Kaur & Gupta, 2002). A oligofrutose, composta de oligómeros de cadeias curtas, possui propriedades similares às do açúcar e de xaropes de glucose, apresentando 30 a 50% do poder adoçante e maior solubilidade que o açúcar. Sendo assim, esse frutano é frequentemente usado em conjunto com edulcorantes de alto poder adoçante para substituir o açúcar, resultando num perfil adoçante equilibrado (Kaur & Gupta, 2002).

Apenas a título informativo, julgamos pertinente fazer referência ao conceito de produto denominado **simbiótico**, que é aquele no qual um probiótico e um prebiótico estão combinados. A interacção entre o probiótico e o prebiótico *in vivo* pode ser favorecida por uma adaptação do probiótico ao substrato prebiótico anterior ao consumo. Isto pode, em

alguns casos, resultar numa vantagem competitiva para o probiótico, quando ingerido juntamente com o prebiótico. O consumo de probióticos e prebióticos seleccionados apropriadamente pode aumentar os efeitos benéficos de cada um deles, uma vez que o estímulo de estirpes probióticas conhecidas leva à escolha dos pares simbióticos substrato-microrganismo ideais (Bielecka et al., 2002; Holzapfel & Schillinger, 2002; Mattila-Sandholm et al., 2002; Puupponen-Pimia et al., 2002).

viii. a. Probióticos na cavidade oral

Como já pudemos perceber, o impacto das bactérias probióticas para determinadas doenças gastrointestinais já é do conhecimento geral todavia, o seu possível papel no combate a infecções orais está ainda em crescente investigação (Twetman et al., 2008).

Sendo a cárie dentária também um local com flora endógena e associada a doenças provocadas por bactérias colonizadoras, merece actualmente, um especial destaque como alvo da terapia por probióticos, existindo já estudos *in vivo* a sugerirem que estirpes probióticas de lactobacilos e bifidobactérias sejam capazes de reduzir, na saliva, os níveis de bactérias responsáveis pela cárie dentária (Twetman et al., 2008; Elahi et al., 2005; Busscher et al., 1999).

Um estudo recente em crianças nas quais foi administrado leite probiótico, demonstrou uma redução na taxa de cárie e uma contagem baixa de *Stp. mutans*. (Busscher et al., 1999).

Twetman et al. (2008) realizaram um estudo que visava comprovar o efeito a curto prazo do uso de pastilhas elásticas com probióticos (*Lactobacillus reuteri*) na inflamação gengival, e os níveis de citoquinas pro e anti-inflamatórias no fluído crevicular gengival. Para tal, reuniram uma amostra de 42 sujeitos adultos, com uma média de idades de 24 anos, divididos em três grupos experimentais: grupo A/P (ingeriam uma pastilha activa e uma placebo), grupo A/A (ingeriam duas pastilhas activas), e o grupo P/P (ingeriam duas pastilhas placebo). Os autores concluíram que o número de locais de sangramento após sondagem e o fluído crevicular gengival diminuiriam durante o período experimental em todos os grupos. Contudo, a diminuição estatisticamente significativa ocorreu apenas nos

grupos A/P e A/A, após duas semanas de uso das pastilhas. Para além disso, os níveis de citocinas pro-inflamatórias TNF- α e IL-8 reduziram significativamente no grupo A/A logo após a primeira semana, não existindo esta redução nos grupos A/P e P/P, o que constitui para os autores o principal resultado obtido.

Podemos então concluir que existem estudos que nos fornecem as primeiras indicações dos efeitos a curto prazo da ingestão de probióticos na resposta imune oral, reforçando os seus benefícios clínicos observados na saúde gengival (Twetman et al., 2008). No entanto, esta importante área de estudo terá que ser alvo de maior e mais aprofundada investigação (Twetman et al., 2008; Busscher et al., 1999).

ix. Bacteriocinas

As bacteriocinas são definidas como antibióticos proteicos (que contêm proteínas) produzidos por bactérias, que possuem a capacidade de matar estirpes da mesma bactéria ou espécies semelhantes provenientes de outras bactérias (Reeves, 1965).

O termo bacteriocina foi inicialmente atribuído a proteínas da *Escherichia coli* do tipo colicina, moléculas formadas por um processo que é letal para a bactéria produtora (Tagg & Dajani, 1976; Hardy, 1975). As bacteriocinas conhecidas actualmente representam uma vasta classe de antagonistas bacterianos heterogéneos que variam consideravelmente nos seus pesos moleculares, propriedades bioquímicas, gama de espécies sensíveis e mecanismos de acção (Jack, Tagg & Ray, 1995; Sahl, Jack & Bierbaum, 1995; Klaenhammer, 1993; Kolter & Moreno, 1992).

De forma geral, os microrganismos produtores de bacteriocinas são caracterizados pela sua capacidade de (referência):

- i. sintetizar a bacteriocina;
- ii. exportar (geralmente) a bacteriocina para dentro do milieuo extracelular;
- iii. exprimir imunidade específica às substâncias antibacterianas que estão a produzir.

As bacteriocinas, por definição, interagem com uma célula susceptível e interferem com a sua multiplicação, metabolismo ou viabilidade. Contudo, elas não têm

necessariamente que entrar numa célula susceptível para serem efectivas. A maioria das bacteriocinas, senão todas, são bactericidas contra as suas células susceptíveis alvo, no entanto, esta interacção pode ou não resultar na lise da célula afectada. Para que a célula produtora sobreviva na presença da sua própria bacteriocina é necessário um sistema imune específico (Chikindas et al., 1997).

A heterogeneidade bioquímica e genética das bacteriocinas reflecte-se nos resultados publicados na literatura devidos às suas óptimas condições de produção, purificação e mecanismo de acção. Os determinantes genéticos das bacteriocinas têm sido localizados tanto no cromossoma como no plasmídeo (Klaenhammer, 1993; Kolter & Moreno, 1992; Tagg & Dajani, 1976; Hardy, 1975). O espectro de actividade de uma bacteriocina é geralmente determinado pela presença de receptores específicos na superfície de bactérias susceptíveis. Em geral, as bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-negativas actuam apenas em espécies intimamente relacionadas, enquanto que as bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-positivas frequentemente inibem uma maior gama de espécies, por vezes até mesmo estirpes Gram-negativas (Chikindas et al., 1997).

Como já sabemos, a aderência da *Stp. mutans* à superfície dos dentes e a formação de placa dentária acidogénica são importantes fases no desenvolvimento da cárie (Loesche, 1986; Hamada & Slade, 1980; Gibbons, 1968). A este respeito, existem evidências *in vivo* e *in vitro* de que bacteriocinas produzidas por *Stp. mutans* e outras bactérias orais específicas podem contribuir para a ecologia de cárie dentária. As bactérias *Stp. mutans* há muito são conhecidas por produzir bacteriocinas (Kelstrup & Gibbons, 1969) e o termo mutacina foi originalmente proposto para moléculas deste tipo produzidas por estirpes de *Stp. mutans* (Hamada & Ooshima, 1975).

