

SILVANA BOLDRINI FRANCISCO
Biomédica

**ESTUDO *IN SITU* DA RELAÇÃO ENTRE A FREQUÊNCIA DE
EXPOSIÇÃO À SACAROSE, CÁRIE EM ESMALTE DENTAL
HUMANO E CONTAGEM DE
ESTREPTOCOCOS DO "GRUPO MUTANS"
NA PLACA DENTAL**

*Este exemplar foi
corrigido e
revisado
CCPG 1036/83
Jaide*

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Ciências - Área de concentração em Biologia e Patologia Buco-Dental.

**- Piracicaba -
1995**

F847e

27042/BC

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

| | | | |
|-------------|--------------------------|---|-------------------------------------|
| UNIDADE | AC | | |
| N.º CHAMADA | 13410 | | |
| V. | Ex. | | |
| TOMBO BC/ | 27078 | | |
| PROC. | 567196 | | |
| C | <input type="checkbox"/> | D | <input checked="" type="checkbox"/> |
| PREÇO | R\$ 14,30 | | |
| DATA | 20/05/99 | | |
| N.º CPD | | | |

CM-00085378-3

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Biblioteca
da FOP-UNICAMP**

F847e

Francisco, Silvana Boldrini

Estudo *in situ* da relação entre a frequência de exposição à sacarose, cárie em esmalte dental humano e contagem de Estreptococos do "grupo mutans" na placa dental /Silvana Boldrini Francisco. - Piracicaba, SP : [s.n.], 1995.

127f. : il.

Orientador: Jaime Aparecido Cury.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Sacarose 2. Cáries dentárias.
3. Placas dentárias. I. Cury, Jaime Aparecido. II. Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

- 547.7815

19.CDD - 617.67

- 617.601

Índices para Catálogo Sistemático:

1. Sacarose 547.7815
2. Cáries dentárias 617.67
3. Placas dentárias 617.601



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Mestrado, em sessão pública realizada em 07/12/95, considerou o candidato aprovado.

1. Jaime Aparecido Cury

Handwritten signature of Jaime Aparecido Cury over a horizontal line.

2. Celso Paulino da Costa

Handwritten signature of Celso Paulino da Costa over a horizontal line.

3. Sérgio Luiz de Souza Salvador

Handwritten signature of Sérgio Luiz de Souza Salvador over a horizontal line.

DEDICO

Aos meus pais, *Renato* “in memorian” e *Mafalda*
pela dedicação, carinho, incentivo e exemplo de
luta por ideais verdadeiros e viver dignamente.

Ao *Marco Antonio* por todo apoio e compreensão.

Aos meus filhos, *Felipe* e *Manuella* razão
maior do meu viver.

Aos meus *irmãos* por toda a amizade
que nos une.

Ao Prof. Dr. *Jaime A. Cury*,

exemplo de ser humano e de profissional,
pelos seus ensinamentos e por sua constante
presença durante a elaboração deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES- pela concessão da bolsa de estudos.

À Prof. Dra. *Altair A. Del Bel Cury*, da FOP-UNICAMP, na co-orientação no decorrer do trabalho e sobretudo pela amizade.

Aos Profs. Drs. *Mathias Vitti*, *José Francisco Höfling* e *Sérgio Roberto Peres Line* ex-coordenadores e coordenador do curso de Pós-Graduação em Biologia e Patologia Buco Dental pela atenção dedicada.

Aos técnicos de Laboratório de Bioquímica Oral, FOP-UNICAMP, *Mariza de Jesus Carlos Soares*, *Waldomiro Vieira Filho*, aos técnicos de Laboratório de Microbiologia, *Wilma C. Ferraz*, *Elza M. Thomazini*, e *Adriano Luis Martins*, técnico do Laboratório de Patologia, pelo imprescindível apoio no decorrer das análises laboratoriais e pela demonstração de amizade.

Aos docentes do curso de Pós-Graduação em Biologia e Patologia Buco-Dental, pelos ensinamentos recebidos.

À Profª. Dra. *Rosana Cristina Pereira Parente*, do Departamento de Estatística da Universidade Federal do Amazonas pela realização da análise estatística.

Ao Prof. Dr. *Luis André Freire Pimenta* pela colaboração com a documentação fotográfica.

Aos Profs. Drs. *Celso Paulino da Costa* da FOP-UNICAMP e *Sérgio Luiz de Souza Salvador* da Faculdade Federal de Odontologia de Ribeirão Preto -USP, pelo apoio e amizade.

À *Eliane Melo Franco*, pela digitação do trabalho e principalmente pelo apoio e amizade.

Aos alunos de Pós-Graduação, *Maria Augusta B. Rebelo, Helena U. Decico, Cinthia Pereira Machado Tabchoury, Paulo E.C. Peres e Léa M. Bezerra de Menezes* e aos alunos de graduação *Lina Naomi Hashizume, Ricardo Takumi Yokoyama*, pela atenção e ajuda recebidas.

Aos voluntários participantes deste estudo, *Ana Carla, Caio, Cláudia Rahal, Cláudia Regina, Célia, Eliane, Kátia, Ricardo*, pela exemplo de responsabilidade.

À Sra. *Sueli Dinardi de Oliveira Soliani*, bibliotecária da FOP-UNICAMP, pela correção da revisão bibliográfica.

À *Cilene Maira Pompeu Cera*, técnica do Laboratório de Produção da FOP-UNICAMP, pela confecção dos dispositivos intra-orais.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

| | |
|--------------------------------------|-----|
| 1. Lista | 2 |
| 2. Resumo | 6 |
| 3. Introdução | 8 |
| 4. Proposição | 12 |
| 5. Revisão da Literatura | 14 |
| 6. Material e Métodos | 57 |
| 7. Resultados | 72 |
| 8. Discussão dos Resultados | 87 |
| 9. Conclusão | 92 |
| 10. Apêndice | 94 |
| 11. Summary | 110 |
| 12. Referências Bibliográficas | 112 |

LISTA

1. LISTA

1.1. FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1: Dispositivo intra-oral palatino | 60 |
| Figura 2: Característica cultural dos Estreptococos do “grupo mutans” em meio SB20 | 65 |
| Figura 3: Característica dos discos polidos, prontos para análise de microdureza dos blocos de esmalte dental | 68 |
| Figura 4: Média da contagem de Estreptococos do “grupo mutans” na placa para os 4 tratamentos (10^4) | 74 |
| Figura 5: Aspecto dos blocos dentais após os tratamentos com sacarose (de 0 a 8 x/dia) | 75 |
| Figura 6: Aspecto histológico do esmalte dental submetido ao tratamento 0 (zero) de sacarose | 76 |

Figura 7: Aspecto histológico do esmalte dental submetido ao tratamento

2x sacarose/dia 77

Figura 8: Aspecto histológico do esmalte dental submetido ao tratamento

4x sacarose/dia 78

Figura 9: Aspecto histológico do esmalte dental submetido ao tratamento

8x sacarose/dia 79

Figura 10: Médias das médias de dureza nas distâncias de 10, 20, 30, 50, 70

e 90 μm 82

Figura 11: Área total de mineral em função dos tratamentos 84

1.2. TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela I: Média e desvio padrão da média da contagem de <i>Streptococcus</i> do “grupo mutans” na placa, para os quatro tratamentos | 73 |
| Tabela II: Médias e desvio-padrões das médias de dureza de 10, 20, 30, 50, 70 e 90 μm | 80 |
| Tabela III: Médias e desvios padrões das médias de dureza total do esmalte | 83 |
| Tabela IV: Médias e desvio padrão da concentração de flúor na água durante as quatro etapas do experimento | 85 |

RESUMO

2. RESUMO

As relações quantitativas entre frequência do consumo de sacarose, cárie dental e contagem de *Streptococos* do “grupo mutans” não estão bem estabelecidos. Assim, foi realizado um estudo *in situ* utilizando-se um delineamento experimental do tipo cruzado (4x4) em 04 etapas de 28 dias. Doze voluntários usando dispositivos intra-orais palatinos, contendo 04 blocos de esmalte dental humano (3x3 mm), participaram desta pesquisa. Os voluntários gotejaram sobre os blocos dentais solução de sacarose a 20% na frequência de 0 (zero) a 8x/dia. Os blocos dentais estavam protegidos por uma tela plástica e os voluntários utilizaram para sua higiene bucal dentífrico não fluoretado, mas a água consumida pelos mesmos era fluoretada (0.70 ppm). Após cada etapa a placa dental formada sobre os blocos foi coletada, pesada, homogeneizada e analisada em termos de contagem de *Streptococos* do “grupo mutans” (UFC/mg) usando meio seletivo SB20. Os blocos dentais limpos, embutidos, seccionados e polidos para a determinação da dureza Knoop (KHN) do esmalte. Foram feitas indentações a 10 μ m de superfície utilizando microdurômetro SHIMADZU HM 2000 e carga de 25 g por 30 segundos. Os resultados microbiológicos observados em termos de média \pm desvio padrão da média de UFC/mg foram respectivamente em relação a exposição a sacarose de 0 (zero), 2, 4, 8x/dia: $26,72 \pm 13,36A$; $46,72 \pm 30,81A$; $102,44 \pm 53,34A$ e $52,18 \pm 21,48A$, sendo que médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente a nível de 5%. Quanto a dureza do esmalte diferenças significativas ($p < 0,05$) com relação a área total só foram observadas quando a exposição a sacarose 8x/dia, resultado este semelhante quando se analisa a cada distância da superfície dental. Conclui-se que perdas de mineral só foram significativas quando da exposição a sacarose 8x/dia, não havendo entretanto relação com a contagem de *Streptococos* do “grupo mutans”.

Palavras-chave: - Sacarose
- Cáries dentárias
- Placas dentárias

INTRODUÇÃO

3. INTRODUÇÃO

A cárie dental é um tipo especial de doença infecciosa bacteriana cuja expressão clínica - perdas minerais localizadas depende do rompimento do equilíbrio dinâmico entre os tecidos mineralizados e demais componentes do ecossistema bucal.

Segundo o diagrama clássico de KEYS e JORDAN⁵³ (1963) mostra, a tríade indispensável para a atividade cariosa que consiste da microbiota (placa dental), a dieta (carboidratos) e o hospedeiro e dentes (suscetíveis). Essa tríade fatorial identifica a microbiota bacteriana da placa dental como o determinante mais óbvio da virulência (cariogenicidade). Muitas evidências mostram a inquestionável implicação dos Estreptococos do “grupo mutans” como o primordial agente de cárie de superfícies dentais lisas, em animais experimentais e em humanos (CARLSSON et al.¹⁷, 1985; LOESCHE⁶⁴, 1986; BEIGHTON et al., 1985² e 1987³), embora se reconheça não ser o único microrganismo envolvido no processo (LOESCHE et al.⁶⁷, 1984; BOYAR e BOWDEN⁸, 1985). Os Estreptococos do “grupo mutans” são ativados por dietas ricas em carboidratos em especial a sacarose. O papel do açúcar na etiologia da cárie foi bem evidenciado por estudos em animais e em humanos, e todos enfatizaram a importância do açúcar entre as refeições. Os estudos de MÜHLEMANN⁷⁷, 1970, em Zurich,

utilizando dispositivos protéticos com um eletrodo de pH, onde a placa foi deixada acumular, demonstraram que a ingestão freqüente de carboidratos leva a sucessivas quedas de pH abaixo do nível considerado crítico para o esmalte, isto parece ser, simultaneamente, o mais potente determinante ecológico na transformação de placas básicas (não cariogênicas) em cariogênicas (MARSH⁷², 1989). Isso proporciona aos Estreptococos do “grupo mutans” uma vantagem seletiva sobre a maior parte da microbiota menos tolerante ao ácido, quando o meio da placa é acidificado com freqüência (DENEPTIYA e KLEINBERG²², 1984; LOESCHE⁶⁴, 1986). Além disso apresentam dependência do carboidrato para a colonização bucal. Desde o estabelecimento da ligação entre a síntese de glucano mediada por sacarose e formação de placa por Estreptococos do “grupo mutans” em roedores (KRASSE et al. ⁵⁸, 1967), os estudos sobre o significado do glucano focalizaram primariamente esse efeito sobre a colonização desses microrganismos sobre os dentes. Logo após isso, reconheceu-se também que os glucanos consistuem um componente importante da matriz interbacteriana estrutural da placa (GUGGENHEIN³⁹, 1970) e postulou-se que o glucano insolúvel na placa poderia constituir uma barreira para difusão interna dos ácidos bacterianos formados na placa e, assim, poderia ampliar a acidez e o potencial cariogênico da placa (McNEE et al. ⁶⁸, 1982).

Quando se discute o papel da dieta no desenvolvimento da cárie é abordado mais a importância da freqüência do consumo de carboidratos. A

literatura pouco tem relatado sobre estudos *in situ* mostrando a importância da frequência do uso da sacarose em relação a formação de cárie e o efeito quantitativo na composição microbiana da placa dental, particularmente estudando *Streptococos* do “grupo mutans”. Portanto, justifica-se o trabalho para elucidar o assunto.

PROPOSIÇÃO

4. PROPOSIÇÃO

Estudar o efeito da frequência de exposição à sacarose na formação de cárie e a relação com a contagem de Estreptococos do “grupo mutans” na placa dental, formada em esmalte dental humano *in situ*.

**REVISÃO da
LITERATURA**

5. REVISÃO DA LITERATURA

Qualquer teoria sobre a etiologia da cárie dental precisa apoiar-se na achado clássico de **STEPHAN⁸⁸, (1944)**, referente à resposta do pH da placa dental à breve exposição ao açúcar. Stephan mostrou que essa resposta *in vivo* tem um perfil típico que consiste de diminuição rápida do pH à partir do nível inicial de "repouso" para o mínimo e retorno mais lento do pH para o nível inicial. Ele demonstrou também que a variação do pH em que esse perfil está localizado fica cada vez mais baixa conforme a atividade cariiosa aumenta. Com o passar dos anos tornou-se claro que os fatores do hospedeiro, como saliva, podem ter um efeito importante sobre o perfil do pH da placa em humanos (**JENKINS⁴⁸, 1979**). Similarmente, a resposta do pH da placa humana *in vitro* a partir de fontes distintas de açúcar mostra ampla variação na velocidade da diminuição do pH e o pH mínimo é atingido.

JAY⁴⁷, 1947 mostrou que aumentando-se o consumo de carboidratos fermentáveis ocorria um aumento na população de *Lactobacillus*, leveduras e *S. mutans*, enquanto que a diminuição na ingestão de carboidratos ou ingestão através do uso de sonda tinham um efeito oposto.

Os resultados dos estudos de Vipeholm (**GUSTAFSON et al.**⁴⁰, 1954) e evidências experimentais em animais (**KÖNIG**⁵⁷, 1969) enfatizaram a importância da frequência do consumo de carboidratos fermentáveis na indução da cárie.

McDOUGALL⁶⁷ em 1964, mostrou a primeira evidência direta da ocorrência de polissacarídeos na placa dental. Extratos de amostra de placa dental precipitados com etanol 70% foram hidrolisados e análises revelaram que frutose era o único componente. O autor conclui sobre essa base que o polissacarídeo era um levano que correspondia de 0,3-2,9% do total do peso de 25 amostras individuais.

CARLSSON & EGELBERG¹⁴, 1965, demonstraram que indivíduos recebendo uma dieta básica livre de carboidratos ou suplementada com glucose ou frutose a cada 30 minutos durante o dia por 4 dias, desenvolveram uma quantidade similar de placa. Quando a mesma dieta básica foi suplementada com sacarose a cada 30 minutos, houve um aumento no volume da placa.

CRITCHLEY et al.¹⁹, 1967 realizaram um estudo onde amostras extraídas de placas com água fria e subsequente com hidróxido de sódio 0,5N. A hidrólise ácida e cromatografia de papel do extrato dialisado com água

fria, mostrou glucose e frutose como principais componentes, ao passo que glucose foi o principal constituinte no material hidrolisado extraído com álcali. O procedimento de extração foi repartido após uma incubação *in vitro* da amostra de placas em sacarose, o material solúvel em água encontrado foi uma mistura de frutano e glucano enquanto que a fração solúvel em álcali encontrou-se um glucano que foi precipitado em etanol 45%. Uma degradação Smith modificada foi realizada para estabelecer os tipos de ligações destes polissacarídeos, e os principais tipos de ligações glicosídicas encontradas foram hexapiranosídeo 1-6 e/ou 1-2 e ceto furanosídeo 2-6. Sendo portanto concluído que os polissacarídeos na placa eram dextranos e levanos. Entre os produtos da reação foram somente identificados qualitativamente por cromatografia de papel. O dextrano foi o principal polissacarídeo encontrado na matriz da placa, enquanto que o levano correspondeu apenas 1 a 2% do total do peso seco. A minúscula quantidade de polissacarídeos extracelulares da placa dental não é suficiente para extensivas análises químicas, além do mais estas substâncias não são homogêneas. Para tornar superadas essas dificuldades, polissacarídeos extracelulares sintetizados *in vitro* por culturas puras de estreptococos orais tem sido estudadas.

LITTLETON et al. ⁶³ (1967) realizaram estudos em macacos os quais eram alimentados por cânulas e demonstraram que a placa formada na ausência de carboidratos dietéticos a longo prazo, perde seu potencial de produzir

queda do pH. Esses estudos documentaram uma redução no número de estreptococos e lactobacilos após alimentação por cânulas, no entanto, a incapacidade de formar níveis significantes de ácido pode ser aplicada principalmente pela alteração nas propriedades metabólicas das bactérias da placa. Também, é possível que o tamponamento ampliado na placa pode ter evitado a diminuição dos valores do pH após exposição ao açúcar.

Desde o estabelecimento da ligação entre a síntese de glicano mediada por sacarose e a formação de placa por estreptococos do grupo mutans em roedores (KRASSE et al. ⁵⁸, 1967), os estudos sobre o significado do glicano focalizaram primariamente esse efeito sobre a colonização desses microrganismos sobre os dentes. Ao avaliar o efeito do glicano na colonização da superfície dental, é preciso considerar separadamente a formação de placa e as proporções de estreptococos do grupo mutans na placa. Em roedores a formação volumosa de placa nas superfícies dentais lisas, necessária para indução de cárie nessas superfícies, é associada especificamente à sacarose como substrato, o mesmo pode ser verdadeiro para as superfícies dentais lisas em humanos (CARLSSON¹³, 1967, CARLSSON e SUNDSTROM¹⁵, 1968).

DE STOPPELLAR, et al. ²⁵, 1970, realizaram um estudo no qual participaram 6 voluntários, os quais durante o período experimental que teve

duração de 17 dias consumiram dietas livres de carboidratos e puderam verificar que houve uma diminuição significativa na contagem de *Streptococcus mutans*, e que simultaneamente a porcentagem de *S. sanguis* aumentou e a porcentagem de produção de polissacarídeo durante este período foi menor. Com a reintrodução de uma dieta normal, constituída por carboidratos com glucose e sacarose houve um retorno em relação às proporções originais de *S. sanguis* e as proporções de *S. mutans* e a produção de polissacarídeos aumentou significativamente. Durante este estudo uma relação inversa entre a contagem de *S. mutans* e *S. sanguis* foi observada.

GUGGENHEIN³⁹ (1970), reconheceu também que os glicanos constituem um componente importante na matriz interbacteriana estrutural da placa.

VON DER FEHR⁹⁷, 1970, realizou um trabalho durante o qual 6 voluntários abstiveram-se dos procedimentos de higiene bucal por 23 dias, onde realizaram os bochechos diários com solução de sacarose a 50% . No final deste período o grupo sacarose apresentou um índice médio de cárie maior e um número maior de lesões precoces que os seis voluntários controle. As contagens médias do índice de placa foram maiores no grupo sacarose enquanto que as contagens do índice gengival foram similares para ambos os grupos.

FOLKE et al.³² (1972), estabeleceram um sistema completo para quantificação e análise da placa dental de voluntários humanos alimentados com dietas bem caracterizadas e nutricionalmente adequadas, contendo altos e baixos níveis de sacarose. O nível de sacarose da dieta não alterou significativamente a quantidade de placa produzida, porém uma dieta rica em sacarose aumentou a população de *S. mutans* da placa. O aumento nas atividades de dextrano e levano hidrolases pode refletir um aumento no conteúdo de polissacarídeos. Alguns polissacarídeos de placa, dextrano e levano solúveis podem servir como uma fonte de reserva de carboidrato para microrganismos da placa, resultando em períodos extensos de crescimento e produção de ácido.

FRY & GRENBY³³, 1972 com a finalidade de estudar os efeitos da redução da ingestão de sacarose sobre a formação e composição da placa dental, efetuaram um estudo no qual a sacarose foi omitida da dieta de um grupo de 19 homens por um período de 14 semanas, e substituída por xarope de glicose e ciclamato de cálcio. A placa dental foi avaliada quinzenalmente, e amostras foram coletadas para análise. Os voluntários abstiveram-se de qualquer procedimento de higiene bucal por 3 dias antes de cada avaliação. A extensão da placa atingiu um período crítico entre 6-10 semanas, então decaiu, até 14 semanas, declinou a um nível significativamente menor em relação à dieta normal contendo sacarose. Comparando com a dieta normal, a dieta com redução de sacarose produziu placa

contendo significativamente mais carboidrato solúvel, mas não houve diferença nos carboidratos totais insolúveis, ou em "levanos" solúveis.

GIBBONS & VAN HOUTE³⁷, 1973 em seus estudos relataram sobre a formação de placa dental e citam que provavelmente o melhor exemplo de adesão interbacteriana mediada por polímeros bacterianos diz respeito aos *S. mutans*. Existem dados que indicam que o único potencial do *S. mutans* está associado com sua habilidade para formar placa dental, e que isto é dependente da síntese de polissacarídeo extracelular a partir da sacarose. O *S. mutans* forma depósitos microbianos aderentes na presença de sacarose, e isto forma uma extensa placa bacteriana em animais alimentados com uma dieta contendo esse substrato.

IKEDA et al.⁴⁵ (1973) mostraram a relação entre *S. mutans* e *Lactobacillus* no desenvolvimento de cáries no estudo longitudinal em crianças negras de 7 a 9 anos. As cáries não se desenvolveram em lugares que *S. mutans* não foi detectado, e o início da cárie tendia a ser em locais onde previamente existiam *Lactobacillus* e *S. mutans*. As cáries ocorreram com freqüência na ausência de *Lactobacillus*, mas não na ausência de *S. mutans*.

HUXLEY⁴⁴, 1974, realizou um estudo com ratos, cujo objetivo foi determinar o efeito de diferentes carboidratos na implantação (colonização) de *S.*

mutans na placa. Os resultados mostraram que a glicose serviu como substrato para a implantação de *S. mutans* na placa, mas não tão pronto quanto a sacarose. A placa foi significativamente maior entre ratos alimentados com sacarose.

VAN DER HOEVEN et al.⁹¹, 1974, verificaram que as massas celulares de estreptococos do grupo “mutans” com alto conteúdo de glicano apresentavam baixa densidade celular e células bastante separadas; esse espaçamento celular mediado por glicanos ocorreu *in vivo* na placa de ratos, assim como na de humanos (**CARLSSON & SUNDSTROM**¹⁵, 1968).

KEENE & SHKLAIR⁵¹, 1974, estudaram a relação entre *S. mutans* e desenvolvimento de cáries em 21 homens livres de cáries. Após um ano foi verificado que 10 dos 17 portadores de *S. mutans* desenvolveram cáries; nenhum dos não portadores desenvolveu lesão de cárie.

MANDEL⁷¹, 1974, estudou a relação da saliva e placa à cárie dental, e observou que a quantidade de matriz intercelular na placa é extremamente variável e amplamente dependente da dieta. A placa é formada mesmo em indivíduos alimentados por sonda, mas é fina e produz relativamente pouco ácido. Quando a ingestão de sacarose é alta, a placa cresce rapidamente devido a formação de uma quantidade substancial de dextrano. Quando a ingestão é um pouco mais

moderada, 115g/dia, a quantidade de placa não é significativamente elevada embora, dextrano e levano estejam aumentados. Quando a glucose é o maior açúcar da dieta, a matriz intercelular consiste de um hetero-polissacarídeo composto de glucose, galactose, hexosamina e pequenas quantidades de outros açúcares.

GIBBONS et al.³⁸, 1974, determinaram a relação da experiência de cárie com o número de superfícies dentais infectadas pelo grupo mutans. Selecionaram 38 adolescentes de 13 a 14 anos de idade sendo 18 da cidade de Charlotte-NC, com um CPOS médio $1,4 \pm 0,4$ e 20 indivíduos de Danvers - Mass., com um CPOS médio de $7,6 \pm 1,0$. Colheram amostras de placa dental de nove superfícies sadias de cada adolescente, empregando os valores 1 e 2 para amostras de superfície vestibular do primeiro molar permanente superior e inferior, respectivamente. As amostras 3,4 e 5 das áreas interproximais entre os segundos e os primeiros molares permanentes, entre os primeiros molares e os segundos premolares, entre os segundos e os primeiros premolares superiores e inferiores, respectivamente; as amostras de 6 a 9 foram obtidas das superfícies oclusais de um dos dois primeiros molares inferiores e superiores. O número de superfícies dentais colonizadas com níveis do grupo mutans foi menor no grupo de 18 indivíduos de Charlotte, com baixa experiência de cárie (28/144 ou 19,4%) do que nos 20 indivíduos de Danvers, com alta freqüência de cáries (91/160 ou 56,9%). Isso

demonstra que o número de superfícies dentais infectadas pelo microrganismo correlaciona-se positivamente com a experiência de cárie dessas populações.

DENNIS et al.²⁴, 1975, realizaram um estudo no qual demonstraram variação nos componentes microbianos e bioquímicos de placa de humanos de 4 dias, sendo que 7 voluntários serviram para o mesmo, os quais foram mantidos numa dieta rica em sacarose durante um período de 4 semanas, e abstiveram-se de todos os procedimentos de higiene bucal. A quantidade de peso úmido de placa não mostrou nenhuma tendência definida de mudança para o período de 4 semanas. Entretanto, as contagens de *S. mutans* e *Lactobacillus* mostraram um aumento significativo durante o período de 4 semanas de dieta. Embora valores normalizados da média para ambos *S. mutans* e *S. sanguis*, aumentaram da primeira semana para a terceira semana, os 2 grupos mostraram médias inversas de aumento durante este período, com um maior aumento de *S. sanguis* ocorrendo nas primeira e segunda semanas. Na terceira semana a porcentagem de *S. sanguis* marcadamente diminuiu enquanto a porcentagem de *S. mutans* aumentou rapidamente.

GAWRONSKI et al.³⁵, 1975, realizaram um estudo com o objetivo de avaliar o efeito da sacarose sobre concentração de polissacarídeos extracelulares. Assim, adultos jovens entre 21 e 24 anos de idade foram

examinados para acumulação de placa após 4 dias de abstenção de higiene bucal. A placa foi coletada da superfície lingual e vestibular de 28 dentes. Oito indivíduos que acumularam placa em excesso a 40 mg (peso úmido) e enquanto ingeriram sua dieta normal foram selecionados para o estudo. Esses indivíduos foram então submetidos a uma dieta rica em sacarose (RS) e baixa em sacarose (BS). As dietas definidas foram compostas semelhantes a um regime adequado. Cada período da dieta de 12 dias era separado por uma dieta normal de 16 dias. Ao final de cada período de desenvolvimento 4 e 12 dias a placa foi removida e submetida a análise bioquímica. Os resultados mostraram uma correlação positiva entre dieta rica em sacarose e aumento na síntese de polissacarídeos extracelulares e intracelulares.

STAAT et al.⁸⁷, 1975, realizaram um estudo com o objetivo de avaliar os efeitos dos níveis de sacarose da dieta (rica em sacarose - RS) e baixa em sacarose (BS) na quantidade e composição microbiana de placa dental humana de 4 a 12 dias. Para este estudo 8 estudantes de odontologia participaram. Dietas ricas em sacarose não exerceram efeitos demonstráveis na acumulação total de placa. Enquanto que durante o experimento de 4 dias a porcentagem média de *S. mutans* foi significantivamente maior durante a dieta rica em sacarose, do que durante a dieta com baixa ingestão de sacarose em comparação as porcentagens médias de *S. mutans* foram reduzidas levemente para ambas as dietas (RS e BS). A população

de *S. sanguis* não foi afetada, entretanto nos voluntários individuais, uma relação inversa entre as populações de *S. mutans* e *S. sanguis* foi observada.

LOESCHE et al.⁶⁵, 1975, demonstraram associações entre porcentagens de *S. mutans* presentes em fissuras oclusais e cárie. Em 71% das fissuras em que *S. mutans* foi detectado, a lesão de cárie foi diagnosticada, enquanto que em 70% de fissuras sem cárie, *S. mutans* não estava presente.

DONOGHUE & NEWNAM²⁹, 1976, propuseram que a produção de polissacarídeo extracelular insolúvel pelos *S. mutans* é uma adaptação a altos níveis de sacarose na dieta. Admitiram que os ânions incorporados do polissacarídeo extracelular insolúvel restringem o acesso do ácido extracelular às células bacterianas.

KILIAN et al.⁵⁴, 1976, realizaram um estudo microbiológico das fases iniciais do desenvolvimento de placa em superfícies dentais não retentivas em macacos, os quais por todos os períodos experimentais. foram alimentados com uma dieta através de sonda estomacal. Em adição a esta dieta básica eles receberam um dos três diferentes suplementos pela boca por 9 a 10 dias antes de cada amostragem bacteriológica:

1) Água + sacarose 10% ad libitum

2) caseína 2x ao dia + água ad libitum

3) água ad libitum

Um intervalo da suplementação de sacarose foi sempre alternado entre períodos de suplementação de caseína ou água. Em alguns animais foi inoculado na cavidade bucal *S. mutans*. Amostras de placa foram coletadas e cultivadas em meios seletivos e não seletivos onde isolaram e identificaram as amostras. Os microorganismos numericamente predominantes na placa inicial foram: *S. mutans*, *S. sanguis*, *A. viscosus*. A colonização de *S. mutans* foi dependente da sacarose e ocorreu à custa de *S. sanguis*. Nestes experimentos *S. mutans* foi responsável por 25% a 65% dos formadores primários de placa. Só as outras espécies encontradas colonizaram o dente independentemente da dieta. É postulado que o estabelecimento precoce do *S. mutans* depende de sacarose e que a sacarose desempenha um papel chave no desenvolvimento de uma placa cariogênica.

KLOCK & KRASSE⁵⁵, 1977, estudaram a relação da prevalência de cárie e a presença de *S. mutans* com a frequência de cáries em 655 crianças de 9 a 12 anos. Eles encontraram 80% das crianças com mais de 10^5 UFC (unidade formadora de colônia) de *S. mutans* e 40% com mais de 10^6 UFC de *S. mutans*/ml de saliva. A contagem de *S. mutans* foi correlacionada positivamente com a frequência de cárie.

MICHALEK et al.⁷³, 1977, relataram em seus estudos com ratos gnotobióticos que uma quantidade pequena de sacarose 0,1% na dieta forneceu substrato suficiente para o acúmulo de *S. mutans*. Além disso 1% ou mais de sacarose promoveu acúmulo de placa e cárie significantes, enquanto que dietas contendo 3% de sacarose ou mais produziram uma incidência máxima de cárie.

MINAH & LOESCHE⁷⁴, 1977, em estudo realizado, observaram que existiu uma relação entre o perfil de pH da placa e as proporções de *S. mutans* e *Lactobacillus* na placa. A placa cariogênica metabolizou significativamente mais sacarose do que a placa não cariogênica e conseqüentemente foram encontradas altas contagens de *S. mutans* e *Lactobacillus*.

MIRANDA⁷⁶, 1977, estudou os estreptococos coletados da placa dental das superfícies vestibulares e/ou palatinas do maxilar superior (superfícies lisas e sem cárie); do sulco gengival da mesma arcada e do dorso da língua. Selecionaram 40 indivíduos de ambos os sexos, na faixa etária de 7 a 13 anos de idade, com índice variável de ceo (de 0 a 8) e CPO (de 0 a 15). Das 551 amostras submetidas a várias provas de identificação, o grupo mutans foi detectado em 64 (11,9%), sendo encontrada a espécie *S. mutans* em 58 (10,5%) e *S. sobrinus* observada em 8 (1,4%). O grupo mutans foi detectado em 21 (52,5%) amostras de placa dental; em 13 (32,5%) das amostras do sulco gengival e em 4 (10,0%) das

amostras do dorso da língua. O autor verificou que não houve diferença estatisticamente significativa quanto à frequência, o número e a porcentagem do grupo mutans na placa dental de crianças com CPO alto em relação às crianças com CPO zero.

IKEDA et al.⁴⁵, 1978, realizaram um estudo para determinar a virulência dos *S. mutans* comparando o efeito de uma preparação de açúcares livre de sacarose, servindo como substrato para o desenvolvimento e produção de ácido pelos *S. mutans*. Entretanto este preparo de açúcar foi um pobre substrato para a agregação celular, atividade de glicosiltransferase, formação de placa, e aderência de células nas superfícies de vidro. A substituição da sacarose pela combinação de açúcares livre da mesma na dieta de ratos reduziu significativamente os níveis de cárie. Além disso, ratos alimentados com dieta contendo sacarose e a combinação de açúcares apresentaram significativamente menos lesões cariosas do que os ratos alimentados com dietas contendo somente sacarose.

JENKINS⁴⁸, 1978, descrevendo a síntese de polissacarídeos pela placa bacteriana cita que quando certas bactérias incluindo várias espécies da placa, recebem sacarose, elas podem sintetizar vários tipos de polissacarídeos ou convertê-la em ácido. Durante a década de 60 aumentaram as evidências de que estes polissacarídeos eram importantes constituintes da placa e que influenciaram o

processo de cárie. Isto levou a uma grande atividade de pesquisa em relação a métodos de prevenir acumulação na expectativa que isto poderia reduzir cáries. Este autor diz ainda que são três, os principais grupos de polissacarídeos que podem ser formados: (1) Polímeros da glucose (com o nome geral de glucanos) formados como uma massa gelatinosa extracelular, principalmente da sacarose, por uma enzima conhecida como dextranosacarase (glicosiltransferase) sobre superfícies da bactéria. As enzimas utilizam a energia da ligação entre frutose e glucose para sintetizar uma mistura de polímeros, (glucanos, com maioria das ligações na posição α 1 \rightarrow 6 de alto peso molecular, e simultaneamente liberar frutose.



A formação de dextrano pode ser prontamente vista pela comparação da composição química da placa e sua aparência em microscopia eletrônica na condição de jejum e 6 a 9 segundos após bochecho com uma solução de sacarose 10%. A formação de glucanos evidentemente aumenta o volume da placa e análises mostram que a fração insolúvel de alto peso molecular pode ocupar acima de 10% do peso seco da placa (carboidrato total é aproximadamente 15%). (2) outra enzima (levanosacarase) converte sacarose em levanos - polímeros extracelulares da frutose razoavelmente solúveis com ligações na posição α 2 \rightarrow 6, mas são formados em uma extensão menor que os glucanos. Quando o suprimento

de sacarose é esgotado, levanos são rapidamente metabolizados pelas enzimas da placa. (3) Muitas bactérias orais estocam carboidratos como polissacarídeos intracelular tipo glicogênio. Ao contrário dos polissacarídeos extracelulares, que são formados essencialmente a partir da sacarose, os polissacarídeos intracelulares podem ser formados a partir de uma variedade de açúcares (incluindo glucose, maltose e sacarose) e são metabolizados quando outras fontes de carboidratos estão ausentes, como entre as refeições.

GEDDES et al.³⁶, 1978, observaram que mudanças visuais semelhantes à cáries iniciais ocorreram quando 10 voluntários não escovaram seus dentes por 14 dias e bochecharam uma solução de sacarose 9 x ao dia, enquanto que o grupo controle que não bochechou com sacarose mostrou uma mudança no esmalte significativamente menor. Entretanto a concentração de cálcio e fósforo e peso úmido da placa acumulada durante o período sem higiene bucal pelos 2 grupos não mostrou diferenças significantes. Embora a concentração de carboidratos do grupo sacarose tenha sido significativamente maior.

COYKENDALL & LIZOTTE¹⁸, 1978, colheram material de placa dental de 63 pacientes de 15 a 81 anos de idade para identificar estreptococos do grupo mutans por testes bioquímicos e pelo conteúdo de DNA. Das cepas pertencentes ao grupo mutans, 55 (98,2%) foram identificadas como *S. mutans* e 1

(1,8%) como *S. sobrinus*. Essas cepas foram recuperadas mais frequentemente em dentes cariados (16/23) do que locais livres de cárie (7/23), onde somente *S. mutans* foi detectado. Nas amostras de placa dental, *S. mutans*, foi a cepa mais comumente isolada, determinada tanto por testes bioquímicos quanto testes sorológicos.

HEFTI et al. ⁴³, 1979, realizaram uma investigação na qual foi determinada a relação entre o aumento do consumo de sacarose na dieta e a incidência de cáries de fissuras em ratos Osborne-Mendel. Em um dos grupos destes animais, foram inoculados na cavidade bucal microorganismos cariogênicos *S. mutans* OMZ 61 e *A. viscosus* Nyl, sendo que no grupo controle não foram inoculados microorganismos cariogênicos. Concluíram que houve uma alta incidência de cárie nos animais inoculados, comparados ao grupo controle. Mostrou-se assim que uma dieta rica em sacarose exerceu uma influência muito grande na incidência de cáries nos ratos superinfectados.

VAN HOUTE⁹², 1980 e **LOESCHE**⁶⁴, 1986, sugerem que a cariogenicidade da placa humana são determinadas fundamentalmente por sua composição microbiana e que nem todas as placas possuem capacidade suficiente de diminuição do pH para a indução de cárie. Conseqüentemente, uma mudança na composição da microbiota da placa é pré-requisito para alterar a capacidade de

diminuição do pH da placa. A tolerância ácida da microbiota bacteriana funciona, nesse aspecto, como um determinante de ácido em valores de pH ácido na placa é uma função direta da tolerância ácida bacteriana; o pH mais baixo que pode ser atingido na placa é, portanto, uma função dos microrganismos acidogênicos com a maior tolerância ácida. Do ponto de vista mecânico o processo carioso pode ser formulado como uma doença infecciosa bacteriana modificada por carboidratos da dieta. O consumo contínuo de carboidratos causa uma reação em cadeia que envolve acidificação mais freqüente da placa e, por sua vez, uma mudança na direção de proporções mais elevadas de microrganismos mais tolerantes ao ácido, este último evento, por sua vez, causa aumento na capacidade de produção de ácido da placa em valores de pH ácido e assim, uma diminuição do pH mínimo potencial, isso, a seu lado, com o tempo aumenta a probabilidade de perda do mineral do dente. Esse processo pode aumentar progressivamente, nivelar-se ou reverter-se, dependendo do nível de consumo de carboidrato. No momento, os únicos microrganismos da placa que parecem adequar-se ao cenário descrito são os estreptococos do grupo mutans e os lactobacilos acidogênicos, altamente tolerantes do ácido que apresentam, igualmente, uma dependência do carboidrato dietético para colonização bucal, assim como uma correlação positiva com atividade cariiosa.