De forma a desenvolver apropriadamente bacteriocinas como nova terapia anti-cárie ou agentes anti-placa, é necessário que se obtenha um conhecimento detalhado da sua organização genética e mecanismo de acção. O mecanismo de acção tem sido determinado por várias bacteriocinas diferentes incluindo colicinas, lactococinas, megacinas, pesticinas e mutacinas II (Chikindas et al., 1995; Chikindas, Garcera, & Driessen, 1993; Gao, Abee, & Konings, 1991; Van Belkum, Kok, & Venema, 1991; Konisky, 1982). Além disso, os genes estruturais codificadores de várias bacteriocinas foram recentemente clonados e sequenciados (Sahl, Jack, & Bierbaum, 1995; Klaenhammer, 1993; Kolter & Moreno,

1992). Contudo, relativamente pouco é conhecido acerca do mecanismo de acção de bacteriocinas anti-*Stp. mutans*, algumas são conhecidas por inibir processos de síntese em células alvo (Hamada, Imanishi, & Ooshima, 1986; Takada et al., 1984), e a existência de receptores específicos para bacteriocinas na superfície de células susceptíveis também já foi sugerido (Hamada, Imanishi, & Ooshima, 1986). A mutacina II é bactericida para uma vasta gama de bactérias Gram-positivas, incluindo *Stp. mutans* por inibição do seu metabolismo energético (Chikindas et al., 1995).

Nesta linha de investigação, sabemos que, actualmente, estão a direccionar-se esforços para terapias de substituição em estirpes bacterianas como meio de controlar um inúmero de doenças infecciosas. Em doenças dentárias, a maior parte do trabalho está centrado na substituição de estirpes que produzam substâncias antibacterianas que possam fornecer profilaxia contra a cárie dentária. As principais vantagens da terapia de substituição são (Hillman & Socransky, 1987):

- i. baixo custo;
- ii. tempo de aplicação curto;
- iii. possibilidade de protecção a longo prazo no caso de colonização bem sucedida;
- iv. protecção hereditária por transmissão natural do microorganismo terapêutico pela população humana

Uma das principais condições para uma terapia de substituição de sucesso é encontrar uma estirpe efectora que seja não patogénica, capaz de estabelecer o mesmo nicho ecológico que os patogéneos alvo e capaz de inibir ou substituir especificamente os patogéneos alvo. Uma terapia de substituição usando produtores de bacteriocinas cuidadosamente escolhidos fornece um mecanismo ecológico para o local específico e uma entrega contínua de uma bacteriocina com actividade contra um grupo limitado de espécies bacterianas patogénicas alvo (Hillman & Socransky, 1987).

Um estudo clínico conduzido há mais de 30 anos envolveu o uso de um inóculo oral de *Bacillus brevis* para substituição de uma bactéria patogénica (Rutter et al., 1961). A introdução oral, *in vivo*, de uma estirpe de *Bacillus brevis* resultou numa redução de 50% na incidência de cárie dentária no grupo experimental constituído por participantes

voluntários. Um efeito similar foi demonstrado para uma estirpe produtora de bacteriocinas de *Enterococcus faecalis* num teste *in vivo* (Jett & Gilmore, 1990), levando os autores a recomendarem a estirpe como candidata para aplicação de terapia de substituição.

De facto, podemos afirmar que muitas das mutacinas e outras bacteriocinas terão potencial como novos agentes para serem usados na prevenção de cáries (Jett & Gilmore, 1990; Svanberg & Loesche, 1978). A bacteriocina C3603 mostrou reduzir significativamente o nível de *Stp. mutans* e a incidência de cárie dentária em ratos e humanos (Ikeda et al., 1985; Hirasawa et al., 1984). Um efeito similar foi alcançado em humanos tratados com bacteriocina Rm10 (Fukushima et al., 1983) e em hamsters tratados com stafilococcina 1580 (Fitzgerald et al., 1986). Neste último estudo, o tratamento resultou numa redução de aproximadamente 60% de cárie e numa significativa inibição dos níveis de *Stp. mutans*.

É certo que as discussões originais acerca do possível papel terapêutico das bacteriocinas (Farkas-Himsley, 1980) não se focaram especificamente em aplicações dentárias, todavia, todo o trabalho que tem vindo a ser realizado em mutacinas e nisina sugere que as bacteriocinas possuem um potencial considerável no tratamento de doenças dentárias (James & Tagg, 1991).

É pertinente mencionar que o desenvolvimento de péptidos com actividade antimicrobiana para eventual uso clínico pode ter um benefício duplo, por um lado, eles podem ser usados directamente em tratamentos, por outro, podem servir como uma força de selecção na terapia de substituição de estirpes, para manter uma bactéria produtora de bacteriocinas não patogénica no nicho, de forma a prevenir a proliferação da estirpe patogénica. Apesar da nisina e a pediocina PA-1 serem actualmente as únicas bacteriocinas aprovadas para consumo humano, existe um grande interesse noutras bacteriocinas que possuem diferentes propriedades e exibem um largo espectro de acção inibitória. As bacteriocinas produzidas por fermentação podem ser purificadas e adicionadas a diferentes formulações como químicos puros e administrados localmente para inibir o crescimento de patogéneos orais (Chikindas et al., 1997).

As bacteriocinas são geralmente não tóxicas, inodoras, incolores e sem sabor, e os seus mecanismos de acção diferem dos antibióticos convencionais, incluindo a sua

especificidade para uma gama mais estrita de espécies bacterianas, sendo que as resistências cruzadas de bacteriocinas com antibióticos administrados sistemicamente serão improváveis de se desenvolver. Além disso, porque as bacteriocinas são geralmente inactivadas por uma ou mais enzimas proteolíticas presentes no tracto digestivo dos humanos, elas serão metabolizadas tal como quaisquer outras proteínas da dieta (Chikindas et al., 1997).

Finalmente, uma outra vantagem das bacteriocinas, é o facto de, sendo produtos naturais, poderão ser melhor aceites pelo público que os agentes químicos sintéticos (Chikindas et al., 1997).

x. Outros compostos

Existem ainda fitoquímicos não mencionados anteriormente que demonstraram igualmente ter propriedades antimicrobianas. Um dos casos que merece a nossa atenção diz respeito ao sumo de arando (*cranberry juice*). Historicamente, as mulheres têm sido aconselhadas ao consumo deste sumo, no sentido de prevenir ou, até mesmo, curar infecções do trato urinário (Ciocan & Bara, 2007). Desde o início dos anos 90, alguns investigadores descobriram que a frutose monossacarídica, presente nos sumos de arando e mirtilo (*blueberry juice*), inibem competitivamente a absorção do patógeno *E.coli* para as células epiteliais do trato urinário, e previnem a adesão de *Helicobacter pylori* à mucosa gástrica (Ciocan & Bara, 2007; Johnson-White et al., 2007; Koo et al., 2006).

Vários estudos examinaram a capacidade do sumo de arando, ou constituintes do arando, na prevenção da adesão de patógenos orais a superfícies e fenómenos relacionados, tais como, produção de glucanos e frutanos, e a formação de biofilmes (Palombo, 2009). Foi possível comprovar que, uma preparação de elevado P.M (Peso Molecular) de constituintes de sumo de arando, inibe a formação de biofilme, reduz a actividade da fructosiltransferase e da glucosiltransferase (Steinberg et al, 2004). O efeito inibitório e específico do sumo de arando na formação de biofilme pela *Stp. mutans*, demonstra estar relacionado com a inibição de processos relacionados com os glucanos (inibição da glucosiltransferase, bloqueio da adesão bacteriana mediado por glucanos de superfície e redução do conteúdo de glucano insolúvel) (Koo et al, 2006). Todas estas

constatações indicam que o sumo de arando poderá prevenir o desenvolvimento de placa bacteriana, através da inibição da fase inicial da sua formação.