BORDEN et al. ⁷, 1980, realizaram um estudo no qual 4 voluntários adultos utilizaram dispositivos intra-orais, nos quais foram inseridos blocos de esmalte bovino cobertos com “gaze” Dacron para facilitar a retenção de bactérias, sendo que num grupo de voluntários foram inoculados amostras de *S. mutans* resistente à estreptomicina, e noutro grupo (controle), não foi inoculado amostras desta bactéria. Os voluntários foram instruídos a manter uma dieta normal e procedimentos de higiene bucal, sem utilizarem dentífrício fluoretado. Previamente antes da utilização dos dispositivos amostras de placas proximais foram coletadas, diluídas e inoculadas em meio mitis salivarius e estas amostras bacterianas de *S. mutans* foram testadas frente a diferentes concentrações de estreptomicina sendo que as resistentes foram selecionadas. Os dispositivos foram utilizados durante 7 dias diuturnamente e durante este período os mesmos eram imersos por 10 minutos, 4x ao dia em solução de sacarose 3%. Após este período *S. mutans* representavam 58% do total de estreptococos na placa inoculada, comparando a aproximadamente 1% para a placa controle não inoculada. Inoculando-se na placa do dispositivos *S. mutans* R (resistente) não houve aumento no desenvolvimento de lesões no período de 7 dias, embora os números totais de *S. mutans* inoculado foi 350 x maior do que no bloco controle. Houve uma proporção significativamente menor de *S. salivarius* na placa inoculada. Comparada ao controle devido primariamente ao grande número de *S. mutans*. Deste modo parece que a mera presença de maior números de *S. mutans* não resultou em maior número

de lesões de cáries, sendo que vários fatores poderiam explicar estas observações. A formação de placa nos blocos dentais foi dependente da adesão ou arranjo de microrganismos na "gaze" Dracon, mais que a própria habilidade de adesão ao esmalte. Isto explica a proporção aumentada de *S. salivarius* na placa no dispositivo comparada com a placa natural. Inoculando-se *S. mutans* sobre os blocos, houve uma quantidade maior de microrganismos mais do que permitia as condições naturais de selecionar tal aumento. Embora uma combinação total maior de vários microrganismos potencialmente acidogênicos (*S. mutans*, *S. sanguis*, *S. salivarius*) foi encontrada na placa inoculada, quando comparada com o controle, nenhum aumento de cáries nos blocos de esmalte foi notado. Então, uma abundância de microrganismos acidogênicos não assegura o desenvolvimento de cárie. Aparentemente fatores individuais relacionados ao hospedeiro desempenham um papel altamente significativo na determinação do desenvolvimento ou não de lesões tipo cárie.

DENEPITIYA et. al. ²³, em 1980, relataram a presença de baixo número de *S. mutans* dentre os estreptococos orais, presentes na placa dental da população de Srilanka (Ceilão), onde a atividade de cáries é baixa e a ingestão de sacarose é baixa também, combinada com a presença de grande acúmulo de placa. Amostras de placa de idade desconhecidas foram coletadas dos voluntários moradores na fazenda de plantação de chá, e 10 amostras foram coletadas de

estudantes de Odontologia 19 dias após a interrupção de higiene bucal. Desta maneira 670 amostras de estreptococos orais foram estudadas quanto ao aspecto morfológico, colonial em meio mitis salivarius ágar. Entretanto, quando foram submetidos a testes fisiológicos, 14 amostras foram classificadas como sendo *S. mutans*. Este estudo mostrou que *S. mutans* está presente na placa dental humana desta população, entretanto, em proporções pequenas, e isto pode ser atribuído à baixa ingestão de sacarose.

BRECK et al. ⁹, 1981, concluíram que estudos dos efeitos da composição da dieta sobre a formação da placa humana dental tem principalmente sido relacionados à carboidratos. Grande variação individual tem sido observada na formação e volume da placa como consequência de diferentes regimes com carboidratos. Afirmaram ainda que, em estudos recentes e culturas, foi observado que bochechos freqüentes com soluções concentradas de glucose ou sacarose aumentaram o número de bactérias desenvolvidas sobre filmes plásticos às superfícies dentais durante períodos de alta concentração de carboidratos na cavidade bucal. Polissacarídeos extracelular sintetizados pelos microrganismos da placa a partir da sacarose podem ser importantes em 2 aspectos, a saber, como reserva de energia e como constituintes da matriz da placa. Estes polissacarídeos extracelulares compreendem dextranos, mutanos e levanos, os quais são sintetizados pelas bactérias à partir da sacarose. Polissacarídeos intracelulares são

produzidos como grânulos de reserva para muitas espécies bacterianas a partir de vários carboidratos tais como glucose, frutose e sacarose não tem influência sobre a morfologia ou quantidade de placa no estágio inicial de aderência bacteriana. Porém, citam que, pesquisas com relação aos possíveis efeitos dos carboidratos sobre os estágios avançados da formação da placa, parecem fundamentadas.

SKINNER et al.⁸⁵, 1982, realizaram um estudo cruzado duplamente cego envolvendo dietas ricas em sacarose e maltose na qual amostras de 2 dias de placa de 24 indivíduos, foram colhidas antes e durante 2 períodos de 25 dias. Os resultados mostraram que a concentração de polissacarídeos extracelulares na placa foi menor no grupo maltose em relação ao grupo sacarose ($p= 0,052$).

SREEBNY⁸⁶, 1982, conclui que não há dúvidas que tanto a quantidade quanto a frequência de açúcar ingerido contribuem para a formação de cárie dental. As correlações são muito claras entre risco de cárie e frequência do consumo de açúcar, especialmente entre refeições.

BURT et al.¹¹, 1983, analisaram a placa dental de 279 crianças de 6 a 7 anos de idade, efetuando cinco colheitas durante o período de 2 anos. Avaliaram 238 amostras de placa de fissuras oclusais e 238 primeiros molares permanentes inferiores esquerdos e 235 primeiros molares inferiores direitos. Os autores

observaram que somente 21 (4,4%) dentes permaneceram não infectados pelo grupo mutans, embora 119 (50,0%) do hemiarco esquerdo e 105 (44,7%) do hemiarco direito abrigassem níveis detectáveis do microrganismo. Verificou-se que os níveis da infecção inicialmente alto tendem a permanecer alto e vice-versa, porém os níveis elevados de infecção estavam associados ao subsequente desenvolvimento da cárie.

RUGG-GUNN⁸², 1983, fez uma revisão de vários estudos clássicos citados na literatura relacionando o papel do açúcar na etiologia da cárie dental; apontando estudos clínicos. Este estudo serviu para comprovar que alguns açúcares são mais cariogênicos que outros. A sacarose apresenta-se como o açúcar mais cariogênico embora uma dieta contendo ambos glicose e frutose podem ser de comparável cariogenicidade. E que a frequência de ingestão de açúcares parece ser mais importante que a quantidade de açúcar consumido.

SCHEIE et al. ⁸³, 1984, realizaram um estudo clínico envolvendo 4 voluntários (1 do sexo feminino e 3 do sexo masculino) durante um período de 3 semanas, constituído por baixa ingestão de sacarose (BS), seguido por um período de dieta normal durante 1 semana de intervalo, finalmente seguido por um período de alta ingestão de sacarose (3 semanas). Os voluntários foram instruídos a não escovarem a superfície bucal dos dentes da parte inferior do quadrante direito

durante o período teste, sendo que o restante da denteição recebeu escovação normal sem a utilização de dentifícios fluoretado. Durante o período de baixo consumo de sacarose, os voluntários foram instruídos a não ingerirem açúcar, sendo que durante o período de alta ingestão de sacarose, os voluntários ingeriram dietas regulares contendo açúcares, em adição 1 ml se solução de sacarose era aplicada na superfície teste 8x ao dia. Ao final de cada fase do experimento amostras de placa foram coletadas e submetidas a análise microbiológica, constatando-se que a prevalência de *S. mutans* não foi afetada por essa modificação da dieta a curto prazo, mas demonstraram que 3 semanas de suplementação dietética com altos níveis de sacarose aumentou a capacidade de diminuição do pH da placa, em comparação com a dieta com ingestão baixa de sacarose.

BRUDEVOLD et al.¹⁰, 1984, realizaram um estudo com o modelo de desmineralização intrabucal do esmalte, no qual os indivíduos usaram um aparelho palatino com blocos de esmalte bovino que foram revestidos por massas celulares de estreptococos do grupo mutans; um maior volume de matriz rica em glucano foi associado à diminuição prolongada do pH da massa celular e à maior desmineralização do esmalte após bochechos com solução de glucose ou sacarose 10% (**ZERO et al.¹⁰¹, 1986**).

KEENE et al.⁵¹, 1984, examinaram 47 estudantes do primeiro ano do curso para formação de Higienista Dental, com relação ao estado da cárie dental e à presença do grupo mutans. Observou-se correlação moderadamente forte entre os níveis de *S. mutans* saliva e placa dental, o que indica que cada um dos dois métodos de amostragem são igualmente válidos para estimar a magnitude da infecção. Quando a relação entre os níveis salivares de *S. mutans* e a experiência de cárie (CPOS) foram examinados, os resultados foram essencialmente os mesmos que os obtidos com a placa dental por meio do nível de *S. mutans* em superfície de placa interproximal, porém o coeficiente de correlação foi significativamente menor.

MINAH et al.⁷⁵, 1985, estudaram alterações na população microbiana relacionadas à sacarose, foram verificadas em 6 sítios orais em 32 voluntários, os quais consumiram dieta rica em sacarose por 21 dias, seguido para uma dieta baixa em sacarose por mais de 21 dias. Culturas bacteriológicas à partir das placas foram realizadas nos dias 0, 12^o, 21^o, 33^o e 42^o dias do experimento de 6 semanas. A sacarose favorece a colonização de *S. mutans* no esmalte e na superfície dental lisa (**HAMADA & SLADE**⁴¹, 1980). Outra propriedade cariogênica da sacarose é seu potencial em favorecer a substituição da população microbiana relacionada à placa dental não cariogênica, resultando em placas com potencial cariogênico. Embora

carboidratos da dieta que não a sacarose foram consumidos pelos voluntários, um efeito ecológico direto sobre a microbiota foi observado.

RÖLLA et al.⁸⁰, 1985, relataram em seus estudos que a sacarose é conhecida por possuir um maior potencial para induzir cáries do que a glucose e a frutose, apesar do fato dos monossacarídeos causarem uma alta ou maior produção de ácido *in vitro* pelos microrganismos da placa dental. É suposto que a cariogenicidade da sacarose é principalmente associada com a alta energia de sua hidrólise, a qual pode ser utilizada pela bactéria para síntese de glucanos insolúveis. Os polissacarídeos produzidos *in vivo* na presença da sacarose resultam em um grande acúmulo de placa, um fenômeno que por si só pode causar aumento da cariogenicidade.

A espessura, as características de difusão e a atividade metabólica da placa determinam grandemente qual a quantidade de substrato de carboidrato que atinge a camada mais interna da placa adjacente ao dente. Esse meio muda com frequência e rapidez, principalmente devido à flutuação na disponibilidade de carboidrato e aos hábitos dietéticos do hospedeiro. **DAWES & DIBDIN**²¹ (1986), utilizaram um modelo matemático para simular as inter-relações da concentração de sacarose na saliva, espessura da placa e alterações no pH da superfície de esmalte.

ZERO et al.¹⁰⁰, 1986, realizaram um estudo à fim de esclarecer o potencial do glucano sintetizado por *S. mutans* à partir da sacarose com potencial de desmineralização ampliado da placa. Neste estudo foi utilizado teste intra-oral de desmineralização do esmalte. Amostras de placa artificial foram preparadas pelo cultivo de *S. mutans* em meio enriquecido de Todd- Hewitt broth (THB), suplementado com várias concentrações de sacarose, associada com polissacarídeo extracelular pré-formado. Os *S. mutans* poderiam estar apresentando outros efeitos, isto é, além de estarem alterando as propriedades de difusão da placa a mesma formada na presença de sacarose produz uma maior quantidade de ácido lipoteicóico (ALT) que forma complexos com glucano (RÖLLA et al.⁸¹, 1980). A carga fortemente negativa do complexo ALT/glucano poderiam formar quelato com íons cálcio e desta maneira favorecer a perda de cálcio da superfície do esmalte. Outra possibilidade é que o polissacarídeo extracelular em altos níveis poderiam interferir na adsorção de glicoproteínas salivares, que têm um alta afinidade por superfícies de esmalte dental, onde observaram através de biópsia realizada. A exposição de blocos de esmalte polidos à saliva mostraram um rápido decréscimo na permeabilidade do iodo. Desta maneira constataram que polissacarídeo extracelular interferiam com o processo de reparo. Testes com outras amostras de estreptococos comprovaram as observações obtidas com amostras de *S. mutans* que a presença de polissacarídeo extracelular promoveu a

desmineralização do esmalte, embora o efeito fosse menos pronunciado. Esse achado mostra o potencial bem estabelecido do *S. mutans*, pois são mais cariogênicos que outras amostras de estreptococos.

BENDER et al.⁴, 1986, descreveram que o determinante ecológico primordial para o *S. mutans*, no estabelecimento de um nicho na placa cariogênica é a capacidade de manter-se num pH baixo. Além disso, embora a sobrevivência em pH baixo seja um determinante crítico, a capacidade de metabolizar ativamente em condições ácidas, pode contribuir para o aumento de uma espécie com membro de microbiota cariogênica, assim como para a capacidade de uma espécie contribuir para o aparecimento de lesões cariosas. Os microrganismos que podem crescer em pH baixo têm oportunidade de competir com espécies cujo metabolismo é detido para acidificação. Ainda, a continuação do metabolismo em pH baixo perpetua o meio ácido com as conseqüências de selecionar as bactérias acidúricas e de afetar mais desmineralização do esmalte do dente.

KURAMITSU⁶⁰, 1987, cita que além de manter-se num pH baixo também está claro que o potencial patogênico dos *S. mutans* é de natureza multifatorial.

KLOCK & KRASSE⁵⁵, 1987, estudaram se a alteração de hábitos na dieta e melhoria da higiene bucal reduziriam os níveis de infecção por *S. mutans* somente por um tempo limitado. Mudanças nos hábitos dietéticos, especialmente a diminuição do açúcar ingerido, tem maior efeito no número de microrganismos cariogênicos do que os procedimentos de higiene bucal.

KRISTOFFERSSON & BIRKHED⁵⁹, 1987, realizaram um estudo no qual 20 estudantes de 17 anos de idade foram selecionados, pois apresentavam altas contagens de *S. mutans* na saliva ($> 10^6$ UFC/ml) e consumiam açúcares com alta frequência entre as refeições. Após a determinação dos números de *S. mutans* e *Lactobacillus* na saliva e placa interproximal, os voluntários foram questionados quanto às suas preferências por produtos contendo açúcares, usados entre as refeições, estas foram: balas, chicletes, refrigerantes, confeitos e comiam no máximo 4-5 refeições/dia. Após 6 semanas de restrição de açúcar, os participantes retornaram aos seus hábitos alimentares e foram acompanhados por mais 6 semanas. Sete voluntários também com altas contagens de *S. mutans* na saliva e que ingeriam açúcar com frequência serviram como grupo controle. Os resultados mostraram um decréscimo estatisticamente significativo nas contagens médias de *S. mutans* na saliva, que foi de $1,5 \times 10^6$ para $0,3 \times 10^6$ UFC/ml ($p < 0,001$) durante o período de restrição de açúcar. Os números médios de *Lactobacillus* na saliva decresceram de $2,3 \times 10^4$ para $0,2 \times 10^4$ UFC/ml ($p < 0,001$). Analisando amostras

de placas interproximais houve uma redução significativa de 52% para 32% ($p < 0,001$). Quando os voluntários retornaram aos seus hábitos alimentares, as contagens de *S. mutans* e *Lactobacillus* alcançaram os níveis iniciais de contagens. Concluíram então, que um período de 6 semanas com restrição de açúcar reduziu os números de *S. mutans*, na saliva e nas placas interproximais. E também houve decréscimo na contagem de *Lactobacillus* na saliva.

EMILSON et al.³⁰, 1988, realizaram um estudo no qual amostras de *S. mutans* e *S. sobrinus* isoladas de populações quase livres de cárie foram examinadas em hamsters mantidos com uma dieta rica em sacarose. As amostras foram prontamente implantadas e persistiram em altos números durante o período experimental. Todas as amostras testes, induziram cáries, com números ou contagens de lesões de cárie igualmente maiores do aquelas de uma amostra de referência de *S. mutans*. Os resultados indicaram que as amostras tinham propriedades cariogênicas inerentes, as quais são reveladas quando ocorre exposição freqüente a altas concentrações de sacarose na dieta. Os *S. mutans* isolados de populações com prevalência de cáries extremamente baixa, tiveram o potencial de induzir cárie dental em hamsters alimentados com freqüência com uma dieta contendo alta concentração de sacarose.

SGAN-COHEN et al.⁸⁴, 1988, em estudo realizado verificaram que uma dieta rica em açúcar aplicada por 48 horas ampliou muito o potencial de diminuição do pH da placa comparada à dieta pobre em açúcar. Essas mudanças rápidas no potencial acidogênico da placa não podem ser explicadas apenas pelas alterações na sua composição.

AZEVEDO¹, 1988, empregando o meio SB20 para detectar o grupo mutans em 108 indivíduos, constatou que a espécie predominante, *S. mutans* - biotipo I, foi isolada como cultura positiva em todos os casos, e, como espécie única de 24,07%. Seguiu-se o *S. rattus* - biotipo II, como espécie única em 3,7%, o *S. cricetus* - biotipo III, como espécie única em 0,93%. A espécie *S. sobrinus* - biotipo IV não foi isolada de nenhum indivíduo como cultura pura.

CARLSSON¹⁶, 1989, relatou que a ingestão freqüente de produtos com altas concentrações de açúcar aumenta a atividade cárie e que o efeito do açúcar foi explicado no estudo de Vipeholm pelo aumento da produção de ácido pelas bactérias. Comparadas com outras bactérias os *Lactobacillus* e *S. mutans* são as que têm enzimas resistentes aos ácidos.

CARLSSON¹², 1989, concluiu que as diferenças na dieta entre grupos populacionais podem não ser suficientes para efetuar contagens de *Lactobacillus* e

de *S. mutans*, mas suficientes para mostrar diferenças na prevalência de cáries. É clara a correlação entre microrganismos cariogênicos e cárie dental em populações com hábitos dietéticos cariogênicos. Os resultados sugerem que não há uma relação simples entre a quantidade de açúcar avaliada e a colonização por *S. mutans*.

NEWBRUM⁷⁸, 1989, relatou que as conclusões prévias concernentes ao desempenho da sacarose na etiologia da cárie são baseadas em razões epidemiológicas, bem como em estudos controlados em humanos e animais. Outros estudos em animais, não compararam os itens dietéticos humanos comuns, e sim compararam a cariogenicidade de diferentes carboidratos amido, sacarose, maltose, lactose, frutose e glicose, geralmente adicionados à dieta em forma de pó. Sob tais condições, a sacarose mais do que qualquer outro carboidrato, invariavelmente induz mais a lesão do tipo de superfície lisa. O papel chave da sacarose como substrato dietético no processo de cárie de superfície lisa pode ser explicado no campo da bioquímica. Cárie de superfície lisa depende do crescimento da placa dental. Várias investigações independentes demonstraram claramente a presença de polissacarídeos extracelulares, tanto os glucanos quanto os levanos da placa. Os glucanos particularmente a fração insolúvel em água, podem servir como componentes estruturais da matriz da placa, com efeito "colante" de certas bactérias ao dente entre si. Os levanos solúveis e alguns dos

glucanos solúveis são degradáveis pela microbiota da placa e podem funcionar como reservas transitórias de carboidratos fermentáveis, prolongando, dessa forma, a duração da produção de ácidos. Estes polissacarídeos são sintetizados pelas enzimas, as quais na maior parte são extracelulares ou ligados à superfície da célula e mostram uma alta especificidade para a sacarose com um substrato. As enzimas envolvidas nessa síntese, glicosil e frutossil transferase foram isoladas e purificadas do *S. sanguis* e *S. mutans*.