Recentemente, os constituintes activos do sumo de arando contra os biofilmes de *Stp. mutans* têm sido identificados como sendo polifenóis, especificamente proantocianidinas (actual designação para taninos condensados) e flavonóis (Duarte et al, 2006).

IV. METODOLOGIAS DE INVESTIGAÇÃO: O CASO DA VACINA CONTRA A CÁRIE DENTÁRIA

Como já tivemos oportunidade de referir, a cárie dentária é uma das doenças infecciosas com maior prevalência em humanos. Posto isto, apresenta-se como indiscutivelmente necessária uma investigação intensiva que se debruce sobre uma vacina contra esta doença (Hanada, 2000).

Para a concretização do desenvolvimento eficaz e seguro desta vacina, vários esforços têm sido dirigidos para a obtenção de uma caracterização funcional dos factores de virulência das bactérias (Walden & Wilensky, 1982, cit. por Ferreira et al., 1997).

Um importante factor de virulência, que se revela crucial na sobrevivência dos microrganismos, são as proteínas imunossupressoras por si produzidas (Tavares et al., 1993; Lima et al., 1992; Ferreira et al., 1988; Santarém et al., 1987). Como descreveu Ferreira et al. (1997), *Stp. sobrinus* segrega uma proteína imunomoduladora associada à virulência (VIP) que, tal como a VIP segregada por outros microrganismos, inibe a resposta específica do hospedeiro por activação policlonal não-específica dos linfócitos (Tavares et al., 1993; Lima et al., 1992; Arala-Chaves et al., 1988; Ferreira et al., 1988) e por indução de uma precoce produção de IL-10 no hospedeiro (Ferreira et al., 1997).

As VIP's actuam como factores de virulência porque a sua produção está interligada com a patogenicidade do microrganismo de que derivam, e o tratamento do hospedeiro com a VIP antes da colonização, aumenta a especificidade da mesma (Tavares et al., 1993; Lima et al., 1992; Soares et al., 1990; Santarém et al., 1987). Assim sendo, a produção destas VIP's parece servir como um mecanismo de evasão imune entre patogéneos, daí a

possibilidade de ser usada como alvo na vacinação, induzindo uma protecção específica contra microrganismos (Tavares et al., 1995).

Em 2004, Dinis et al. centraram-se no estudo de uma VIP segregada por *Stp. sobrinus* como um novo alvo para a vacinação contra cáries induzidas por esta bactéria. Esta vacinação é uma vacinação terapêutica, uma vez que ocorre após implantação da bactéria na cavidade oral do rato. Este estudo demonstrou que a indução da resposta do anticorpo IgA da saliva contra a VIP segregada por *Stp. sobrinus*, após a imunização intranasal com uma VIP activa ou inactivada por calor, em ratos, está associada à protecção contra a cárie dentária induzida por *Stp. sobrinus*. Os autores perceberam igualmente que não existem diferenças significativas entre a imunidade induzida pela VIP activa e pela inactivada por calor. Para além disso, observaram que os níveis de IgA específica na saliva eram significativamente maiores nos grupos imunes por VIP, o que indica que a VIP induz a imunidade da mucosa. Tendo em conta os resultados obtidos neste estudo, os autores sugerem que a mesma abordagem possa ser aplicada na vacinação terapêutica da mucosa contra a cárie dentária em humanos.

A enolase é uma das importantes enzimas glicolíticas geralmente encontradas no citoplasma, esta enzima cataliza a desidratação do 2-fosfoglicerato a PEP (fosfo-enol-piruvato), um importante intermediário metabólico. Contudo, outras funções têm sido atribuídas à enolase (Pancholi & Fischetti, 1998; Breitenbach et al., 1997; Aaronson et al., 1995; Wistow et al., 1991; Williams et al., 1985), tais como a expressão de superfície da enzima como um factor importante na patogénese de *Stp. pyogenes* (Pancholi & Fischetti, 1998). Estudos com *C. albicans* e *C. tropicalis*, identificaram a enolase como um antigénio imunodominante (Mitsutake et al., 1994; Sundstrom & Aliaga, 1992; Walsh et al., 1991). Mais ainda, o efeito bacteriostático do fluoreto na cárie dentária é considerado ser o resultado da inibição da enolase pelo fluoreto (Hamilton, 1977; Huther et al., 1990).

Partindo destas constatações, Veiga-Malta et al. (2004) clonaram e sequenciaram o gene da enolase de *Stp. sobrinus* e caracterizaram a expressão da proteína num sistema heterólogo. A enolase recombinante suprime a resposta imune primária contra um antigénio dependente de células-T, mas não estimula as células-B dos ratos, sugerindo que as actividades imunobiológicas complementares da infecção por *Stp. sobrinus* (estimulação e supressão) são causadas por, pelo menos, duas proteínas. Estes mesmos autores haviam já

descrito a purificação parcial da proteína segregada por *Stp. sobrinus* com propriedades imuno-estimulantes e imunossupressoras, e a sua tentativa de identificação como enolase, baseada na determinação da sequência do aminoácido terminal N18 (Ferreira et al., 1997). Estes resultados demonstraram que, diferentes proteínas estão envolvidas nos fenómenos imunobiológicos durante a invasão patogénica e subsequente sobrevivência de *Stp. sobrinus*, em ratos, incluindo a enolase como um imunossupressor. No entanto, ter como alvo de neutralização estas conhecidas moléculas pode revelar-se como uma estratégia terapêutica útil no tratamento da cárie dentária induzida por *Stp. sobrinus* (Veiga-Malta et al., 2004).

Nesta linha de estudos, Dinis et al. (2009) testaram a redução de cárie dentária induzida pela enolase recombinante (enolaseR) de *Stp. sobrinus* na terapêutica de imunidade oral, e a segurança desta vacina por avaliações histopatológicas. A enolase é uma proteína que está associada a várias doenças autoimunes por induzir a produção de anticorpos contra ela mesma. Posto isto, os autores acharam igualmente necessário averiguar se os anticorpos produzidos pelo sistema imune contra a enolase bacteriana seriam capazes de a distinguir da enolase humana.

Este estudo demonstrou que a vacinação terapêutica com enolaseR reduziu as lesões por cárie induzidas por *Stp. sobrinus* e foi bem tolerada, havendo uma significativa redução de cáries no esmalte dos ratos imunizados pela enolaseR quando comparados com ratos imunizados com PBS. Em concordância com a redução do número de lesões por cárie, foi também observado um decréscimo na colonização oral por *Stp. sobrinus* em ratos imunizados pela enolaseR. Esta imunidade induziu um elevado nível de IgA na saliva, que reage especificamente à enolaseR, estando este resultado directamente relacionado com a redução do número de bactérias detectadas, assim como, com uma redução na extensão das cáries observadas neste grupo (Dinis et al., 2009).

Quanto aos efeitos histopatológicos, a vacina não parece apresentar efeitos fisiológicos prejudiciais nos ratos, podendo ser um antigénio alvo útil na vacinação humana contra a cárie dentária (Dinis et al., 2009).

Dada a existência de um elevado grau de semelhanças entre a enolase de *Stp. sobrinus* e de *Stp. mutans* (98%), os autores antecipam que os anticorpos anti-enolase produzidos contra uma das espécies *Streptococcus* deverão ser capazes de reconhecer a

enolase da outra espécie e vice-versa. Desta forma, e ainda que seja necessária uma maior investigação, sai reforçado o interesse da enolaseR como um antigénio candidato à vacina contra a cárie induzida por estas espécies de *Streptococcus* produtoras de ácido láctico (Dinis et al., 2009).