VAN HOUTE et al.⁹⁵, 1989, estudaram *in vitro* os perfis do pH de massas celulares de *S. mutans* determinando com um modelo que permitiu penetração vertical da glicose aplicada periféricamente através da massa celular e da avaliação do pH em diferentes profundidades dentro da massa celular, um maior volume de matriz rica em glicano foi associado a um início anterior e maior velocidade de diminuição do pH na profundidade da massa celular; o suprimento de glicose para as células nas massas com um teor de glucano negligenciável e alta densidade celular em particular, pareceu ser muito reduzido para que um aumento na concentração de glicose ampliasse o início e velocidade da diminuição do pH. A avaliação neste e em outros estudos *in vitro* (DIBDIN & SHELLIS²⁸, 1988) de massas celulares pobres e ricas em glicanos com relação a fatores como difusão, capacidade de tamponamento, fração de volume extracelular e porosidade, sugerem que a diminuição ampliada do pH, associada ao glucano nas massas

celulares, é baseada em dois fatores chave. Primeiro, o espaçamento celular ampliado associado ao glucano causa porosidade maior da massa celular, devido à baixa densidade orgânica do conteúdo da matriz, com relação à das células. Segundo o suprimento de carboidratos para as células nas massas celulares em geral é restrito e permite uma acidogênese em velocidade apenas abaixo da mínima. Contudo, um aumento do volume da matriz por glucanos permite a passagem de quantidade maior de glicose. Isso leva a uma velocidade maior na produção bacteriana de ácido, penetração mais rápida da glicose mais profundamente, na massa celular e diminuição ampliada do pH nas regiões periféricas e profundas da massa celular.

MACPHERSON et al.⁷⁰, 1990, realizaram um estudo *in situ* com duração de 3 semanas, no qual 5 voluntários adultos utilizaram dispositivos intra-orais removíveis, que foram colocados na parte inferior da cavidade bucal, nos quais foram inseridos blocos de esmalte. O estudo seguiu 3 diferentes protocolos:

- 1) Condições normais de formação de placa sobre os blocos (PN) placa normal;
- 2) Aplicação intra-oral de solução de sacarose (10%) sobre os blocos, 9 x ao dia;
- 3) Inoculação de amostras de *S. mutans* nas primeiras 28 horas iniciais do experimento, obtidas à partir da saliva de cada indivíduo, associado a aplicação intra-oral de sacarose 9 x ao dia.

Concluíram através deste estudo que a aplicação intra-oral de solução de sacarose sobre os blocos de esmalte (9 x ao dia durante 3 semanas, associado a ingestão de uma dieta normal pelos voluntários, apresentou pouco efeito qualitativo e quantitativo na composição microbiana da placa. Nenhuma diferença significativa na proporção de *S. mutans* e *Lactobacillus spp* foi encontrada entre as duas diferentes fases isto é, (1) condições normais de formação de placa (Placa Normal) e placa formada na presença de sacarose aplicada 9 x ao dia, mas a inoculação de *S. mutans* durante 28 horas iniciais do período experimental combinado com a aplicação regular de sacarose (3) resultou em um aumento nas proporções de isolamento de ambos microrganismos, e uma diminuição na contagem de *S. sanguis* e *S. oralis*. O resultado mostrou não haver nenhuma diferença nas contagens de *S. mutans* e *Lactobacillus* por unidade de área do esmalte entre Placa Normal e (1) aplicação intra-oral de sacarose (2).

MACPHERSON et al. ⁶⁹, 1990, investigaram através de um estudo, onde voluntários utilizaram dispositivo intra-oral, no qual foi determinado a desmineralização do esmalte dental associado com a composição da microbiota da placa. Dispositivos contendo blocos de esmalte foram colocados na parte inferior da cavidade bucal segundo 3 protocolos:

- 1) condições de placa formada normalmente (Placa Normal);
- 2) aplicação intra-oral de sacarose a 10%;

3) inoculação de amostras de *S. mutans* sobre os blocos, obtidos da saliva dos próprios voluntários + aplicação de sacarose 10% 9 x ao dia.

Após 21 dias, as placas foram coletadas e a composição microbiana da mesma foi determinada utilizando-se diferentes meios de culturas. Um total de 144 sítios dos blocos de esmalte foram estudados e divididos em 4 grupos: (G1, G2, G3, G4) com base na perda de mineral do esmalte ΔZ (% de volume mineral x μm). Em sítios designados Grupo 1, onde a perda mineral que ocorreu foi menor que 200 unidades ΔZ ; Grupo 2 consistiu de lesões de 200-499 unidades ΔZ ; Grupo 3 - 500-999 unidades ΔZ ; e sítios onde a perda mineral foi de pelo menos 1000 ΔZ (Grupo 4). Os resultados indicaram que os *Lactobacillus* foram encontrados em proporções significantes ($p < 0,05$) em sítios onde houve maior perda mineral (Grupo 4), nenhuma outra diferença significativa em relação a este gênero foi encontrada nos demais grupos. Foi observado um aumento progressivo na freqüência de isolamento de *S. mutans* do Grupo 1 ao Grupo 4. A aplicação freqüente de sacarose resultou em um leve, mas não significativo aumento nos níveis médios de desmineralização, comparada com sítios formados por placas formadas normalmente, somente com a ingestão normal de açúcares na dieta; enquanto que, um nível maior de perda mineral ocorreu em sítios que receberam implantação inicial de *S. mutans* e aplicações intra-orais de sacarose. Foi sugerido então que utilizando-se deste protocolo (3) os *S. mutans* foram capazes de competirem com sucesso com outros microrganismos da placa em muitos locais,

favorecendo a criação de um ambiente, que conduziriam à proporções aumentadas de microrganismos acidúricos e perda mineral. O achado de uma freqüência significativamente maior no isolamento de *S. mutans* em sítios onde a perda mineral foi maior (ΔZ Grupo 4), evidência mais uma vez o papel deste grupo de microrganismos no desenvolvimento de lesões de esmalte, indo ao encontro de estudos cruzados e longitudinais que demonstraram que *S. mutans* foi isolado mais freqüentemente de locais com lesões cariosas, do que em superfícies livres de cárie (LOESCHE et al.⁶⁵, 1975; LANG et al.⁶¹, 1987; MARSH et al.⁷², 1989).

ZERO et al., 1990¹⁰², 1991⁹⁹, investigaram a resposta adaptativa dos estreptococos do grupo “mutans” ao crescimento em condições de pH baixo. Estudaram a atividade glicolítica de duas cepas de estreptococos do grupo “mutans”, *S. mutans* IB-600 e *S. sobrinus* 6715-13 que cresceram em cultura, com diferentes condições de pH. O pH ambiental durante o crescimento foi diminuído pela redução da capacidade de tamponamento do meio básico TTY (HAMADA e TORII⁴², 1978). O meio modificado continha 1/8 da concentração dos sais tamponantes encontrados no meio básico. A atividade glicolítica das suspensões celulares lavadas das cepas em teste foi medida em níveis constantes de pH, de 7 e 5, com pH estacionário. Foram estudadas tanto as culturas de fase estacionária de 18h como as de fase logarítmica. Os resultados demonstraram que o crescimento

em condições de pH baixo ampliou a atividade glicolítica das cepas em teste dos *S. mutans*.

ZERO et al.¹⁰¹, 1992, neste estudo abordaram a questão da espessura da placa e difusão de açúcar com um modelo de cárie intrabucal. O modelo consistiu de um aparelho palatino que prendia 8 blocos de esmalte bovino revestidos por placa em teste, preparada pela coleta de culturas de *S. mutans*. A espessura de placa foi estabelecida pelas dimensões de um prendedor de plástico que tinha 5 mm de largura. O acesso da saliva à placa em teste foi através de um recesso de 5 mm em ambos os lados do prendedor de plástico. Os resultados deste estudo que comparou dois diferentes tipos de placa em teste, mostraram a importância da espessura e das propriedades de difusão da placa. Placa sem glucano foi preparada a partir de caldo Todd Hewitt e uma outra com glucano foi preparada com o mesmo caldo, suplementado com sacarose 2,0%. A alteração na microdureza da superfície do esmalte bovino foi usada como medida indireta da extensão da desmineralização do esmalte que ocorreu nos locais que correspondiam às placas de espessuras diferentes (0,5 mm, 1,5 mm e 2,5 mm). Para a placa sem glucano, que foi principalmente um agrupamento de células de *S. mutans*, a desmineralização foi detectada apenas no local onde a espessura era de 0,5 mm, enquanto a placa com glucano resultou em desmineralização em uma camada mais espessa de placa (2,5 mm). A desmineralização máxima ocorreu no

local onde a espessura era de 0,5 mm, após bochechos com glicose a 10%, idêntica à prevista pelo modelo de **DAWES e DIBDIN²¹ (1986)**.

LINGSTRÖN et al. ⁶², 1994, realizaram um estudo no qual 8 voluntários saudáveis (3 homens e 5 mulheres) de 62 a 78 anos de idade participaram, sendo que utilizaram prótese total. Os voluntários foram instruídos a reduzirem o consumo de lanches entre as refeições e manter a ingestão de açúcares em suas dietas leves e constante nível durante o estudo. O estudo foi dividido em 3 fases do tipo cruzado, com duração de 21 dias cada. Durante uma das etapas do experimento foi pedido aos voluntários que comessem batata chips e queijo na primeira hora, totalizando 12-15 vezes por dia. Durante a segunda fase experimental os voluntários consumiram aproximadamente 5 g de sacarose contido em caramelos, bala tofee, balas com licor (12-15 vezes ao dia). A terceira fase foi o período controle no qual estes produtos não eram consumidos. Foram utilizados 1 bloco de esmalte e 2 blocos de dentina (4 x 4 x 2 mm) na altura correspondente aos dentes pré-molares na parte inferior da prótese e posicionados 1 mm abaixo da superfície do polímero para favorecer a formação de placa. Os voluntários foram instruídos a não escovarem os blocos durante as fases experimentais, mantendo a higiene das outras partes da prótese total, utilizando dentifício não fluoretado. Para cada fase, novos blocos de dentina e esmalte foram utilizados. Após cada fase do experimento os blocos foram submetidos às análises bioquímica,

microbiológica e a dureza do esmalte e dentina foram avaliadas. A análise microbiológica foi realizada no 1º e 21º dias do experimento, onde foram coletadas amostras de saliva e processadas para determinação do número de *S. mutans* e *Lactobacillus*. No primeiro dia a média dos valores da contagem de *S. mutans* da saliva foi de $6,24 \pm 1,12$ log. UFC/ml (n=24), *Lactobacillus* $5,46 \pm 1,12$ (n=24) que foi similar nos três períodos. Houve um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,01$) na contagem de *S. mutans* durante as 3 fases do experimento do 1º para o 21º dia. A contagem de *Lactobacillus* também aumentou durante os 3 períodos ($5,83 \pm 0,97$ log. UFC/ml) (n= 24) mas não foi estatisticamente significativa. Não houve diferenças nas mudanças dietéticas (1º x 21º dia) para *S. mutans* ou para *Lactobacillus* durante os 3 períodos experimentais. Houve uma grande quantidade de placa dental formada sobre os blocos de esmalte e dentina em cada fase do experimento. Entretanto, não foi avaliado a composição microbiana, no que se referiu à quantidade ou qualidade microbiana da mesma. Foi sugerido que a composição microbiana desta placa era similar provavelmente àquela encontrada nos dentes naturais, desde que pessoas desdentadas com prótese total não parecem diferir significativamente de indivíduos com dentes, no que diz respeito à microbiota da saliva e placa incluindo *S. mutans* e *Lactobacillus* (THEILADE et al. ⁸⁹, 1983; EMILSON & THORSELIUS ³⁰, 1988). Além disso, nenhuma diferença entre placa removida da superfície de blocos de esmalte inseridos nos dispositivos e aquela removida de superfícies de dente natural foi observada, a

respeito da composição microbiana ou resposta do pH após bochecho com sacarose a 10% (MACPHERSON et al. ⁷⁰, 1990). Desta forma é razoável presumir que a placa causando desmineralização de esmalte e dentina na investigação presente tem em torno do mesmo potencial cariogênico que placa sobre dente natural.

REBELO⁷⁹, 1994, realizou estudo *in situ* para avaliar a composição bioquímica da placa dental em função da frequência diária do uso de sacarose, e pode concluir que: a placa dental formada na presença de sacarose apresenta uma menor concentração inorgânica (6 x menos flúor, 3 x menos cálcio e 2 x menos fosfato) e também verificou qualitativamente que o meio torna-se com menor capacidade de resistir aos desafios desmineralizantes.

WENNERHOLM et al. ⁹⁸, 1995, realizaram um estudo a fim de determinar os efeitos da restrição da dieta nos níveis bucais de *S. mutans* e *S. sobrinus* na saliva e placa dental. Neste estudo 20 voluntários preencheram 3 critérios:

- 1) tinham uma contagem de *S. mutans* acima de 300.000 UFC/ml saliva;
- 2) hospedavam *S. mutans* e *S. sobrinus* na saliva;
- 3) comiam açúcar com frequência.

Os voluntários foram divididos ao acaso, 12 voluntários (grupo teste) os quais abstiveram-se de alimentos contendo açúcar entre as refeições e reduziram o consumo de açúcar nas refeições principais por um período de 6 semanas. O grupo controle constituído por 8 voluntários não recebeu nenhuma instrução em relação a dieta durante este mesmo tempo. Amostras de placa e saliva foram coletadas no início do experimento, 3^a, 6^a e 12^a semanas. Os resultados mostraram que os níveis de *S. mutans* e *S. sobrinus* diminuíram na saliva e placa durante o período de 6 semanas de restrição de açúcar. Ambas as espécies pareceram reagir similarmente à restrição de açúcar, tanto na saliva quanto na placa. Quando completou-se 12 semanas, isto é 6 semanas após o período de restrição de açúcar, as contagens de *S. mutans* e *S. sobrinus* tinham aumentado novamente, mas foram ainda menores do que quando comparados com os valores do início do experimento.

Considerando não estar definida qualitativamente a relação entre frequência de exposição a sacarose, o desenvolvimento de cárie e a contagem de *S. mutans*, nos propusemos a realizar o presente trabalho.

MATERIAL e
MÉTODOS

6. MATERIAL e MÉTODOS

6.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O estudo foi do tipo cruzado, consistindo de quatro grupos de tratamentos, nos quais doze (12) voluntários utilizaram dispositivos intra-orais contendo blocos de esmalte íntegros, a saber:

Grupo I : utilizando sacarose 8 vezes ao dia

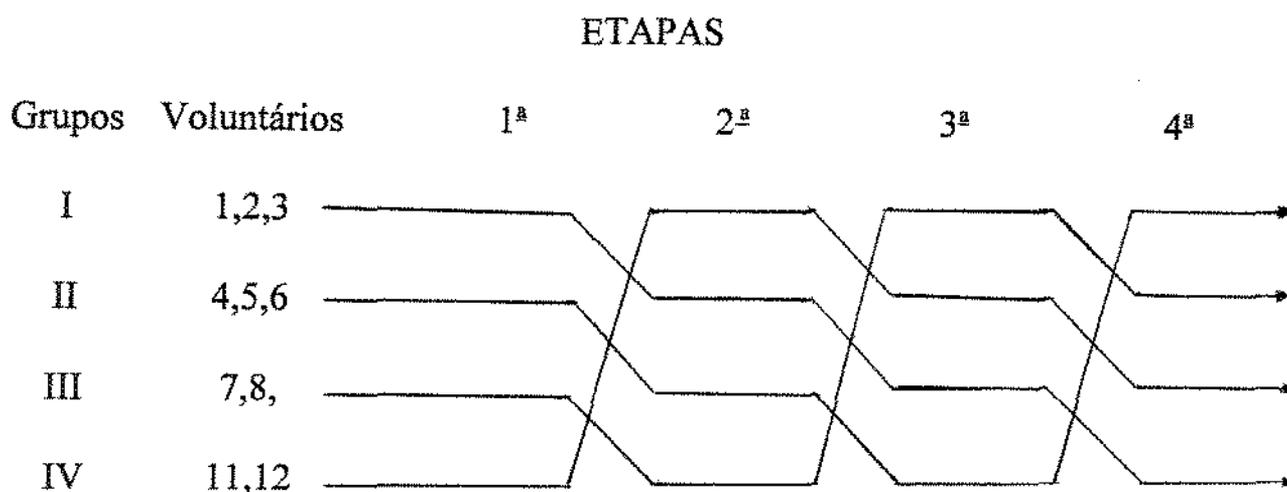
Grupo II : utilizando sacarose 4 vezes ao dia

Grupo III : utilizando sacarose 2 vezes ao dia

Grupo IV : não utilizando sacarose

O período total do estudo compreendeu quatro etapas de vinte e oito (28) dias com intervalo mínimo de sete (7) dias, entre cada etapa. Em cada etapa foram utilizados (12) voluntários, três (03) em cada tratamento, de tal modo que ao final de todos os cruzamentos, todos os voluntários foram submetidos a todos os tratamentos.

O fluxograma abaixo resume o delineamento:



Grupo I - frequência de sacarose 8X

Grupo II - frequência de sacarose 4X

Grupo III - frequência de sacarose 2X

Grupo IV - frequência de sacarose 0X

6.2. FASE PREPARATÓRIA

6.2.1. Preparação dos Blocos Dentais

Para a realização deste trabalho, foram utilizados dentes humanos, terceiros molares inclusos íntegros extraídos por razões clínicas, mantidos em formol

2% pH 7,0 desde a extração. Foram seleccionados dentes sem defeitos no esmalte e com mais de 2/3 da raiz completa.

Os dentes tiveram suas coroas seccionadas com disco diamantado de dupla face (cortadeira ISOMET) e a partir do terço médio coronal foram obtidos blocos dentais de 3 x 3 x 2 mm. As medidas foram conferidas e acertadas utilizando-se paquímetro digital MAUSER JUNIOR (0,01 mm/150 mm) e micro-motor CS421 DENTE com disco diamantado. Em seguida os blocos foram polidos com pasta diamantada METADI II diamond compound 3 micron (BUEHLER) em disco de feltro na politriz AROTEC APL 4 durante dois (02) minutos, removendo-se assim aproximadamente 50 μ m da camada externa do esmalte dental (FEATHERSTONE & ZERO³¹, 1992). Assim, foram obtidos 192 blocos, os quais foram divididos casualmente para cada voluntário em cada etapa.

6.2.2. Confeccção dos Dispositivos Intra-orais

Foram confeccionados quatro (04) dispositivos intra-orais palatinos para cada voluntário (um para cada etapa do experimento), nos quais foram preparadas quatro (04) cavidades de 3 x 3 x 3 mm na altura correspondente aos dentes molares, sendo dois de cada lado onde foram fixados os blocos dentais. Uma tela plástica foi fixada sobre os blocos dentais deixando-se um espaço de 1

mm entre o bloco e a tela plástica para permitir acúmulo de placa dental (BENELLI et al.⁵, 1993). (Figura 1).