Mais recentemente, nesta linha de estudos que temos vindo a descrever, os investigadores, partindo de resultados anteriores em que foi possível observar que a enolaseR conferia protecção contra a cárie dentária induzida em ratos (Dinis et al., 2009), comprovaram através deste estudo que a imunidade materna com enolaseR protege igualmente os dentes decíduos da cárie dentária. Mais ainda, a protecção adquirida através da placenta demonstrou ser mais efectiva do que a transmitida pela amamentação. Para obter estas conclusões, tentaram perceber até que ponto a vacinação de fêmeas jovens de ratos Wistar com enolaseR poderia conferir protecção contra cárie dentária à descendência, através de transferência passiva de imunidade. Numa descrição mais pormenorizada poderemos afirmar que os resultados obtidos demonstraram que a vacinação com enolaseR foi capaz de induzir imunidade sistémica específica e humoral da mucosa em ratos fêmea não grávidas. Uma significativa redução da colonização bacteriana foi também observada em crias nascidas ou amamentadas por mães imunizadas por enolaseR. O decréscimo da colonização oral foi correlacionado com uma redução significativa em lesões por cárie, em que a maior redução foi observada nos grupos de ratos cujas crias foram amamentadas por mães imunizadas ou crias nascidas pelas mesmas. Foi também investigada a efectividade de duas opções distintas para transmissão da imunidade materna à descendência, anticorpos transferidos via placenta (via pré-natal) ou anticorpos transferidos pela amamentação (via pós-natal). Conseguiu-se verificar que o anticorpo protector transmitido via placenta foi o principal mecanismo de aquisição de protecção contra cárie dentária induzida por *Stp. sobrinus* (Dinis et al., 2011).

Este foi o primeiro estudo experimental a demonstrar que a vacinação materna contra a cárie dentária confere protecção à descendência (Dinis et al., 2011).

V. CONCLUSÃO

Sendo a base do presente estudo a recolha e análise bibliográfica no que respeita às novas terapias antimicrobianas para doenças da cavidade oral, demos conta das principais abordagens actualmente existentes nesta área de actuação, destacando-se entre elas o uso de fitoquímicos tais como: compostos fenólicos; flavonas, flavonoídes e flavonóis; chá verde; terpenos e óleos essenciais; alcaloídes; açúcares-álcool; antioxidantes; probióticos; e bacteriocinas.

Ainda que sejam evidentes as vantagens destas novas terapias ao nível da prevenção da cárie dentária e doença periodontal, e conseqüentemente da prevalência destas doenças, estudos futuros *in vivo*, terão de ser levados a cabo com o objectivo de explorar e comprovar aspectos como a segurança, a eficácia ou a aceitação destas novas abordagens no tratamento das principais doenças da cavidade oral compiladas no presente estudo.

Estas novas estratégias, idealmente, devem reduzir os níveis de placa bacteriana sem afectar o equilíbrio biológico da cavidade oral, objectivo ainda não claramente comprovado, apesar de ser cada vez maior a investigação desenvolvida em torno desta temática.

VI. BIBLIOGRAFIA

Aaronson, R., Graven, K., Tucci, M., MacDonald, R., & Farber, H. (1995) Non-neuronal enolase is an endothelial hypoxic stress protein. *Journal of Biological Chemistry*, 270: 27752–27757.

Aas, J., Paster, B., Stokes, L., Olsen, I., & Dewhirst, F. (2005). Defining the Normal Bacterial Flora of the Oral Cavity. *Journal of Clinical Microbiology*, 43 (11): 5721 – 5732.

Abu-Shanab, B., Adwan, G., Abu-Safiya, D., Jarrar, N., & Adwan, K. (2004). Antibacterial activities of some plant extracts utilized in popular medicine in palestine. *Turkish Journal of Biology*, 28: 99-102.

Allaker, R., & Douglas, C. (2009). Novel anti- microbial therapies for dental plaque-related diseases. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 33: 8-13.

Alves, P., Queiroz, L., Pereira, J., & Pereira, M. (2009). Atividade antimicrobiana, antiaderente e antifúngica *in vitro* de plantas medicinais brasileiras sobre microrganismos do biofilme dental e cepas do género *Cândida*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 42 (2): 222-224.

Alviano, W., Alviano, D., Diniz, C., Antonioli, A., Alviano, C., Farias, L., Carvalho, M., Souza, M., & Bolognese, A. (2008). *In vitro* antioxidant potential of medicinal plant extracts and their activities against oral bacteria based on brazilian folk medicine. *Archives of Oral Biology*, 53: 545-552.

Amaechi, B., Higham, S., & Edgar, W. (1998). The influence of xylitol and fluoride on dental erosion *in vitro*. *Archives of Oral Biology*, 43: 157-161.

Arab, L., Liu, W., & Elashoff, D. (2009). Green and black tea consumption and risk of stroke. A meta-analysis. *Stroke*, 40 (5): 1786–1792. [Abstract]

Arala-Chaves, M. (1992). Is prophylactic immunostimulation of the host against pathogenic microbial antigens an adequate strategy of immunoprotection? *Scand. Journal of Immunology*, 35:495.

Arends, J., Christoffersen, J., Schuthof, J., & Smiten, M. (1984) Influence of xylitol on demineralization of enamel. *Caries Research*, 18: 296-301.

Azul, A., & Trancoso, P. (2006). Patologia mais frequente da mucosa oral. *Revista Portuguesa de Clínica Geral*, 22: 369-377.

Balakrishnan, M., Simmonds, R., & Tagg, J. (2000). Dental caries is a preventable infectious disease. *Australian Dental Journal*, 45 (4): 235-245.

Banerjee, A., Watson, T., & Kidd, E. (2000). Dentine caries excavation: a review of current clinical techniques. *British Dental Journal*, 188(9):

Batista, O., Duarte, A., Nascimento, J., & Simões, M. (1994). Structure and antimicrobial activity of diterpenes from the roots of *Plectranthus hereroensis*. *Journal of Natural Products*, 57: 858-859. [Abstract]

Bielecka, M., Biedrzycka, E., & Majkowska, A. (2002). Selection of probiotics and prebiotics for symbiotics and confirmation of their in vivo effectiveness. *Food Research International*, 35 (2/3): 125-131. [Abstract]

Breitenbach, M., Simon, B., Probst, G., Oberkofler, H., Ferreira, F., Briza, P., *et al.* (1997). Enolases are highly conserved fungal allergens. *International Archives Allergy Immunology*, 113: 114–117.

Brostek, A., Bochenek, A., & Walsh, L. (2006). Minimally invasive operative techniques using high tech dentistry. *High Tech Dentistry*, 106-108.

Brostek, A., Bochenek, Walsh, L. (2006). Minimally invasive operative techniques using high tech dentistry. *Dental Practice*.

Busscher, H., Mulder, A., & Van der Mei H. (1999). In to enamel and in vivo colonization of tooth surfaces by lacto- bacilli from Bio-yoghurt. *Caries Research*, 33: 403-404. [Abstract]

Byun, R., Nadkarni, M., Chhour, K., Martin, E., Jacques, N., & Hunter, N. (2004). Quantitative analysis of diverse *Lactobacillus* species present in advanced dental caries. *Journal of Clinical Microbiology*, 42 (7): 3128-3136.