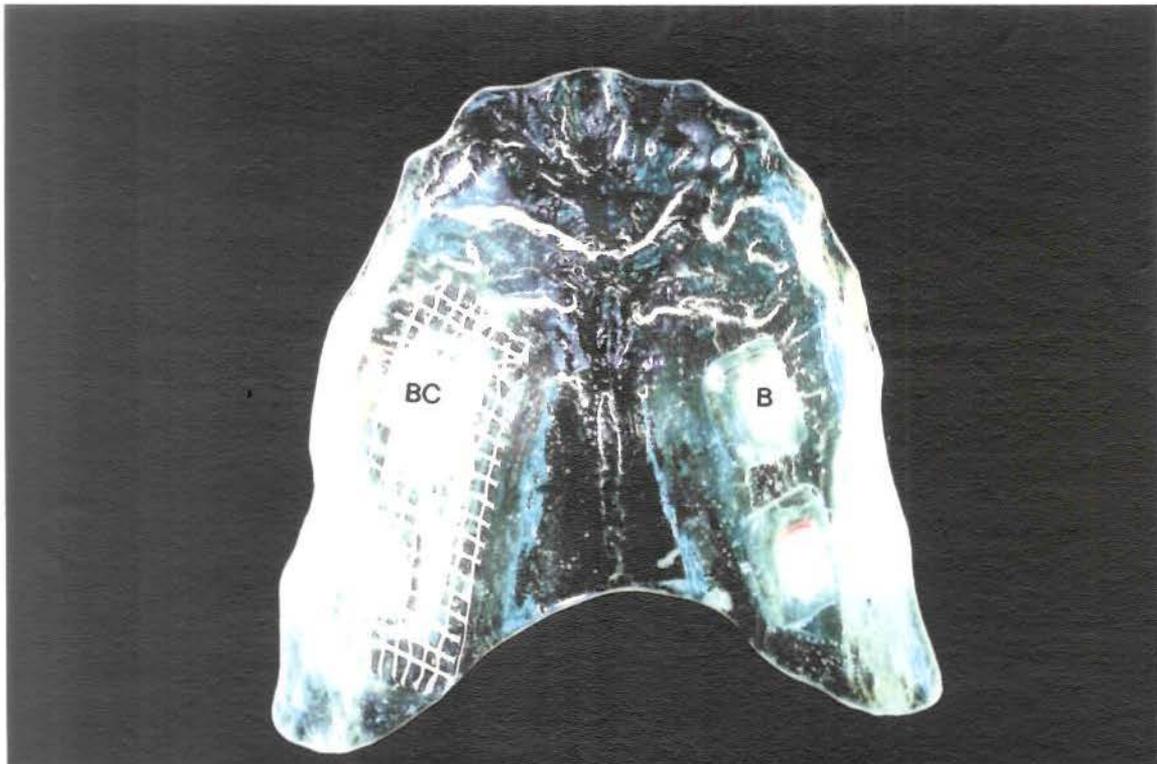


Figura 1 - Dispositivo intra-oral palatino

6.3. FASE CLÍNICA

Doze voluntários adultos residentes em Piracicaba (região de água fluoretada) com bom estado de saúde bucal e geral participaram deste estudo. Os voluntários utilizaram os dispositivos diariamente inclusive para dormir, removendo-os, porém mantendo-os em ambiente úmido durante às refeições. Orientações por escrito foram passadas aos voluntários enfatizando a não utilização de produtos contendo flúor, exceto água. A escovação habitual dos dentes assim como da superfície interna do dispositivo foi feita com dentifrício não fluoretado. Para simular desafio cariogênico, colocou-se uma gota de solução de sacarose 20% sobre cada bloco de esmalte e após 5 minutos o dispositivo foi recolocado na boca; sendo a frequência e horário deste procedimento de acordo com o delineamento experimental. (Apêndice).

6.4. FASE LABORATORIAL

6.4.1. Coleta da Placa Dental

Ao final de cada etapa do experimento, as telas plásticas que recobriam os blocos de esmalte foram removidas com lâminas de bisturi nº 15 e então com uma espátula plástica de ponta fina (JON) contida no interior de um

tubo de ensaio, fechado com tampão de algodão, previamente esterilizados, foi coletada a placa dental, 12 horas após gotejar sacarose, segundo o último horário estabelecido, formada sobre os blocos de esmalte sendo imediatamente transferida para um pedaço de papel alumínio contido no interior de uma placa de Petri esterilizada e pré-pesada, e o peso úmido da placa foi determinado utilizando balança ANALITICAL PLUS OHAUS.

6.4.2. Homogeneização e Diluição

Depois de obtido o valor do peso úmido da placa dental, para cada 1,0 mg de placa foi adicionada 1,0 ml da solução tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 sendo os dados anotados em fichas.

Então, realizada a diluição na própria placa de Petri, transferimos toda a amostra para tubo de ensaio contendo somente pérolas de vidro, fechados com tampão de algodão e esterilizados. Os tubos de ensaio contendo amostras de placa foram submetidos a homogeneização através da agitação dos tubos em agitador de tubos PHOENIX, por 30 segundos. A seguir, a suspensão foi diluída em séries decimais de 10^{-1} a 10^{-5} em tubos contendo 4,5 ml de PBS. Os tubos foram conservados em gelo picado durante toda a coleta e levados para o laboratório da disciplina de microbiologia.

O tempo decorrido desde a coleta das amostras e até o processamento não excedeu quatro horas (BENTLEY et al.⁶, 1988).

6.4.3. Semeadura do Material

Alíquotas de 0,05 ml de cada diluição foram depositadas no centro das placas de Petri (PERFECTA), de 12 x 60 mm, contendo ágar sacarose bacitracina - SB20 (DAVEY & ROGERS²⁰, 1984). O material depositado foi distribuído uniformemente sobre a superfície dos meios de cultura, com o auxílio de um bastão de vidro em forma de L, esterilizados.

As placas foram incubadas a 37° C, em anaerobiose utilizando-se o sistema Gas-Pak (BBL), durante 48 a 72 horas (VAN HOUTE et al.²³, 1978).

O meio de cultura SB20 (DAVEY & ROGERS²⁰, 1984), constituído para modificação do "Trypticase Yeast Extract Cystine agar medium" - TYC (DE STOPPELLAAR et al.²⁶, 1967), apresentava a seguinte composição:

| | | |
|---------------------|-------|----------|
| Bacto-Casitona | DIFCO | 1,5g |
| Extrato de Levedura | DIFCO | 0,5g |
| L- Cistina | MERCK | 0,02g |
| Sulfito de Sódio | MERCK | 0,01g |
| Acetato de Sódio | MERCK | 2,0g |
| Sacarose P.A. | MERCK | 20,0g |
| Ágar | SIGMA | 1,5g |
| Água Destilada | | 100,0 ml |

Os componentes foram dissolvidos em água destilada e autoclavados a 120° C por 20 minutos. Após o resfriamento a aproximadamente 55° C, a solução de bacitracina foi adicionada em condições assépticas para obter concentração final de 0,2 U/ml. Aliquotas de 5,0 ml do ágar foram distribuídos na câmara de fluxo laminar (VECCO), em placas de Petri esterilizadas. Estas foram acondicionadas em posição invertida e incubadas a 37° C por 24 horas, para testar a grau de esterilização.

As placas contendo meio de cultura eram embaladas em parafilme e conservadas em geladeira, em posição invertida até o momento do uso.

6.4.4. Contagem das Amostras das UFC/mg de placa dental

A observação das colônias com características pertencentes aos estreptococos do grupo mutans foi realizada sob luz refletida com auxílio de um microscópio estereoscópio (NIKON) seguindo os padrões descritos por **STOPPELAAR et al.(1967²⁶, 1969²⁷), VAN PALENSTEIN HELDERMAN et al.⁹⁶ (1983), DAVEY & ROGERS²⁰ (1984) e AZEVEDO¹ (1988).**

A contagem das colônias com características pertencentes aos estreptococos do grupo mutans foram realizadas em contador de colônias PHOENIX.

A partir de colônias bacterianas que desenvolveram-se no meio de cultura, sem apresentar característica cultural pertencente aos estreptococos do grupo mutans, era feito uma bacterioscopia para a coloração de Gram, à fim de determinarmos as características morfológicas, arranjos e características tintoriais.



Figura 2 - Aspecto das colônias de estreptococos do grupo mutans em meio SB20

6.4.5. Embutimento dos Blocos de Esmalte Dental para Análise de Microdureza

Para cada voluntário, utilizamos uma lamínula de vidro de (tamanho médio). Inicialmente marcamos com caneta hidrocor o canto superior esquerdo da lamínula com um ponto. Os blocos de esmalte foram ordenados de acordo com a frequência de utilização da solução de sacarose a 20% utilizada. por cada voluntário, e com adesivo instantâneo super BONDER®, os blocos foram colados, de modo que o eixo longitudinal dos blocos ficaram paralelos à superfície da lamínula, sendo que todas as faces oclusais ficaram para a cima e a cervical para a baixo.

Os blocos dentais foram embutidos em discos de resina acrílica incolor autopolimerizável, CLÁSSICO, com auxílio de uma embutidora metalográfica, AROTEC C modelo PRE-30, padronizando-se 10 minutos de embutimento, com uma média de 100 Kgf/cm² de pressão, e 20 minutos de resfriamento.

6.4.6. Corte e Polimento das Amostras

Seccionamos o corpo de prova na cortadeira metalográfica - BUEHLER ISOMET™ lubrificado com óleo mineral - BUEHLER-ISOCUT FLUID, de modo que o corte passasse pelo meio dos blocos dentais, sempre refrigerando-se com óleo. Iniciamos, o corte com baixa velocidade, aumentando-se gradativamente. Para acabamento, foram empregadas lixas abrasivas de granulação 600 de óxido de alumínio (NORTON, BRASIL) em uma lixadeira politriz AROTEC - modelo APL 04 sob refrigeração e água. Os corpos de prova foram então polidos seqüencialmente nessa mesma politriz, utilizando-se pasta diamantada para polimento, marca BUEHLER, de 3 µm (verde) metamed, e 1 µm respectivamente, em tecidos DP STRUERS e refrigerado a óleo mineral BUEHLER - ISOMET FLUID. O polimento foi considerado satisfatório, quando se verificou a ausência de riscos deixados pelos abrasivos sobre as superfícies dos corpos de prova. (Figura 3)

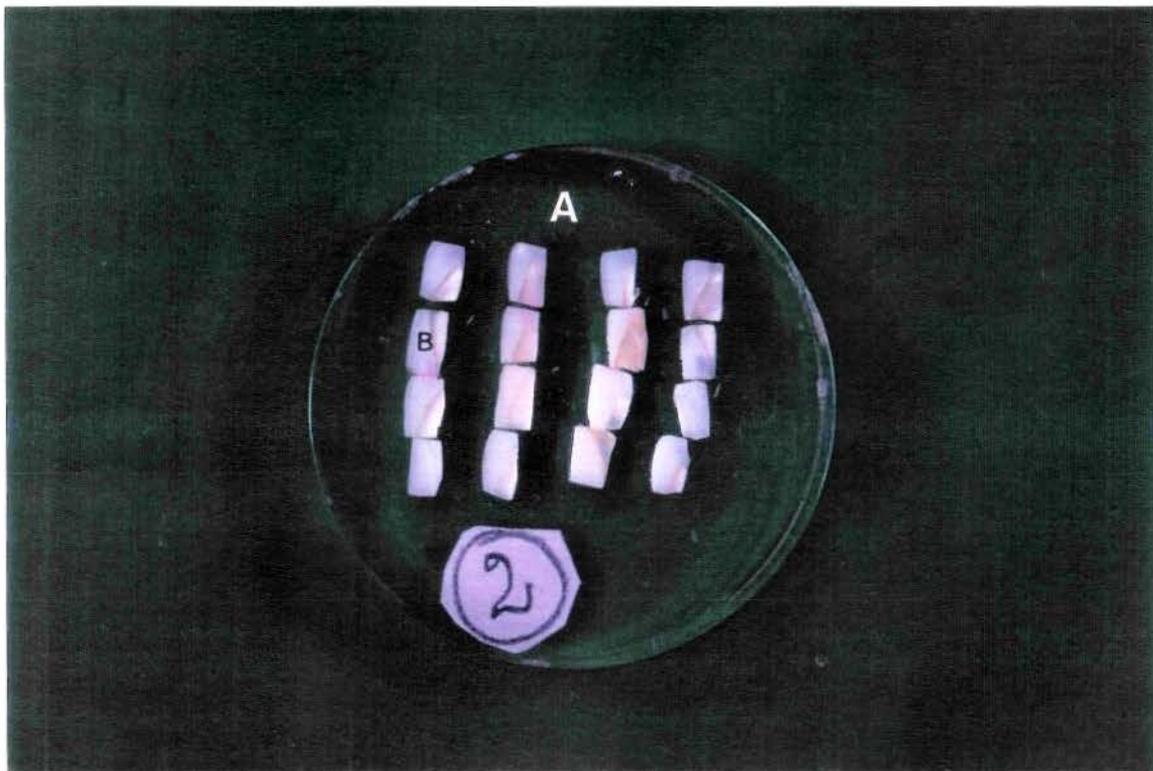


Figura 3 - Característica do disco polido, pronto para a análise de microdureza dos blocos de esmalte dental. Legenda: A- acrílico de embutimento; B- bloco de esmalte dental

6.4.7. Análise da Microdureza dos Blocos de Esmalte Dental

As impressões de microdureza foram realizadas longitudinalmente através das faces cortadas, utilizando-se o microdurômetro - SHIMADZU, modelo HMV - 2000 e penetrador tipo Knoop com carga de 25 g durante 30 segundos. Neste estudo foram realizadas 18 impressões, a partir da superfície externa do esmalte em direção à dentina, tomando como referência a divisão entre a parte da resina embutidora e a superfície do esmalte dental. Inicialmente foram feitas 6 impressões no meio do bloco de esmalte, sendo a primeira a 10 μm , e as demais a 20, 30, 50, 70, 90 μm de distância da superfície externa do esmalte dental. Em seguida, foram feitas mais 2 sequências de 6 impressões, seguindo as distâncias citadas acima, 100 μm acima da leitura inicial, mais 100 μm abaixo da leitura inicial. A média das 03 determinações à determinada distância da superfície representa a dureza do esmalte a especificada distância, a qual foi submetida a análise estatística. Também, através da regra trapezoidal (JONES & KENWARD⁵⁰, 1989), determinou-se a área integrada de dureza do esmalte ($\mu\text{m} \times \text{KHN}$) a qual foi estatisticamente analisado. Depois de efetuadas as impressões, foram feitas as leituras de dureza Knoop (KHN), e os corpos de prova, fotografados, utilizando-se o equipamento fotográfico acoplado ao microdurômetro, câmera OLYMPUS modelo C-35 DA - 2 com aumento

proporcionado pela objetiva de 10x, onde podem ser observados nas figuras 6, 7, 8, 9.

6.4.8. Análise de Flúor na Água de Abastecimento Público

No decorrer das quatro (04) etapas experimentais a concentração de flúor na água de abastecimento público de Piracicaba, foi avaliada diariamente, utilizando-se potenciômetro ORION EA 940 com um eletrodo específico para flúor modelo 96-09, utilizando-se para calibração do aparelho padrões de 0,1 a 1,0 ppm F.

6.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados estatisticamente considerando o delineamento experimental cross-over (**JONES & KENWARD⁵⁰, 1989**).

RESULTADOS

7. RESULTADOS

7.1. CONTAGEM TOTAL de *S. mutans* na PLACA DENTAL

Os resultados (média \pm desvio padrão) em relação a contagem total de Estreptococos do “grupo mutans” na placa dental em termos de unidade formadora de colônia por peso de placa dental (UFC/mg) relacionados com a frequência do uso de sacarose (0 a 8x) estão demonstrados na Tabela I e Figura 4.

Tabela I - Média e desvio padrão da média da contagem (10^4) de Estreptococos do “grupo mutans” na placa, para os quatro tratamentos.

| SACAROSE/dia | CONTAGEM na PLACA (UFC/mg) |
|--------------|----------------------------|
| 0 | 26,7167 \pm 13,3574 a |
| 2 x | 46,7150 \pm 30, 8098 a |
| 4 x | 102, 4444 \pm 53,3378 a |
| 8 x | 52,1767 \pm 21,4808 a |

* Médias seguidas por letras distintas diferem estatisticamente entre si ao nível de significância de 5%.

Verificou-se que os tratamentos 0 de sacarose, 2 x de sacarose, 4 x de sacarose e 8 x de sacarose não diferiram estatisticamente entre si. A maior média

observada foi o do tratamento 4 x de sacarose, e a menor média o do tratamento 0 de sacarose. Estes resultados estão ilustrados na Fig. 4.

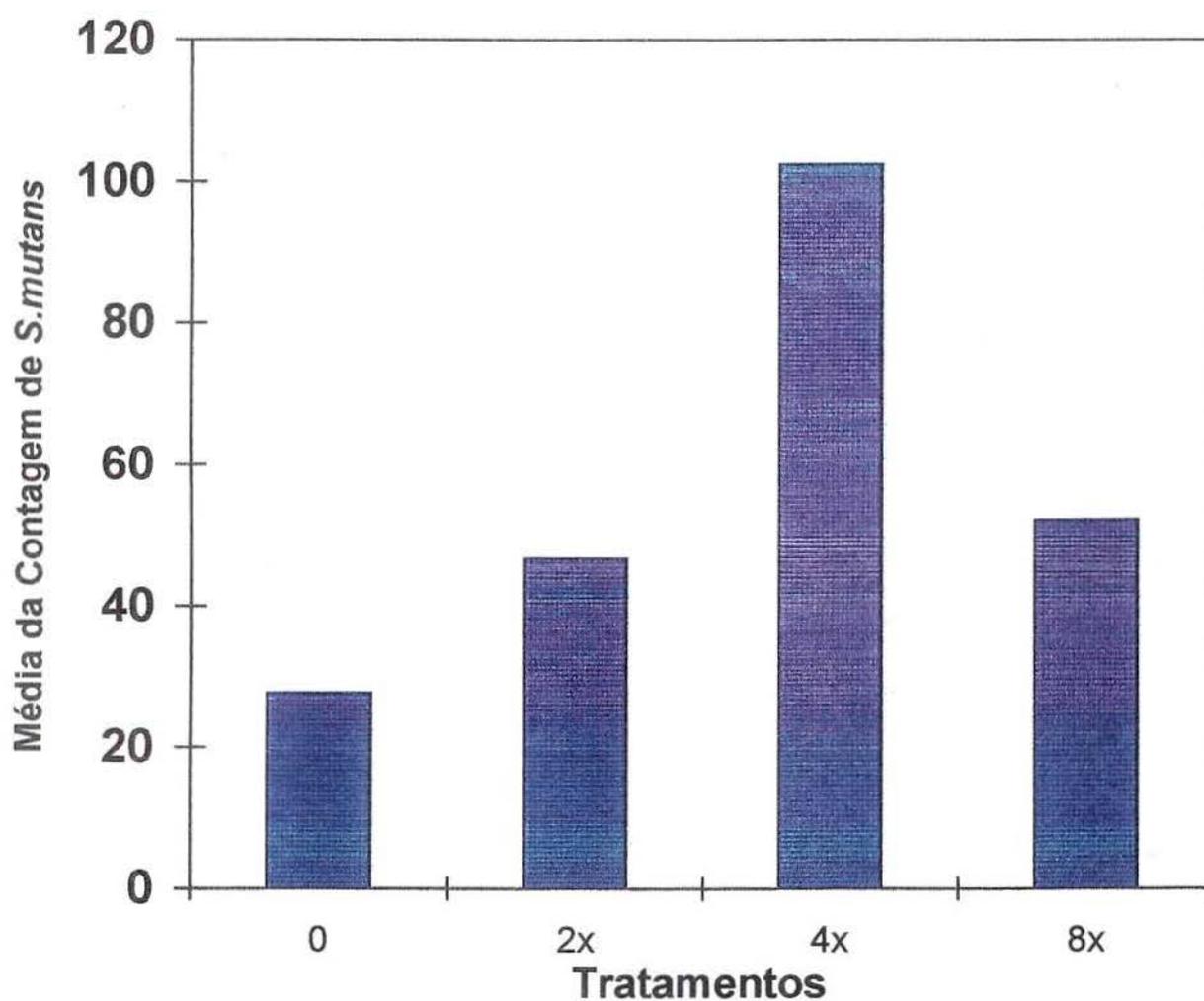


Figura 4: Média da contagem de Estreptococos do “grupo mutans” na placa para os quatro tratamentos (10^4)

7.2. ANÁLISE QUALITATIVA de CÁRIE DENTAL

Ao exame visual podemos observar que o esmalte dental submetido ao tratamento com sacarose 8X, apresentou uma maior perda de mineral representada pela presença de uma extensa lesão branca. Enquanto que, nos tratamentos 2X, 4X e na ausência de sacarose não foi observado perda mineral. (Figura 5).

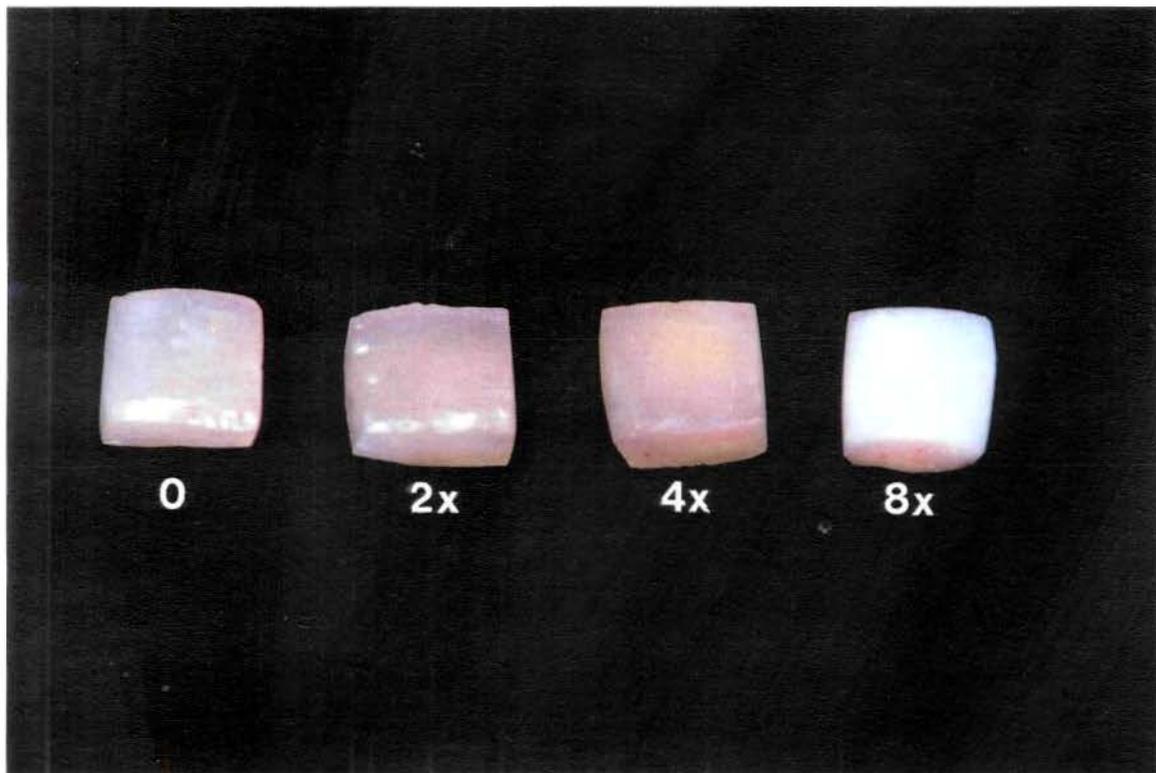


Figura 5: Aspecto dos blocos dentais após os tratamentos com sacarose

(de 0 a 8 x/dia)

Com blocos dentais seccionados ao centro podemos observar os aspectos histológicos descritos a seguir. Nas Figuras 6 e 7 quando utilizou-se tratamento sem sacarose e sacarose 2X respectivamente, podemos verificar ausência de cárie. Enquanto que na Figura 8, tratamento de sacarose 4 X podemos observar o desenvolvimento da lesão de cárie e na Figura 9, com tratamento sacarose 8X uma lesão de cárie mais acentuada.



Figura 6: Aspecto histológico do esmalte dental submetido ao tratamento 0 de sacarose. Legenda: A- acrílico de embutimento; S- superfície dental; I- indentações; E- esmalte dental.

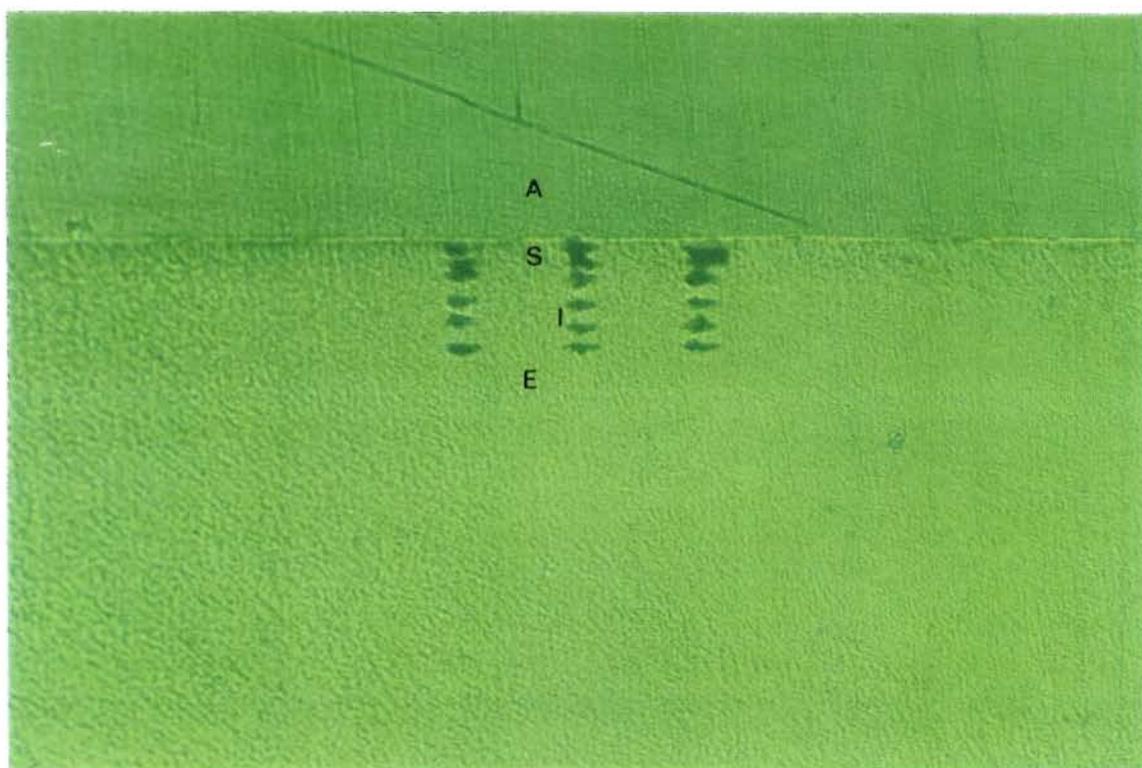


Figura 7: Aspecto histológico do esmalte dental submetido ao tratamento 2 X sacarose/dia. Legenda: A- acrílico de embutimento; S- superfície dental; I- indentações; E- esmalte dental.



Figura 8: Aspecto histológico do esmalte dental submetido ao tratamento 4 X sacarose/dia. Legenda: A- acrílico de embutimento; S- superfície dental; I- indentações; E- esmalte dental.

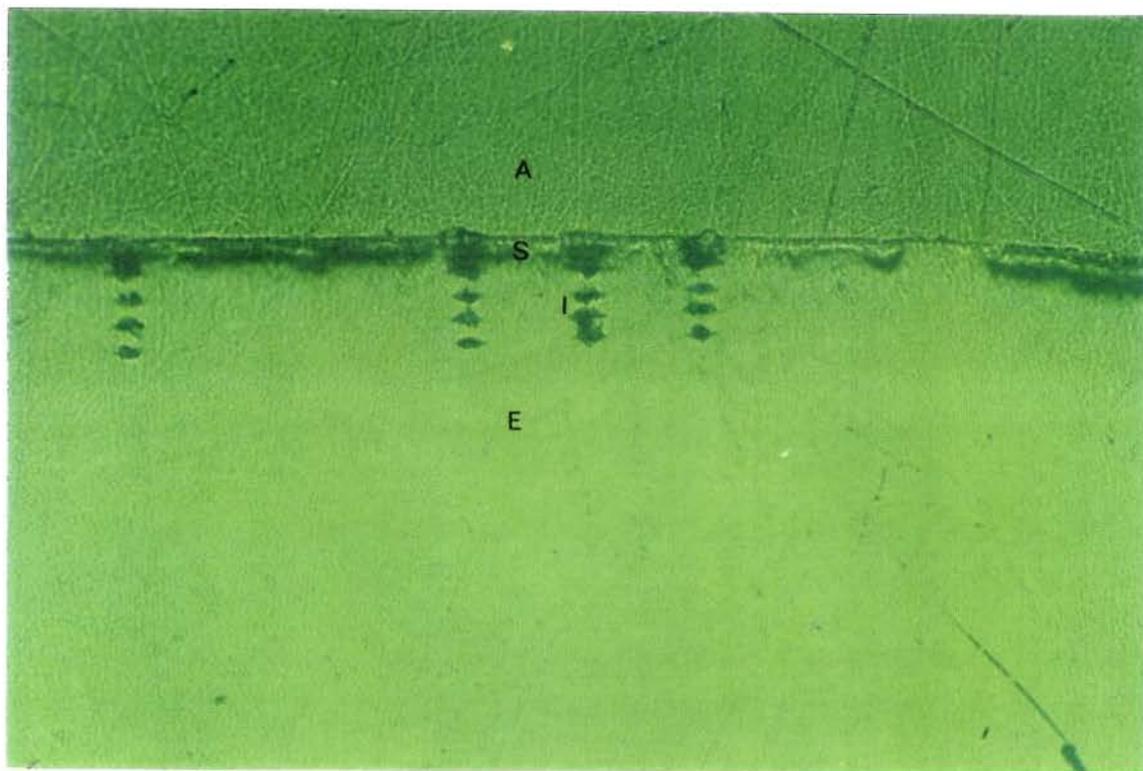


Figura 9: Aspecto histológico do esmalte dental submetido ao tratamento 8 X sacarose/dia. Legenda: A- acrílico de embutimento; S- superfície dental; I- indentações; E- esmalte dental.

7.3 ANÁLISE QUANTITATIVA DE CÁRIE DENTAL

A tabela abaixo mostra as médias e desvios padrões das médias de dureza Knoop nas distâncias de 10,20,30,50,70 e 90 μm da superfície dental em função dos tratamentos nos blocos de esmalte dental submetidos aos diversos tratamentos.

Tabela II - Médias e (desvios padrões) das médias de dureza na distância de 10,20, 30, 50, 70 e 90 μm .

| Tratamentos | DISTÂNCIA da SUPERFÍCIE (μm) | | | | | |
|-------------|---|------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | 10 | 20 | 30 | 50 | 70 | 90 |
| 0 X | 249,80 a (21,7399) | 297,98 a (15,6313) | 328,20 a (10,8536) | 351,68 a (5,9900) | 359,13 a (5,6576) | 358,09 a (5,1926) |
| 2 X | 218,35 a (19,4178) | 277,94 a (10,6836) | 309,56 a (8,1741) | 347,95 a (8,5979) | 347,49 a (8,2099) | 347,13 a (8,6040) |
| 4 X | 187,39 ab (22,1128) | 234,26 ab (22,8720) | 278,18 a (19,4199) | 327,36 a (12,4637) | 329,38 a (14,5365) | 341,36 a (11,3619) |
| 8 X | 106,63 b (28,4009) | 141,97 b (41,4989) | 158,48 b (43,5377) | 219,59 b (37,6169) | 250,02 b (36,9983) | 266,73 b (33,8980) |

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de significância de 5%.

Os resultados do teste Tukey para as comparações de médias estão apresentados na tabela II, verificamos que em todas as distâncias estudadas, o tratamento que apresentou significância, foi o tratamento 8 vezes (frequência de sacarose), que diferiu de todos os outros tratamentos e esses não diferiram entre si. Essa diferença implica em afirmar que este tratamento (8 X) foi o que apresentou a menor média de dureza de esmalte. Estes resultados estão ilustrados na Fig. 10.

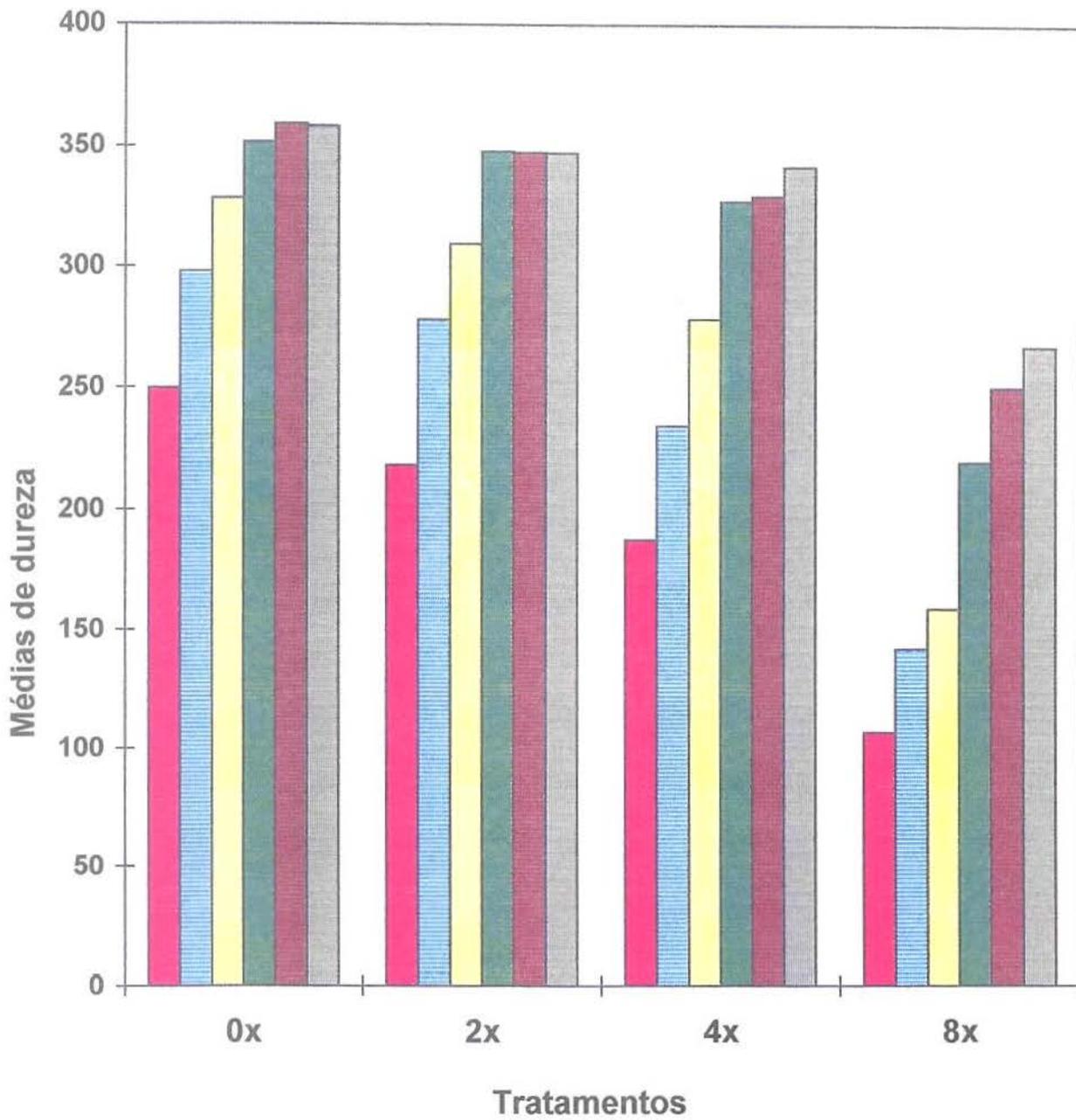


Figura 10: Médias das médias de dureza nas distâncias de 10 ■, 20 ■, 30 ■, 50 ■, 70 ■ e 90 ■ μm da superfície dental.

A área total de dureza do esmalte desde a superfície foi determinada sendo apresentada na Tab. III.

Tabela III- Médias (desvios-padrões das médias) das áreas integradas de dureza total do esmalte.

| Tratamentos | Médias |
|-------------|------------------------|
| 0 | 26949,18 (632,1376) a |
| 2 X | 25527,64 (785,0297) a |
| 4 X | 24000,78 (1157,5545) a |
| 8 X | 15887,42 (2739,1912) b |

Médias seguidas por letras distintas diferem entre si (Tukey) ao nível de 5% de significância

Observa-se que a a maior perda de mineral (menor dureza) ocorreu quando da utilização de sacarose 8x/dia, diferindo dos demais tratamentos os quais porém não diferem entre si. Estes dados estão ilustrados na Fig. 11.

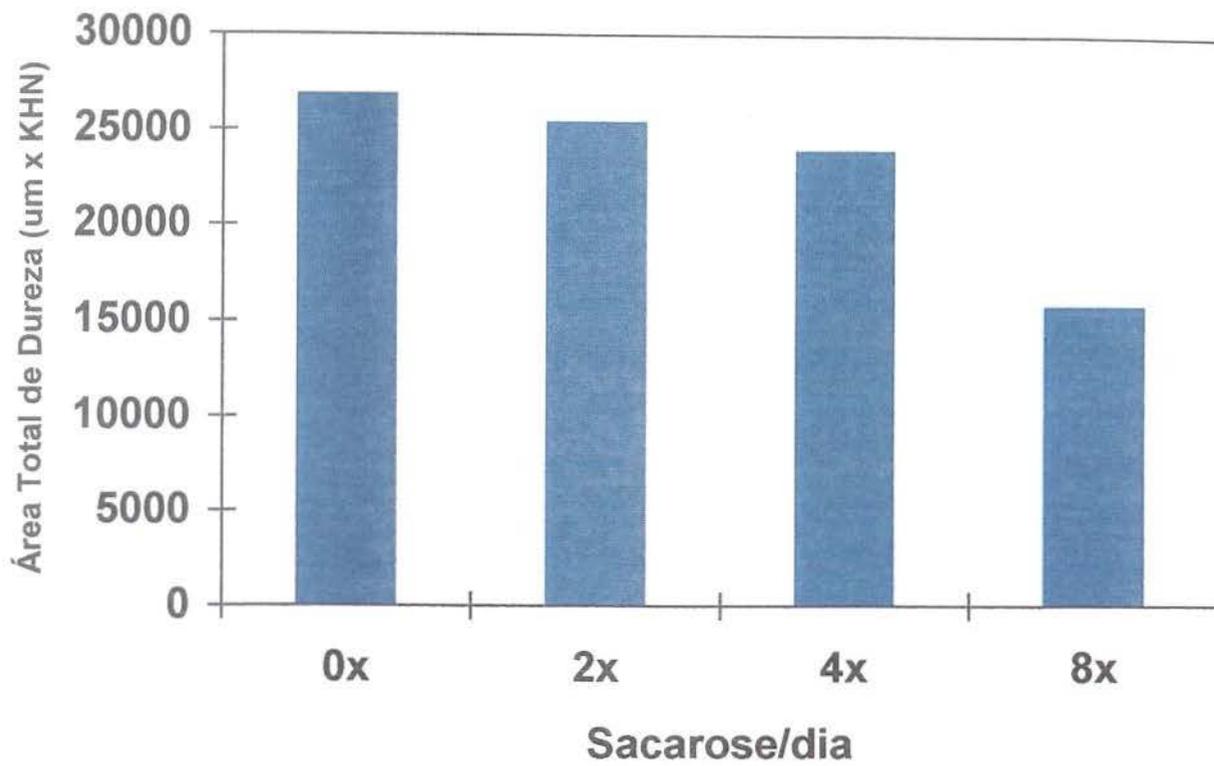


Figura 11: Área total de mineral em função dos tratamentos.

7.4. ANÁLISE de FLÚOR na ÁGUA

A seguir são apresentados os resultados da análise de flúor na água (média e desvio padrão) no decorrer das quatro etapas do experimento.