Cai, L., & Wu, C. (1996). Compounds from *Syzygium aromaticum* possessing growth inhibitory activity against oral pathogens. *Journal Natural Products*, 59: 987-990.

Cai, L., Wei, G., Bijl, P., & Wu, C. (2000). Namibian chewing stick, *Diospyros lycioides*, contains antibacterial compounds against oral pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 909-914.

Calder, P., & Kew, S. (2002). The immune system: a target for functional foods? *British Journal of Nutrition*, 88(1): 165-176. [Abstract]

Cannon, R., Holmes, A., Mason, A., & Monk, B. (1995). Oral candida: Clearance, colonization, or candidiasis?. *Journal of Dental Research*, 74: 1152-1159.

Carabin, I., & Flamm, W. (1999). Evaluation of safety of inulin and oligofructose as dietary fiber. *Regulatory Toxicology Pharmacology*, 30: 268-282.

Charteris, W., Kelly, P., Morelli, L., & Collins, J. (1998). Ingredient selection criteria for probiotic microorganisms in functional dairy foods. *International Journal Dairy Technology*, 51 (4): 123-136. [Abstract]

Chikindas, M., García-Garcera, M., Driessen, A., Ledebøer, A., Nissen- Meyer, J., Nes, I., Abee, T., Konings, W., & Venema, G. (1993). Pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0 forms hydrophilic pores in the cytoplasmic membrane of target cells. *Applied Environmental Microbiology*, 59: 3577-3584.

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

Ciocan, I., & Bara, I. (2007). Plant products as antimicrobial agents. *Analele Stiintifice ale Universitatii*, TOM VIII: 151-156.

Clement, Y. (2009). Can green tea do that? A literature review of the clinical evidence. *Preventive Medicine*, 49: 83-87.

Collins, J., Thornton, G., & Sullivan, G. (1998). Selection of probiotic strains for human applications. *International Dairy Journal*, 8: 487-490. [Abstract]

Cummings, J., & Macfarlane, G. (2002). Gastrointestinal effects of prebiotics. *British Journal Nutrition*, 87(2): 145-151. [Abstract]

Dinis, M., Tavares, D., Fonseca, A., Faria, R., Ribeiro, A., Cabrita, A., & Ferreira, P. (2004). Therapeutic vaccine against *Streptococcus sobrinus* – induced caries. *Journal of Dental Research*, 83(4): 354-358.

Dinis, M., Tavares, D., Veiga-Malta, I., Fonseca, A., Andrade, E., Trigo, G., Ribeiro, A., Videira, A., Cabrita, A., & Ferreira, P. (2009). Oral therapeutic vaccination with *Streptococcus sobrinus* recombinant enolase confers protection against dental caries in rats. *The Journal of Infectious Diseases*, 199: 1-8.

Dinis, M., Trigo, G., Chaves, N., Fonseca, A., Ribeiro, A., Tavares, D., Cabrita, A., & Ferreira, P. (2011). rEnolase maternal immunization confers offspring caries protection. *Journal of Dental Research*.

Draghinescu, R. (2004). *In vitro* antibacterial effect of the Carisolv®-2 system. Thesis of Masters of Philosophy in Dentistry. Faculty of Dentistry – University of Bergen, Norway. 77.

Duarte, S., Gregoire, S., Singh, A., Vorsa, N., Schaich, K., Bowen, W., & Koo, H. (2006). Inhibitory effects of cranberry polyphenols on formation and acidogenicity of *Streptococcus mutans* biofilms. *FEMS Microbiology Letters*, 257(1): 50–56.

Elahi, S., Pang, G., Ashman, R., & Clancy, R. (2005). Enhanced clearance of *Candida albicans* from the oral cavities of mice following oral administration of *Lactobacillus acidophilus*. *Clinical and Experimental Immunology*, 141: 29-36.

Farkas-Himsley, H. (1980). Bacteriocins - are they broad-spectrum antibiotics?. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 6(4):424-426.

Ferreira, P., Brás, A., Tavares, D., Vilanova, M., Ribeiro, A., Videira, A., & Arala-Chaves, M. (1997). Purification, and biochemical and biological characterization of a immunosuppressive and lymphocyte mitogenic protein secreted by *Streptococcus sobrinus*. *International Immunology*, 11(9): 1735-1743.

Ferreira, P., Soares, R., Ribeiro, A., & Arala-Chaves, M. (1988). Correlation between specific immunosuppression and polyclonal B cell activation induced by a protein secreted by *Streptococcus mutans*. *Scand. Journal of Immunology*, 27:549.

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

Fitzgerald, R., Fitzgerald, D., Adams, B. (1986). Effects of chlorhexidine gluconate in drinking water on dental caries and oral microorganisms in the Syrian hamster. *Archives Oral Biology*, 31(10): 707-709. [Abstract]

Fukushima, H., Kelstrup, J., Fukushima, S., Umamoto, T., & Sagawa, H. (1983). Isolation, partial purification and preliminary characterization of a bacteriocin from *Streptococcus mutans* Rm-10. *Antonie van Leeuwenhoek*, 49:41-50. [Abstract]

Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 66: 365-378.

Gao, F., Abee, T., & Konings, W. (1991). Mechanism of Action of the Peptide Antibiotic Nisin in Liposomes and Cytochrome c Oxidase-Containing Proteoliposomes. *Applied Environmental Microbiology*, 57(8): 2164-2170.

Gedalia, I., Dakuar, A., Shapira, L., Lewinstein, I., Goultchin, J., & Rahamim, E. (1991). Enamel softening with Coca-Cola and rehardening with milk or saliva. *American Journal of Dentistry*, 4(3):120-122. [Abstract]

Gibbons, R. (1964). Bacteriology of dental caries. *Journal of Dental Research*, 43 (6): 1021-1028.

Gibson, G., & Roberfroid, M. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *Journal Nutrition*, 125: 1401-1412.

Gomis, J., Solanas, A., Viñas, M., González, P., Planas, M., & Sánchez, S. (1999). Effects of tropical application of free and liposome-encapsulated lactoferrin and lactoperoxidase on oral microbiota and dental caries in rats. *Archives of Oral Biology*, 44: 901-906.

Gorbach, S. (2002). Probiotics in the third millennium. *Digestive and Liver Disease*, 34(2): 52-57.

Greene, J., (1963). Oral hygiene and periodontal disease. *American Journal of Public Health*, 53(6): 913-922.

Guarner, F., & Malagelada, J. (2003). Gut flora in health and disease. *Lancet*, 360: 512-518. [Abstract]

Hamada, S., & Ooshima, T. (1975). Inhibitory Spectrum of a Bacteriocinlike Substance (Mutacin) Produced by Some Strains of *Streptococcus mutans*. *Zentralblatt für Bakteriologie*, 285(1): 74-81. [Abstract]

Hamada, S., & Slade, H. (1980). Biology, Immunology, and Cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiological Reviews*, 44 (2): 331-384.

Hamada, S., Imanishi, H., & Ooshima, T. (1986). Isolation and mode of action of a cell-free bacteriocin (mutacin) from serotype g *Streptococcus mutans* MT3791. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A.*, 261(3):287-298. [Abstract]

Hamblin, M., & Hasan, T. (2004). Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infections disease?. *Photochemistry Photobiology Science*, 3: 436-450.

Hamilton-Miller, J. (2001). Anti-cariogenic properties of tea (*Camelia sinensis*). *Journal of Medical Microbiology*, 50: 299-302.