Tabela IV - Médias e desvio padrão da concentração de flúor na água durante as quatro etapas do experimento.

| ETAPAS | ppm F | PERÍODO |
|--------|-----------------|------------------|
| 1 | 0,69 \pm 0,04 | 06/04 a 04/05/94 |
| 2 | 0,69 \pm 0,06 | 11/05 a 08/06/94 |
| 3 | 0,75 \pm 0,08 | 17/08 a 14/09/94 |
| 4 | 0,74 \pm 0,03 | 21/09 a 19/10/94 |

* Médias e desvio padrão do período experimental total. Média = 0,72; s= 0,03

DISCUSSÃO dos RESULTADOS

8. DISCUSSÃO dos RESULTADOS

Está bem estabelecido que os carboidratos fermentáveis exercem um importante papel na etiologia da cárie (RUGG-GUNN⁸², 1983). O metabolismo da sacarose pelos *S. mutans* exerce um importante papel na manutenção deste microrganismo na superfície dental, o qual está associado com o início e a progressão de cárie dental (LOESCHE⁶⁴, 1986). Investigações têm mostrado que a exposição à sacarose (9x/dia) pode aumentar a incidência e severidade das lesões do esmalte dental (VON DER FEHR et al.⁹⁷, 1970; GEDDES et al.³⁶, 1978).

O resultado do presente trabalho vai de encontro com o achado destes investigadores pois mostrou que o desenvolvimento de cárie foi função da frequência do uso de sacarose. Isto tem sido atribuído à predominância do fenômeno de desmineralização (GEDDES et al.³⁶, 1978, GUSTAFSON et al.⁴⁰, 1954). Como REBELO⁷⁹ (1994) descreveu em seu trabalho uma placa dental formada quando da alta frequência de sacarose, teria em termos de íons cálcio, fosfato e flúor menores condições de suportar os desafios cariogênicos. A maior frequência de exposição à sacarose promove um acúmulo maior de placa com uma maior produção de polissacarídeos insolúveis produzidos pelos estreptococos do grupo mutans e aumenta a porosidade da placa dental pelo aumento da distância interbacteriana facilitando assim um aumento da difusão do substrato (sacarose). Isso leva a uma maior produção bacteriana de ácido, diminuição ampliada do pH

nas regiões periféricas e profundas da massa celular. Esse conceito é apoiado por estudos recentes com o modelo intrabucal de BRUDEVOLD¹⁰, 1984, (FU et al.³⁴, 1991). Em relação ao presente trabalho, o tratamento 8x vezes (frequência de sacarose), foi o que conduziu à níveis médios maiores de desmineralização (Tab. II,III e figs. 10 e 11) comparados com os outros tratamentos (0, 2x, 4x). Entretanto nas contagem de Estreptococos do "grupo mutans" submetidas a esse tratamento não foram observadas diferenças significativas na placa em função da exposição de sacarose, (tratamentos 0, 2x, 4x) sendo que no tratamento 8x, a contagem foi menor em relação ao tratamento 4x. Os resultados observados em relação a contagem de Estreptococos do "grupo mutans" mostraram uma tendência de aumento em função da frequência de sacarose, entretanto as diferenças observadas não atingiram nível de significância estatística a 5% devido a grande variabilidade observada. Em acréscimo, quando da exposição a sacarose 8x/dia a contagem de Estreptococos do "grupo mutans" diminuiu. Isto pode ter ocorrido em função da metodologia utilizada para homogeneização da placa dental. Assim, REBELO⁷⁹ (1994) mostrou que a concentração de polissacarídeos insolúveis na placa quando da exposição a sacarose 8x/dia é 3 vezes maior quando de menores frequência. Considerando que estes polissacarídeos agem como agentes de adesão das bactérias, a homogeneização com pérolas de vidro pode não ser o procedimento laboratorial mais adequado para esta avaliação. Muito provavelmente se tivesse sido determinada a porcentagem de Estreptococos do "grupo mutans" em relação

ao número total de Estreptococos as diferenças teriam sido evidenciadas. No estudo *in situ* realizado por MACPHERSON et al.⁷⁰, 1990, foi demonstrado que no grupo, o qual gotejava solução de sacarose a 10% sobre o blocos esmalte dental 9x ao dia, associado a uma dieta normal recomendada aos voluntários, exerceu uma influência não significativa, tanto em termos qualitativos como quantitativos em relação a composição microbiana da placa em comparação com outro protocolo, seguido por estes voluntários, o qual não utilizavam sacarose. O resultado do nosso trabalho como o de MACPHERSON et al.⁷⁰, diferem dos estudos relatados por STAAT et al.⁶⁸, 1975, no qual demonstraram aumento na contagem de *S. mutans* e *Lactobacillus* na placa associada a uma dieta rica em sacarose, comparado com placa associada a uma dieta pobre em sacarose. Por outro lado, SCHEIE et al.⁶⁴, 1984, demonstraram que a prevalência de *S. mutans* não foi afetada por modificação na dieta (rica ou pobre em sacarose). WENNERHOLM et al.⁶⁹, 1995, mostraram através de um estudo realizado que os níveis de *S. mutans* e *S. sobrinus* diminuíram na saliva e placa durante o período de 6 semanas de restrição de açúcar. Entretanto, apesar de ter ocorrido uma contagem baixa de estreptococos do grupo mutans no tratamento (8x), e ter sido o tratamento que promoveu maior perda mineral, podemos supor, que além deste grupo de microrganismo outros tipos de microrganismos acidogênicos e acidúricos, podem ter constituído e colaborado para a cariogenicidade da placa como foi mostrado no trabalho de MACPHERSON et al.⁶⁹, 1990, onde a contagem de *Lactobacillus* foi

significativamente maior nos blocos de esmalte onde ocorreram significantes perdas de mineral, onde foi mostrado que a atividade de cárie pode estar associada à placa na qual os estreptococos do grupo mutans estavam presentes em pequenas proporções.

O estudo aqui realizado foi de delineamento experimental do tipo "cross-over" que caracteriza-se por ter o formato de um delineamento tipo quadrado latino considerando a condição experimental em linhas e colunas, onde existe uma semelhança entre as respostas de unidades experimentais de uma mesma linha; como por exemplo: nos casos em que nas mesmas unidade são reutilizadas no mesmo experimento. O que diferencia o "cross-over" dos outros tipos de delineamento é que as medidas de tratamentos diferentes são obtidos de uma mesma unidade experimental. A vantagem é que obtém-se a comparação entre tratamentos diferentes através da mesma unidade experimental. Além disso, o modelo de estudo *in situ*, permite que a placa acumulada durante 28 dias permaneça nas condições ambientais da cavidade bucal e que os blocos de esmalte posicionados no dispositivo intra-oral recebem uma freqüência controlada de sacarose.

CONCLUSÃO

9. CONCLUSÕES

- 1ª) Embora tenha sido observado uma tendência para o aumento da contagem de Estreptococos do “grupo mutans” na placa dental em função da exposição a sacarose, não se atingiu nível de significância estatística, o que pode estar relacionado com a variabilidade dos resultados e/ou os procedimentos para homogeneização da placa dental.

- 2ª) Houve uma tendência para maior perda de mineral em função a exposição à sacarose, atingindo níveis de significância quando da frequência de 8x/dia.

- 3ª) Não houve relação entre perda de mineral pelo esmalte e a contagem de Estreptococos do “grupo mutans”, o que pode estar relacionado com o descrito na conclusão número 1.

APÊNDICE

10. APÊNDICE

Tabela V - Contagem de *S. mutans* na placa dental (UFC/mg de placa) durante a primeira fase do experimento.

| VOLUNTÁRIOS | TRATAMENTOS | UFC/ mg de PLACA |
|-------------|-------------|-------------------|
| 1 | 8X | $8,5 \times 10^4$ |
| 2 | 8X | $1,4 \times 10^6$ |
| 3 | 8X | $2,0 \times 10^5$ |
| 4 | 4X | $1,4 \times 10^6$ |
| 5 | 4X | $4,0 \times 10^6$ |
| 6 | 4X | - |
| 7 | 2X | - |
| 8 | 2X | $1,6 \times 10^5$ |
| 11 | 0 | - |
| 12 | 0 | - |

Tabela VI - Contagem de *S. mutans* na placa dental (UFC/mg de placa) durante a segunda fase do experimento.

| VOLUNTÁRIOS | TRATAMENTOS | UFC/ mg de PLACA |
|-------------|-------------|-------------------|
| 1 | 4X | $5,6 \times 10^6$ |
| 2 | 4X | $3,0 \times 10^4$ |
| 3 | 4X | $1,7 \times 10^5$ |
| 4 | 2X | $1,2 \times 10^5$ |
| 5 | 2X | $3,1 \times 10^5$ |
| 6 | 2X | $6,0 \times 10^5$ |
| 7 | 0 | $2,0 \times 10^5$ |
| 8 | 0 | $1,8 \times 10^4$ |
| 11 | 8X | $7,0 \times 10^6$ |
| 12 | 8X | $4,6 \times 10^4$ |

Tabela VII - Contagem de *S. mutans* na placa dental (UFC/mg de placa) durante a terceira fase do experimento.

| VOLUNTÁRIOS | TRATAMENTOS | UFC/ mg de PLACA |
|-------------|-------------|-------------------|
| 1 | 2X | $1,0 \times 10^4$ |
| 2 | 2X | $4,6 \times 10^7$ |
| 3 | 2X | - |
| 4 | 0 | $1,6 \times 10^4$ |
| 5 | 0 | $1,2 \times 10^4$ |
| 6 | 0 | - |
| 7 | 8X | $1,5 \times 10^5$ |
| 8 | 8X | $3,0 \times 10^5$ |
| 11 | 4X | $3,9 \times 10^5$ |
| 12 | 4X | $1,3 \times 10^5$ |

Tabela VIII - Contagem de *S. mutans* na placa dental (UFC/mg de placa) durante a quarta fase do experimento.

| VOLUNTÁRIOS | TRATAMENTOS | UFC/ mg de PLACA |
|-------------|-------------|-------------------|
| 1 | 0 | - |
| 2 | 0 | $9,0 \times 10^6$ |
| 3 | 0 | $6,0 \times 10^5$ |
| 4 | 8X | $4,5 \times 10^5$ |
| 5 | 8X | $5,0 \times 10^5$ |
| 6 | 8X | - |
| 7 | 4X | $1,2 \times 10^6$ |
| 8 | 4X | $4,0 \times 10^5$ |
| 11 | 0 | $5,0 \times 10^4$ |
| 12 | 0 | $5,0 \times 10^5$ |

Tabela IX - Médias da análise de dureza do esmalte dental de acordo com os diferentes tratamentos (0 a 8X) frequência de sacarose/dia nas diferentes profundidades em relação à superfície do esmalte.

| DIST. da SUPERFÍCIE Voluntário 1 | 10 | 20 | 30 | 50 | 70 | 90 |
|-------------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Tratamento 0 | 291,41 | 254,16 | 304,74 | 328,5 | 335,75 | 352,5 |
| Tratamento 2 x | 295 | 292,33 | 320,33 | 351,42 | 354,16 | 372,34 |
| Tratamento 4 x | 240,22 | 254,45 | 274,89 | 352,66 | 368,67 | 385,89 |
| Tratamento 8x | 297,59 | 357,92 | 366,5 | 368 | 368,5 | 372,33 |

| DIST. da SUPERFÍCIE Voluntário 2 | 10 | 20 | 30 | 50 | 70 | 90 |
|-------------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Tratamento 0 | 320,25 | 326,5 | 338,5 | 363,33 | 389,34 | 370,5 |
| Tratamento 2 x | 330,66 | 332,33 | 348,83 | 387,75 | 380,83 | 370 |
| Tratamento 4 x | 231 | 277,58 | 322,75 | 360,34 | 378,25 | 375,58 |
| Tratamento 8 x | 77,18 | 0,0 | 0,0 | 298,67 | 327,67 | 319 |

| DIST. da SUPERFÍCIE Voluntário 3 | 10 | 20 | 30 | 50 | 70 | 90 |
|-------------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Tratamento 0 | 277,67 | 349,17 | 365,75 | 368,83 | 366,42 | 372,92 |
| Tratamento 2 x | 201,17 | 304,34 | 339,75 | 376,5 | 370 | 366,08 |
| Tratamento 4 x | 212,42 | 291,33 | 358,17 | 388,58 | 385,25 | 386,34 |
| Tratamento 8 x | 139,06 | 247,67 | 262,63 | 321,58 | 343,08 | 335,08 |

| DIST. da SUPERFÍCIE Voluntário 4 | 10 | 20 | 30 | 50 | 70 | 90 |
|-------------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Tratamento 0 | 237,5 | 268,17 | 287,42 | 352,09 | 367,34 | 351,41 |
| Tratamento 2 x | 193,67 | 263,17 | 303,25 | 338,5 | 346,08 | 341 |
| Tratamento 4 x | 150,46 | 150,92 | 192,25 | 276,84 | 306,92 | 325,33 |
| Tratamento 8 x | 0,0 | 0,0 | 107,77 | 202,56 | 304,89 | 338,11 |

Tabela IX - Médias da análise de dureza do esmalte dental de acordo com os diferentes tratamentos (0 a 8X) frequência de sacarose/dia nas diferentes profundidades em relação à superfície do esmalte.

| DIST. da SUPERFÍCIE Voluntário 5 | 10 | 20 | 30 | 50 | 70 | 90 |
|----------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Tratamento 0 | 311,25 | 330,92 | 359,84 | 362,25 | 360,42 | 361,42 |
| Tratamento 2 x | 171,58 | 267,75 | 302,09 | 358,59 | 363,5 | 359,42 |
| Tratamento 4 x | 102,38 | 150,03 | 192,82 | 320,66 | 258,68 | 327,25 |
| Tratamento 8 x | 58,99 | 88,07 | 43,17 | 92,68 | 166,79 | 278,79 |

| DIST. da SUPERFÍCIE Voluntário 6 | 10 | 20 | 30 | 50 | 70 | 90 |
|----------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Tratamento 0 | 321,17 | 332,16 | 360,42 | 364 | 366,34 | 366,42 |
| Tratamento 2 x | 237 | 242,08 | 290,17 | 324,5 | 332,33 | 346,41 |
| Tratamento 4 x | 155,5 | 234,25 | 282,92 | 359,25 | 355,16 | 363,42 |
| Tratamento 8 x | - | - | - | - | - | - |

(-) significa que os blocos perdidos nesta fase (8x)

| DIST. da SUPERFÍCIE Voluntário 7 | 10 | 20 | 30 | 50 | 70 | 90 |
|----------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Tratamento 0 | 112,4 | 209,25 | 286,08 | 318,25 | 335 | 321,25 |
| Tratamento 2 x | 189,42 | 287,08 | 313,5 | 346,25 | 342,17 | 322,08 |
| Tratamento 4 x | 280,16 | 307,25 | 312 | 325 | 317,25 | 321,59 |
| Tratamento 8 x | 112,45 | 141,42 | 159,5 | 156,67 | 159 | 156,33 |

| DIST. da SUPERFÍCIE Voluntário 8 | 10 | 20 | 30 | 50 | 70 | 90 |
|----------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Tratamento 0 | 211,75 | 293,92 | 304,17 | 343,5 | 349,67 | 365,42 |
| Tratamento 2 x | 187,82 | 219,43 | 297,67 | 344,33 | 335,08 | 332,25 |
| Tratamento 4 x | 212,75 | 299,5 | 319,17 | 337,5 | 344,08 | 343,67 |
| Tratamento 8 x | 45,98 | 52,44 | 49,04 | 54,59 | 56,85 | 60,42 |

Tabela IX - Médias da análise de dureza do esmalte dental de acordo com os diferentes tratamentos (0 a 8X) frequência de sacarose/dia nas diferentes profundidades em relação à superfície do esmalte.

| DIST. da SUPERFÍCIE Voluntário 11 | 10 | 20 | 30 | 50 | 70 | 90 |
|--------------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Tratamento 0 | 276,25 | 346,42 | 360,83 | 362,5 | 365 | 361,91 |
| Tratamento 2 x | 159,43 | 255,08 | 268,5 | 299,91 | 295,59 | 297,17 |
| Tratamento 4 x | 77,94 | 142,07 | 243,92 | 275,75 | 281,84 | 289,75 |
| Tratamento 8 x | 80,89 | 126,85 | 113,76 | 154,98 | 177,98 | 224,67 |

| DIST. da SUPERFÍCIE Voluntário 12 | 10 | 20 | 30 | 50 | 70 | 90 |
|--------------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Tratamento 0 | 209,75 | 303,34 | 346,5 | 365,92 | 363,25 | 365,5 |
| Tratamento 2 x | 236,42 | 280 | 292,16 | 328,33 | 340 | 363,83 |
| Tratamento 4 x | 179,17 | 235,25 | 287,67 | 308,92 | 323,5 | 316,83 |
| Tratamento 8 x | 147,58 | 263,33 | 324 | 326,58 | 345,44 | 315,89 |

Tabela X - Médias e desvios padrões da média de dureza do esmalte na distância de 10 μm .

| Grupos | Indivíduos | Etapa 1 | Etapa 2 | Etapa 3 | Etapa 4 |
|--------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 1 | 1 | T4 297,59 | T3 240,22 | T2 295,00 | T1 291,41 |
| | 2 | T4 077,18 | T3 231,00 | T2 330,66 | T1 320,25 |
| | 3 | T4 139,06 | T3 212,42 | T2 201,17 | T1 277,67 |
| | 4 | T3 150,46 | T2 193,67 | T1 237,50 | T4 000,00 |
| 2 | 5 | T3 102,38 | T2 171,58 | T1 311,25 | T4 058,99 |
| | 7 | T2 189,42 | T1 112,40 | T4 112,45 | T3 280,16 |
| | 8 | T2 187,82 | T1 211,75 | T4 045,98 | T3 212,75 |
| 3 | 11 | T1 276,25 | T4 080,89 | T3 077,94 | T2 159,43 |
| | 12 | T1 209,75 | T4 147,58 | T3 179,17 | T2 236,42 |

A análise de variância para os dados da Tabela X, apresentaram significancia estatística para efeito de tratamento e efeito de grupos ($p < 0,05$). As comparações de médias estão apresentados na Tabela II.

Tabela XI - Médias e desvios padrões da média de dureza do esmalte na distância de 20 μm .

| Grupos | Indivíduos | Etapa 1 | Etapa 2 | Etapa 3 | Etapa 4 |
|--------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 1 | 1 | T4 357,92 | T3 254,45 | T2 292,33 | T1 254,16 |
| | 2 | T4 000,00 | T3 277,58 | T2 332,33 | T1 326,50 |
| | 3 | T4 247,67 | T3 291,33 | T2 304,34 | T1 349,17 |
| | 4 | T3 150,02 | T2 263,17 | T1 268,17 | T4 000,00 |
| 2 | 5 | T3 150,03 | T2 267,75 | T1 330,92 | T4 088,07 |
| | 7 | T2 287,08 | T1 209,25 | T4 141,42 | T3 307,25 |
| | 8 | T2 219,43 | T1 293,92 | T4 052,44 | T3 299,50 |
| 3 | 11 | T1 346,42 | T4 126,85 | T3 142,07 | T2 255,08 |
| | 12 | T1 303,42 | T4 126,85 | T3 142,07 | T2 255,08 |

A análise de variância para os dados da Tabela XI, apresentaram significancia estatística para efeito de tratamento e efeito de grupos ($p < 0,05$). As comparações de médias estão apresentados na Tabela II.