Hamilton, I. (1977). Effects of fluoride on the enzymatic regulation of bacterial carbohydrate metabolism. *Caries Research*, 11: 262–291

Hanada, N. (2000). Current understanding of the cause of dental caries. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 53:1-5.

Hietala, E., & Larmas, M. (1995). Effects of xylitol and carbohydrate diets on dental caries, dentine formation and mineralization in young rats. *Archives oral Biology*, 40(12): 1137-1141.

Hillman, J., & Socransky, S. (1987). Replacement Therapy for the Prevention of Dental Disease. *Advanced Journal Research*, 1(1): 119-125. [Abstract]

Hirasawa, M., Takada, K., Makimura, M., & Otake, S. (2002). Improvement of periodontal status by green tea catechin using a local delivery system: A clinical pilot study. *Journal of Periodontal Research*, 37: 433-438.

Holzappel, W., & Schillinger, U. (2002). Introduction to pre- and probiotics. *Food Research International*, 35 (2/3): 109-116. [Abstract]

Hooper, L., Kroon, P., Rimm, E., Cohn, J., Harvey, I., Le Cornu K., Ryder, J., Hall, W., & Cassidy, A. (2008). Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: a meta-analysis of randomized controlled trials. *American Journal of Clinical Nutrition*, 88 (1): 38-50.

Hu JP, Takahashi N, Yamada T. Coptidis rhizoma inhibits growth and proteases of oral bacteria. *Oral Dis* 2000;6:297–302.

Huther, J., Psarros, N., & Duschner, H. (1990). Isolation, Characterization, and Inhibition Kinetics of Enolase from *Streptococcus rattus* FA-1. *Infection and Immunity*, 58 (4): 1043-1047. [Abstract]

Ide, R., Fujino, Y., Hoshiyama, Y., Mizoue, T., Kubo, T., Pham, T., Shirane, K., Tokui, N., Sakata, K., Tamakoshi, A., & Yoshimura, T. (2007). A prospective study of green tea consumption and oral cancer incidence in Japan. *AEP*, 17 (10): 821-826.

Ikeda, T., Hamada, H., Miki, K., Senda, M. (1985). Glucose oxidase- immobilized benzoquinone/carbon paste electrode as a glucose sensor. *Agriculture, Biology and Chemistry*, 49: 541-543. [Abstract]

Imai, T., Hieshima, K., Haskell, C., Baba, M., Nagira, M., Nishimura, M., Kakizaki, M., Takagi, S., Nomiyama, H., Schall, T., & Yoshie, O. (2000). Identification and Molecular Characterization of Fractalkine Receptor CX₃CR1, which Mediates Both Leukocyte Migration and Adhesion. *Cell Press*, 91(4): 521-530. [Abstract]

Isolauri, E., Salminen, S., & Ouwehand, A. (2004). Probiotics. *Best Practice Research Clinic Gastroenterology*, 18(2): 299-313.

Jack, R., Tagg, J., & Ray, B. (1995). Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria. *Microbiological Reviews*, 59(2): 171–200.

James, S., & Tagg, J. (1991). The prevention of dental caries by BLIS-mediated inhibition of mutans streptococci. *New Zeland Dental Journal*, 87(389): 80-83. [Abstract]

Jarvinen, V., Rytomaa, I., & Heinonen, O. (1991). Risk factors in dental erosion. *Journal of Dental Research*, 70: 942-947.

Jett, B., & Gilmore, M. (1990). The growth-inhibitory effect of the *Enterococcus faecalis* bacteriocin to the oral streptococci. *Journal of Dental Research*, 69: 1640-1645. [Abstract]

Johnson-White, B., Lin, B., & Ligler, F. (2007). Combination of immunosensor detection with viability testing and confirmation using the polymerase chain reaction and culture. *Analytical Chemistry*, 79: 140–214. [Abstract]

Kaur, N., & Gupta, A., (2002). Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. *Journal of Bioscience*, 27: 703-714. [Abstract]

Kelstrup, J., & Gibbons, R. (1969). Bacteriocins from human and rodent streptococci. *Archives of Oral Biology*, 14: 251-258. [Abstract]

Klaenhammer, R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Microbiology Reviews*, 12: 39-85. [Abstract]

Kolter, R., & Moreno, F. (1992). Genetics of Ribosomally Synthesized Peptide Antibiotics. *Annual Review of Microbiology*, 46: 141-161. [Abstract]

Komine, K., Kuroishi, T., Ozawa, A., Komine, Y., Minami, T., Shimauchi, H., & Sugawara, S. (2007). Cleaved inflammatory lactoferrin peptides in parotid saliva of periodontitis patients. *Molecular Immunology*, 44: 1498-1508.

Konisky, J. (1982). Colicins and other Bacteriocins with Established Modes of Action. *Annual Review of Microbiology*, 36: 25-44. [Abstract]

Koo, H., Nino de Guzman, P., Schobel, B., et al. (2006). Influence of cranberry juice on glucan-mediated processes involved in *Streptococcus mutans* biofilm development. *Caries Research*, 40(1) :20-7.

Kopp-Hoolihan, L. (2001). Prophylactic and Therapeutic Uses of Probiotics: A review. *Journal of the American Dietetic Association*, 101 (2): 229-241. [Abstract]

Kuzuhara, T., Suganuma, M., & Fujiki, H. (2008). Green tea catechin as a chemical chaperone in cancer prevention. *Cancer Letters*, 261: 12-20.

Land, M., Stevens, K., Woods, C., Cannon, M., Cnota, J., & Shetty, A. (2004). *Lactobacillus* sepsis associated with probiotic therapy. *Pediatrics*, 115 (1): 178-181.

Lehman, L., Gedalia, I., & Westreich, V. (1974). Fluoride in teeth of rats using citrus beverage. *Annals Dentistry*, 33: 2-6. [Abstract]

Lima, G., Oliveira, E., Souza, J., & Neto, V., (2005). Comparison of the efficacy of chemomechanical and mechanical methods of caries removal in the reduction of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus spp* in carious dentine of primary teeth. *Journal of*

Applied Oral Science, 13(4): 399-405.

Lima, M., Bandeira, A., Portnoi, D., Ribeiro, A., & Arala-Chaves, M. (1992). Protective effect of a T cell dependent immunosuppressive B cell mitogenic protein (F3-EP-Si, or p90) produced by *Streptococcus intermedius*. *Infect. Immunology*, 60:3571.

Liskmann, S., Vihalemm, T., Salum, O., Zilmer, K., Fischer, K., & Zilmer, M. (2006). Correlations between clinical parameters and interleukin-6 and interleukin-10 levels in saliva from totally edentulous patients with peri-implant disease. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, 21(4): 543-50. [Abstract]

Liu, X., Shi, Y., Yu, B., Williams, I., Sung, H., Zhang, Q. et al. (2007). Antibacterial diterpenoids from *Sagittaria pygmaea*. *Planta Med*, 73: 84-90. [Abstract]

Loesche, W. (1986). Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiology Review*, 50:353.

Loesche, W., & Grossman, N. (2001). Periodontal disease as a specific, albeit chronic, infection: Diagnosis and treatment. *Clinical Microbiology Reviews*, 14 (4): 727-752.

Lourens-Hattingh, A., & Viljoen, B. (2001). Yogurt as probiotic carrier food. *International Dairy Journal*, 11: 1-17.

Love, R., & Jenkinson, H. (2002). Invasion of dentinal tubules by oral bacteria. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 13 (2): 171-183.

Magalhães, A., Wiegand, A., Rios, D., Hannas, A., Attin, T., Buzalaf, M. (2009). Chlorhexidine and green tea extract reduce dentin erosion and abrasion in situ. *Journal of Dentistry*, 37: 994-998.

Mager, D. L., L. A. Ximenez-Fyvie, A. D. Haffajee, and S. S. Socransky. 2003. Distribution of selected bacterial species on intraoral surfaces. *J. Clin. Peri-odontol.* 30:644-654.

Makinen, & K., Soderling, E. (1980). A quantitative study of mannitol, sorbitol, xylitol, and xylose in wild berries and commercial fruits. *Journal Food Science*, 45:367-371. [Abstract]

Mandel, I. (1988). Chemotherapeutic agents for controlling plaque and gingivitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 15: 488-498.

Marsh, P. (1994). Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Advances in Dental Research*, 8 (2): 263-271.

Marsh, P. (2006). Dental plaque as a biofilm and a microbial community – implications for health and disease. *BMC Oral Health*, 6 (1).

Marteau, P., & Boutron-Ruault, M. (2002). Nutritional advantages of probiotics and prebiotics. *British Journal Nutrition*, 87 (2): 153-157.

Martin, F., Nadkarni, M., Jacques, N., & Hunter, N. (2002). Quantitative microbiological study of human carious dentine by culture and real-time PCR: Association of anaerobes with histopathological changes in chronic pulpitis. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(5): 1698-1704.

Mattila-Sandholm, T., Myllarinen, P., Crittenden, R., Mogensen, G., Fondén, R., & Saarela, M. (2002). Technological challenges for future probiotic foods. *International Dairy Journal*, 12: 173-182.

Mattsson, C., Jonsson, R., Emilson, C., & Roos, K. (2009). Final pH affects the interference capacity of naturally occurring oral *Lactobacillus* strains against mutans streptococci. *Archives of Oral Biology*, 54: 602-607.

McKeown, S., Lundy, F., Nelson, J., Lockhart, D., Irwin, C., Cowan, C., & Marley, J. (2006). The cytotoxic effects of human neutrophil peptide-1 (HNP1) and lactoferrin on oral squamous cell carcinoma (OSCC) in vitro. *Oral Oncology*, 42: 685-690.

Meisel, P., & Kocher, T. (2005). Photodynamic therapy for periodontal diseases: State of the art. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 79: 159-170.

Meyer, M., Speight, P., & Bown, S. (1991). A study of the effects of photodynamic therapy on the normal tissues of the rabbit jaw. *British Journal Cancer*, 64: 1093-1097.

Millon, L., Manteaux, A., Reboux, G., Grobacheff, C., Monod, M, Barale, T., & Michel-Briand, Y. (1994). Fluconazole-Resistant recurrente oral candidiasis in human immunodeficiency virus-positive patients: Persistence of *Candida albicans* strains with the same genotype. *Journal of Clinical Microbiology*, 1115-1118.

Ministério da Saúde. (2008). *Programa nacional de promoção da saúde oral: Estudo nacional de prevalência das doenças orais*. Acedido em 23 de Maio de 2011, em <http://www.dgs.pt/default.aspx?cr=12995>.

Mitsutake, K., Kohno, S., Miyazaki, T., Miyazaki, H., Maesaki, S., & Koga, H. (1994). Detection of candida enolase antibody in patients with candidiasis. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 8(2): 207–210. [Abstract]

Mitsutake, K., Kohno, S., Miyazaki, T., Miyazaki, H., Maesaki, S., & Koga, H. (1994). Detection of Candida enolase antibody in patients with candidiasis. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 8: 207–210.

Narvai, P. (2000). Cárie dentária e flúor: uma relação do século XX. *Ciência e Saúde Colectiva*, 5(2): 381-392.

O'Brien, J., Crittenden, R., Ouwehand, A., & Salminen, S. (1999). Safety evaluation of probiotics. *Trends Food Science Technology*, 10: 418-424. [Abstract]

Onisi M. (1985). The feasibility of a tea drinking program for dental public health in primary schools. *Journal Dental Health*, 35: 134-144. [Abstract]

Osawa, K., Yasuda, H., Maruyama, T., Morita, H., Takeya, K., & Itokawa, H. (1992). Isoflavanones from the heartwood of *Swartzia polyphylla* and their antibacterial activity against cariogenic bacteria. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 40: 2970-2974.

Palombo, E. (2009). Traditional medicinal plant extracts and natural products with activity against oral bacteria: potential application in the prevention and treatment of oral diseases. Oxford University Press.

Pancholi, V., & Fischetti, V. (1998). α -Enolase. a Novel Strong Plasmin(ogen) Binding Protein on the Surface of Pathogenic Streptococci. *The Journal of Biological Chemistry*, 273 (23): 14503–14515.

Paster, J., Boches, S., Galvin, J., Ericson, R., Lau, C., Levanos, V., Sahasrabudhe, A., & Dewhirst, F. (2001). Bacterial diversity in human subgingival plaque. *Journal of Bacteriology*, 183:3770–3783. [Abstract]

Pereira, D., & Gibson, G. (2002). Cholesterol Assimilation by Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria Isolated from the Human Gut. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (9): 4689–4693.

Puupponen-Pimia, R., Aura, A., Oksman-Caldentey, K., Myllarinen, P., Saarela, M., Mattila-Sanholm, T., & Poutanen, K. (2002). Development of functional ingredients for gut health. *Trends Food Science Technology*, 13: 3-11.

Reeves, P. (1965). The bacteriocins. *Bacteriological Review*, 29:24.

Riverón, J., Quiñonez, J., & Fuentes, I. (2006). Caries dental y ecología bucal, aspectos importantes a considerar. *Revista Cubana de Estomatología*, 43 (1).

Roberfroid, M. (2001). Prebiotics: preferential substrates for specific germs? *American Journal Clinical Nutrition*, 73: 406-409.

Rosan, B., & Lamont, J. (2000). Dental plaque formation. *Microbes and Infection*, 2: 1599-1607.

Ruby, J., & Barbeau, J. (2002). The buccale puzzle: The symbiotic nature of endogenous infections of the oral cavity. *Canadian Journal of Infectious Diseases*, 1 (13): 34-40.

Rutter, W., Richards, O., & Woodfin, B. (1961). Comparative Studies of Liver and Muscle Aldolase. I. Effect of Carboxypeptidase on Catalytic Activity, *Journal Biology Chemistry*, 236: 3193. [Abstract]

Saad, S. (2006). Probióticos e prebióticos: o estado da arte. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 42 (1): 2-16.

Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Mättö, J., Mattila-Sandholm, T. (2000). Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, 84 (3):197-215. [Abstract]

Saeki, Y., Ito, Y., Shibata, M., Sato, Y., Okuda, K., & Takazoe, I. (1989). Antimicrobial action of natural substances on oral bacteria. *The Bulletin of Tokyo Dental College*, 30:129–135. [Abstract]

Sahl, H., Jack, R., & Bierbaum, G. (1995). Biosynthesis and Biological Activities of Lantibiotics with Unique Post-Translational Modifications. *European Journal of Biochemistry*, 230 (3): 827–853. [Abstract]

Salminen, S., Von Wright, A., Morelli, L., Marteau, P., Brassart, D., De Vos, W., Fondén, R., Saxelin, M., Collins, K., Mogensen, G., Birkeland, S., & Mattila-Sandholm, T. (1998). Demonstration of safety of probiotics: a review. *International Journal Food Microbiology*, 44: 93-106.

Samaranayake, L. (2006). Essential microbiology for dentistry. 3ª edição.

Sanders, M. (2003). Probiotics: considerations for human health. *Nutrition Review*, 61 (3): 91-99.

Sanders, M., Klaenhammer, T. (2001). Invited review: the scientific basis of *Lactobacillus acidophilus* NCFM functionality as a probiotic. *Journal of Dairy Science*, 84: 319-331.

Santarem, M., Porto, M., Ferreira, P., Soares, R., & Arala- Chaves, M. (1987). Semi-purification of an immunosuppressor substance secreted by *Streptococcus mutans*

which plays a role in the protection of the bacterium in the host. *Scand. Journal of Immunology*, 26:755. [Abstract]

Sasazuki, S., Inoue, M., Hanaoka, T., Yamamoto, S., Sobue, T., & Tsugane, S. (2004). Green tea consumption and subsequent risk of gastric cancer by site: the JPHC Study. *Cancer Causes Control*, 15 (5): 483–491. [Abstract]

Sato, M., Tanaka, H., Fujiwara, S., Hirata, M., Yamaguchi, R., Etoh, H., et al. (2002). Antibacterial property of isoflavonoids isolated from *Erythrina variegata* against cariogenic oral bacteria. *Phytomedicine*, 9: 427–433. [Abstract]

Shapiro, S., Meier, A., & Guggenheim (1994). The antimicrobial activity of essential oil components towards oral bacteria. *Oral Microbiology and Immunology*, 9: 202-208.

Silva, M., Salgado, I., Barreto, R., Santos, A. (2010). Remoção químico-mecânica da cárie dental com o uso de Carisolv™ *Chemomechanical caries removal using Carisolv™*. *Odontology*, 18(36):149-154.

Soares, R., Ferreira, P., Santarem, M., Silva, T., & Arala- Chaves, M. (1990). Low T and B cell reactivity is an apparently paradoxical request for murine immunoprotection against *Streptococcus mutans*. *Scand. Journal of Immunology*, 31:361. [Abstract]

Sorvari, R., Meurman, H., Alakuijala, P., & Frank, R. (1994) Effect of fluoride varnish and solution on enamel erosion in vitro. *Caries Research*, 28: 227-232.

Spencer, A., & Ellis, L. (1950). The effect of fluoride and grapefruit juice on the etching of teeth. *Journal Nutrition*, 43: 107-115. [Abstract]

Steinberg, D., Feldman, M., Ofek, I., & Weiss, E. (2004). Effect of a high-molecular-weight component of cranberry on constituents of dental biofilm. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, 54: 86–89.

Stoicov, C., Saffari, R., & Houghton, J. (2009). Green tea inhibits *Helicobacter* growth in vivo and in vitro. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 33: 473-478.

Sullivan, D., Haynes, K., Bille, J., Boerlin, P., Rodero, L., Lloyd, S., Henman, M., & Coleman, D. (1997). Widespread geographic distribution of oral *Candida dubliniensis* strains in human immunodeficiency virus-infected individuals. *Journal of Clinical Microbiology*, 4 (35): 960-964.

Sundstrom, P., & Aliaga, G. (1992). Molecular cloning of cDNA and analysis of protein secondary structure of *Candida albicans* enolase, an abundant immunodominant glycolytic enzyme. *Journal of Bacteriology*, 174: 6789–6799. [Abstract]

Svanberg, M., & Loesche, W. (1978). Intraoral Spread of *Streptococcus Mutans* in man. *Archives of Oral Biology*, 23: 557-561.

Tagg, J., Dajani, A., & Wannamaker, L. (1976). Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria. *Bacteriological Reviews*, 40 (3): 722-756.

Tagg, J., Wescombe, P., & Burton, J. (2006). Oral streptococcal BLIS: Heterogeneity of the effector molecules and potential role in the prevention of streptococcal infections. *International Congress Series*, 1289: 347-350.

Takahashi, N. (2005). Microbial ecosystem in the oral cavity: Metabolic diversity in an ecological niche and its relationship with oral diseases. *International Congress Series*, 1284: 103-112.

Takata, K., Ikeda, T., Mitsui, I., & Shiota, T. (1984). Mode of inhibitory action of a bacteriocin produced by *Streptococcus mutans* C3603. *Infectious Immunology*, 44: 370-378.

Tavares, D., Ferreira, P., Vilanova, M., Videira, A., & Arala-Chaves, M. (1995). Immunoprotection against systemic candidiasis in mice. *International Immunology*, activities of a *Candida albicans* protein which plays an important role in the survival of the microorganism in the host. *Infection and Immunity* 61:1881-1888.

Tong, D., & Rothwell, B. (2000). Antibiotic prophylaxis in dentistry: A review and practice recommendations. *The Journal of American Dental Association*, 131: 366-374.

Tsui, V., Wong, R., Bakr, A., & Rabie, M. (2007). The inhibitory effects of naringin

on the growth of periodontal pathogens *in vitro*. *Phytotherapy Research*, 22(3): 401–406.

Tulunoglu, O., Demirtas, S., & Tulunoglu, I. (2006). Total antioxidant levels of saliva in children related to caries, age, and gender. *International Journal of Paediatric Dentistry*, 16(3):186-91. [Abstract]

Twetman, S., & Stecksén-Blicks, C. (2008). Probiotics and oral health effects in children. *International Journal of Paediatric Dentistry*, 18: 3–10.

Uberos, J., Alarcón, J., Peñalver, M., Molina-Carballo, A., Ruiz, M., González, E., Castejon, J., & Muñoz-Hoyos, A. (2008). Influence of the antioxidant content of saliva on dental caries in a at-risk community. *British Dental Journal*, 205.

Van Belkum, M., Kok, J., Venema, G., Holo, H., Nes, I., Konings, W., & Abee, T. (1991). The Bacteriocin Lactococcin A Specifically Increases Permeability of Lactococcal Cytoplasmic Membranes in a Voltage-Independent, Protein-Mediated Manner. *Journal of Bacteriology*, 173: 7934-7941.

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): 79-88.

Walsh, T., Hathorn, J., Sobel, J., Merz, W., Sanchez, V., Maret, S., *et al.* (1991) Detection of circulating candida enolase by immunoassay in patients with cancer and invasive candidiasis. *The New England Journal of Medicine*, 324: 1026– 1031. [Abstract]

Williams, L., Ding, L., Horwitz, J., & Piatigorsky, J. (1985). tau-Crystallin from the turtle lens: purification and partial characterization. *Experimental Eye Research*, 40: 741–749.

Wilson, M. (2004). Lethal photosensitisation of oral bacteria and its potential application in the photodynamic therapy of oral infections. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 3: 412-418.

Wilson, M., Dobson, J., & Harvey, W. (1992). Sensitization of oral bacteria to killing by low-power laser radiation. *Current Microbiology*, 25: 77-81.

Wistow, G., Lietman, T., Williams, L., Stapel, S., deJong, W., Horwitz, J., & Piatigorsky, J. (1991). tau-crystallin/alpha-enolase: One gene encodes both an enzyme and a lens structural protein. *Journal Biological Macromolecules*, 13: 97-100.

Wolfram, S., Wang, Y., & Thielecke, F. (2006). Anti-obesity effects of green tea: from bedside to bench. *Molecular Nutrition and Food Research*, 50 (2): 176-187.

Ziemer, C., Gibson, G. (1998). An overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies. *International Dairy Journal*, 8: 473-479.