Tabela XII - Médias e desvios padrões da média de dureza do esmalte na distância de 30 μm .

| Grupos | Indivíduos | Etapa 1 | Etapa 2 | Etapa 3 | Etapa 4 |
|--------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 1 | 1 | T4 366,50 | T3 274,89 | T2 320,33 | T1 304,74 |
| | 2 | T4 000,00 | T3 322,75 | T2 348,83 | T1 338,50 |
| | 3 | T4 262,63 | T3 358,17 | T2 339,75 | T1 365,75 |
| | 4 | T3 192,25 | T2 303,25 | T1 287,42 | T4 107,77 |
| 2 | 5 | T3 192,82 | T2 302,09 | T1 359,84 | T4 043,17 |
| | 7 | T2 313,50 | T1 286,08 | T4 159,50 | T3 312,00 |
| | 8 | T2 297,67 | T1 304,17 | T4 049,04 | T3 319,17 |
| | 11 | T1 360,83 | T4 113,76 | T3 243,92 | T2 268,50 |
| 3 | 12 | T1 346,50 | T4 324,00 | T3 287,67 | T2 292,16 |

A análise de variância para os dados da Tabela XII, apresentaram significancia estatística para efeito de tratamento e efeito de grupos ($p < 0,05$). As comparações de médias estão apresentados na Tabela II.

Tabela XIII - Médias e desvios padrões da média de dureza do esmalte na distância de 50 μm .

| Grupos | Indivíduos | Etapa 1 | Etapa 2 | Etapa 3 | Etapa 4 |
|--------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 1 | 1 | T4 368,00 | T3 352,66 | T2 351,42 | T1 328,50 |
| | 2 | T4 298,67 | T3 360,34 | T2 387,75 | T1 363,33 |
| | 3 | T4 321,58 | T3 388,58 | T2 376,50 | T1 368,83 |
| | 4 | T3 276,84 | T2 338,50 | T1 352,09 | T4 202,56 |
| 2 | 5 | T3 320,66 | T2 358,59 | T1 362,25 | T4 092,68 |
| | 7 | T2 346,25 | T1 318,25 | T4 156,67 | T3 325,00 |
| | 8 | T2 344,33 | T1 343,50 | T4 054,59 | T3 337,50 |
| | 11 | T1 362,50 | T4 154,98 | T3 275,75 | T2 299,91 |
| 3 | 12 | T1 365,92 | T4 326,58 | T3 308,92 | T2 328,33 |

A análise de variância para os dados da Tabela XIII, apresentaram significancia estatística para efeito de tratamento e efeito de grupos ($p < 0,05$). As comparações de médias estão apresentados na Tabela II.

Tabela XIV - Médias e desvios padrões da média de dureza do esmalte na distância de 70 μm .

| Grupos | Indivíduos | Etapa 1 | Etapa 2 | Etapa 3 | Etapa 4 |
|--------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 1 | 1 | T4 368,50 | T3 368,67 | T2 354,16 | T1 335,75 |
| | 2 | T4 327,67 | T3 378,25 | T2 380,83 | T1 389,34 |
| | 3 | T4 343,08 | T3 385,25 | T2 370,00 | T1 366,42 |
| 2 | 4 | T3 306,92 | T2 346,08 | T1 367,34 | T4 304,89 |
| | 5 | T3 258,68 | T2 363,50 | T1 360,42 | T4 166,79 |
| | 7 | T2 342,17 | T1 335,00 | T4 159,00 | T3 317,25 |
| 3 | 8 | T2 335,08 | T1 349,67 | T4 056,85 | T3 344,08 |
| | 11 | T1 365,00 | T4 177,98 | T3 281,84 | T2 295,59 |
| | 12 | T1 363,25 | T4 345,44 | T3 323,50 | T2 340,00 |

A análise de variância para os dados da Tabela XIV, apresentaram significancia estatística para efeito de tratamento e efeito de grupos ($p < 0,05$). As comparações de médias estão apresentados na Tabela II.

Tabela XV - Médias e desvios padrões da média de dureza do esmalte na distância de 90 μm .

| Grupos | Indivíduos | Etapa 1 | Etapa 2 | Etapa 3 | Etapa 4 |
|--------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 1 | 1 | T4 372,33 | T3 385,89 | T2 372,31 | T1 352,50 |
| | 2 | T4 319,00 | T3 375,58 | T2 370,00 | T1 370,50 |
| | 3 | T4 335,08 | T3 386,34 | T2 366,08 | T1 372,92 |
| | 4 | T3 325,33 | T2 341,00 | T1 351,41 | T4 338,11 |
| 2 | 5 | T3 327,25 | T2 359,42 | T1 361,42 | T4 278,79 |
| | 7 | T2 322,08 | T1 321,25 | T4 156,33 | T3 321,59 |
| | 8 | T2 332,25 | T1 365,42 | T4 060,44 | T3 343,67 |
| 3 | 11 | T1 361,91 | T4 224,67 | T3 289,75 | T2 297,17 |
| | 12 | T1 365,50 | T4 315,89 | T3 316,83 | T2 363,83 |

A análise de variância para os dados da Tabela XV, apresentaram significancia estatística para efeito de tratamento e efeito de grupos ($p < 0,05$). As comparações de médias estão apresentados na Tabela II.

Tabela XVI - Médias e desvios padrões da média de dureza do esmalte na área total.

| Grupos | Indivíduos | Etapa 1 | Etapa 2 | Etapa 3 | Etapa 4 |
|--------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 1 | 1 | T4 29017,95 | T3 2615,45 | T2 2703,15 | T1 25379,75 |
| | 2 | T4 16102,70 | T3 27299,65 | T2 29275,65 | T1 28702,15 |
| | 3 | T4 23755,45 | T3 2868,95 | T2 27736,30 | T1 28800,50 |
| 2 | 4 | T3 20073,75 | T2 25250,40 | T1 26083,20 | T4 10325,87 |
| | 5 | T3 1976,80 | T2 26102,75 | T1 28330,65 | T4 9800,50 |
| | 7 | T2 22210,85 | T1 2322,20 | T4 12245,65 | T3 25214,20 |
| | 8 | T2 24509,15 | T1 26078,10 | T4 4322,90 | T3 25914,60 |
| 3 | 11 | T1 28427,00 | T4 12585,25 | T3 19518,50 | T2 22257,15 |
| | 12 | T1 27518,05 | T4 24830,50 | T3 23380,10 | T2 23309,40 |

A análise de variância para os dados da Tabela acima indicam significância estatística apenas para efeito dos tratamentos ($p < 0,05$). Os resultados das comparações de médias estão apresentados na Tabela XVI.

SUMMARY

11. SUMMARY

The quantitative relationship among frequency of sucrose intake, dental caries and *S. mutans* counts are not well established. Therefore, it was performed an *in situ* study utilizing an experimental design of the crossover type (4x4) in four phases of 28 days. Twelve volunteers using intra-oral palatal appliances, containing 4 blocks of human dental enamel (3x3 mm) participated in this research. The volunteers dropped on the dental blocks, 20% sucrose solution in a frequency from 0 (zero) to 8x/day. The dental blocks were protected by a plastic cover and the volunteers used for their bucal hygiene, non fluoridated dentifrice, but the water consumed by them was fluoridated (0.70 ppm). After each phase, the dental plaque formed on the blocks was collected, weighed, homogenized and assessed for *S. mutans* count (CFU/mg) using selective media. The dental blocks were clean, embedded, cut and polished to the Knoop hardness determination (KHN) of the enamel. It was done indentations at 10 μ m of the surface using SHIMADZU H 2000 microhardness tester and 25 g load for 30 sec. The microbiological results in average \pm standard deviation of the media of CFU/mg were, respectively in relation to the sucrose exposure of 0 (zero), 2, 4, 8x/day: $26.72 \pm 13.36A$; $46.72 \pm 30.81A$; $102.44 \pm 53.34A$ and $52.18 \pm 21.48A$. The media followed by the same letter are not statistically different at the 5% level. In the enamel hardness test, significative differences ($p < 0.05$) in relation to the total area only were observed when the sucrose exposure was 8x/day, similar results were obtained when we assessed at each distance the dental surface. We can conclude that mineral loss only was significative when the sucrose exposure was 8x/day, although there was not a relationship to the *S. mutans* counts.

Key words:

- Sucrose
- Dental caries
- Dental plaque

**REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS**

12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

1. AZEVEDO, R.V.P. **O emprego da bacteriocinotipagem (mutacinotipagem) no rastreamento epidemiológico de estreptococos do "grupo mutans"**. Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Estadual de São Paulo, 1988. 110p.
2. BEIGHTON, D., HAYDAY, H., WALKER, J. The relationship between the number of bacterium *Streptococcus mutans* at discrete sites on the dentition of macaque monkeys (*Macaca fascicularis*) and subsequent development of dental caries. **Archs oral Biol.**, Oxford, v.30, n.1, p.85-88, Jan. 1985.
3. _____, RIPPON, H.R., THOMAS, H.E.C. The distribution of *Streptococcus mutans* serotypes and dental caries in a group of 5-8 year old Hampshire schoolchildren. **Br. dent. J.**, London, v.162, n.3, p.103-112, Feb. 1987.
4. BENDER, G.R., SUTTON, S.V.W., MARQUIS, R.E. Acid tolerance proton permeabilities and membranes ATPase of oral Streptococci. **Infect. Immun.**, Washington, v.53, p.331-338, 1986.
5. BENELLI, E.M. et al. An *in situ* study of glass ionomer cement anticariogenic potencial. **Caries Res.**, Basel, v.27, n.4, p.280-284, July/Aug. 1993.

¹De acordo com a NBR 6023 da Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT de 1989. Abreviatura dos Periódicos conforme o WORD LIST OF SCIENTIFIC PERIODICALS

6. BENTLEY, C., CRAWFORD, J.G., BRODERIUS, C.A. Analytical and physiological variability of salivary microbial counts. **J. dent. Res.**, Washington, v.67, n.11, p.1409-13, Nov. 1988.
7. BORDEN, L.W., OSTRON, C.A., KOULOURIDES, T. Establishment of potentially cariogenic *Streptococci* in a experimental human plaque I: *Streptococcus mutans*. **J. dent. Res.**, Washington, v.59, n.3, p.588-593, Mar. 1980.
8. BOYAR, R.M., BOWDEN, G.H. The microflora associated with ht progrssion of incipient carious lesions in teeth of children living a water-fluoridated area. **Caries Res.**, Basel, v.19, n.4, p.298-306, July/Aug. 1985.
9. BRECK, M., THEILADE, J., ATTSTRÖM, R. Ultrastrutural estimation of the effect of sucrose and glucose rinses on early dental plaque formed on plastic films. **Scand. J. dent. Res.**, Copenhagen, v.89, n.2, p.157-164, Apr. 1981.
10. BRUDEVOLD, F. et al. Development of a new intraoral demineralization test. **Caries Res.**, Basel, v.18, n.5, p. 421-429, Sept./Oct. 1984.
11. BURT, B.A. et al. Stability of *Streptococcus mutans* and its relationship to caries in child population over 2 years. **Caries Res.**, Basel, v.17, n.6, p.532-542, Nov./Dec. 1983.
12. CARLSSON, J. Microbiol aspects of frequent intake of products with high sugar concentrations. **Scand. J. dent. Res.**, Copenhagen, v.97, n.2, p.110-114, Apr. 1989.

13. CARLSSON, J. Presence of various types of non-haemolytic streptococci in dental plaque and in other sites of the oral cavity in man. **Odont. Revy.**, Mälmo, v.18, p.55-74, 1967.
14. _____, EGELBERG, J. Effect of diet on early plaque formation in man. **Odont. Revy.**, Mälmo, v.16, p.112-125, 1965.
15. _____, SUNDSTROM, B. Variations in composition of early dental plaque following ingestion of sucrose and glucose. **Odont. Revy.**, Mälmo, v.19, n.2, p.161-169, 1968.
16. CARLSSON, P. Distribution of mutans streptococci in population with different levels of sugar consumption. **Scand. J. dent. Res.**, Copenhagen, v.97, n.2, p.120-125, Apr. 1989.
17. _____, OLSSON, B., BRATTHALL, D. The relationship between the bacterium *Streptococcus mutans* in the saliva and dental caries in children in Mozambique. **Archs oral Biol.**, Oxford, v.30, n.3, p.265-268, Mar. 1985.
18. COYKENDALL, A.L., LIZOTTE, P.A. *Streptococcus mutans* isolated identified by bioquimical tests and DNA bases contents. **Archs oral Biol.**, Oxford, v.23, n.5, p.427-428, May, 1978.
19. CRITCHLEY, P. et al. The polymerization of dietary sugar by sugars by dental plaque. **Caries Res.**, Basel, v.1, p.112-129, 1967.

20. DAVEY, A.L., ROGERS, A.H. Multiple types of the bacterium *Streptococcus mutans* in the human mouth and their intra-family transmission. **Archs oral Biol.**, Oxford, v.29, n.6, p.453-460, July, 1984.
21. DAWES, C., DIBDIN, G.H. Theoretical analysis of the effects of plaque thickness and initial salivary sucrose concentration on diffusion of sucrose into dental plaque and its conversion to acid during salivary clearance. **J. dent. Res.**, Washington, v.65, n.2, p.89-94, Feb. 1986.
22. DENEPITIYA, L., KLEINBERG, I. A comparison of the acid-base and aciduric properties of various serotypes of the bacterium *Streptococcus mutans* associated with dental plaque. **Archs oral Biol.**, Oxford, v.29, n.5, p.385-393, May, 1984.
23. _____, SCHIÖTT, C.R. *Streptococcus mutans* like bacteria from human dental plaque in a Srilanka (Ceylon) population. **Scand. J. dent. Res.**, Oslo, v.88, n.1, p.40-45, Feb. 1980.
24. DENNIS, D.A. et al. Variations in microbiol and biochemical component of four-day plaque during a four-week controlled diet period. **J. dent. Res.**, Washington, v.54, n.4, p.716-723, July/Aug. 1975.
25. DE STOPPELAAR, J.D., VAN HOUTE, J., DE MOOR, C.E. The presence of dextran-forming bacteria, resembling *Streptococcus bovis* and *Streptococcus sanguis*, in human dental plaque. **Archs oral Biol.**, Oxford, v.12, n.10, p.1199-1201, Oct. 1967.

26. DE STOPPELAAR, J.D., VAN HOUTE, J., DIRKS, O.B. The effect of carbohydrate restriction on the presence of *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis* and iodophilic polysaccharides-producing bacteria in human dental plaque. **Caries Res.**, Basel, v.4, n. , p.114-123, 1970.
27. _____, _____, _____. The relationship between extracellular polysaccharide-producing *Streptococci* and smooth surface caries in 13 year-old children. **Caries Res.**, Basel, v.3, n.12, p.190-200, ,1969.
28. DIBDIN, G.H., SHELLIS, R.P. Physical and biochemical studies of *Streptococcus mutans* sediments suggest new factors linking the cariogenicity of plaque with its extracellular polysaccharide content. **J. dent. Res.**, Washington, v.67, n.6, p. 890-895, June, 1988.
29. DONOGHUE, H.D., NEWMAN, H.N. Effect of glucose and sucrose on survival in batch culture of *Streptococcus mutans* C67-1 and a noncariogenic mutant C67-25, **Infect Immun.**, Washington, v.13, p.16-21, 1976.
30. EMILSON, C.G., THORSELIUS, I. Prevalence of mutans streptococci and *Lactobacilli* in elderly Swedish individuals. **Scand. J. dent. Res.**, Copenhagen, v.96, n.1, p.14-21, Feb. 1988.
31. FEATHERSTONE, J.D.B., ZERO, D.T. An *in situ* model for simultaneous of demineralization and enhancement of remineralization. **J. dent. Res.**, Washington, v.71, p.804-810, Apr. 1992. [Special Issue]

32. FOLKE, L.E.A. et al. Effect of dietary sucrose on quantity and quality of plaque. **Scand. J. dent. Res.**, Oslo, v.80, p.529-533, 1972.
33. FRY, A.J., GRENBY, T.H. The effect of reduced sucrose intake on the formation and composition of dental plaque in a group of men in the Antarctic. **Archs oral Biol.**, Oxford, v.17, n.5, p.873-882, May, 1972.
34. FU, J. et al. Effect of plaque thickness on glucose retention and acid productions. **J. dent. Res.**, Washington, v.70, 1991 [Abstract 1815].
35. GAWRONSKI, T.H. et al. Effect of dietary sucrose levels on extracellular polyssaccharide metabolism of human dental. **J. dent. Res.**, Washington, v.54, n.4, p.881-890, July/Aug. 1975.
36. GEDDES, D.A.M. et al. The effect of frequent sucrose mouthrinsing on the induction *in vivo* of caries-like changes in human dental enamel. **Archs oral Biol.**, Oxford, v.23, n.8, p.663-665, Aug. 1978.
37. GIBBONS, R.J., VAN HOUTE, J. On the formation of dental plaques. **J. Periodont.**, Chicago, v.44, n.6, p.347-360, June, 1973.
38. GIBBONS, R.J. et al. Interdental localization of *Streptococcus mutans* as related to dental caries experience. **Infect. Immun.**, Washington, v.9, p.481-488, 1974.
39. GUGGENHEIM, B. Extracellular polysaccharides and microbial plaque. **Int. dent. J.**, Bristol, v.20, n.4, p.657-678, Nov. 1970.

40. GUSTAFSON, B.E. et al. The Vipeholm dental caries study: The effect of different levels of carbohydrates intake on caries activity in 436 individuals observed for five years. *Acta odont. scand.*, Oslo, v.11, n. , p.232-364, , 1954.
41. HAMADA, S., SLADE, H. Biology immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol. Rev.*, Washington, v.44, n.2, p.331-384, June, 1980.
42. _____, TORII, M. Effect of sucrose in culture media on the location of glucosyltransferase of *Streptococcus mutans* and cell adherence to glass surfaces. *Infect. Immun.*, Washington, v.20, n.3, p.592-599, June, 1978.
43. HEFTI, A., SCHIMID, R. Effect on caries incidence in rats of increasing dietary sucrose levels. *Caries Res.*, Basel, v.13, n.5, p.298-300, Sept. 1979.
44. HUXLEY, H.G. The effect of the dietary carbohydrate upon colonization of plaque by *Streptococcus mutans* in rats. *Archs oral Biol.*, Oxford, v.19, n.10, p.941-946, Oct. 1974.
45. IKEDA, T., SANDHAM, H.J., BRADLEY, E.L. Changes in *S. mutans* and *Lactobacilli* in plaque in relation to the initiation of dental caries in negro children. *Archs oral Biol.*, Oxford, v.18, n.4, p.555-566, Apr. 1973.

46. _____, et al. Virulence of *Streptococcus mutans*: comparison of the effects of a coupling sugar and activities and cariogenicity. **Infect. Immun.**, Washington, v.19, n.2, p.477-480, Feb. 1978.
47. JAY, P. The reduction of oral *Lactobacillus* counts by the periodic restriction of carbohydrate. **Am. J. Orthod.**, St. Louis, v.33, p.162, 1947.
48. JENKINS, G.N. **Pellicle, plaque and calculus. The physiology and biochemistry of the mouth.** 4 ed. Oxford: Blackwell, 1978. p.360-413. APUD BOWEN, W.H., TABAK, L.A.A. **Cariologia para Década de 90.** Ed. Santos, 1995.
49. _____. Salivary effect on plaque pH. In: *Saliva and dental caries.* p.307-322, 1979. New York. APUD BOWEN, W.H., TABAK, L.A. **Cariologia para década de 90.** Ed. Santos, 1995.
50. JONES, B., KENWARD, M. **Design and analysis of cross-over trials,** London: Chapman & Hall, 1989. p.340.
51. KEENE, H.J., SHKLAIR, I.L. Relationship of *Streptococcus mutans* carrier status to the development of carious lesions in initially caries free recruits. **J. dent. Res.**, Washington, v. 53, n.5, p.1295, Sept./Oct., 1974.
52. _____. et al. The interrelationships of oral hygiene, dental caries and *Streptococcus mutans*: an examination of 47 first-year dental hygiene students. **Dent. Hyg.**, v.58, p.496-500, 1984.

53. KEYS, P.H., JORDAN, H.V. Factors influencing the initiations, transmission and inhibition of the dental caries. In: HARRIES, R.S., ed. **Mechanisms of hard tissue destruction**. New York: Academic Pr., . p.261-283. APUD BOWEN, W.H., TABAK, L.A. **Cariologia para década de 90**. Ed. Santos, 1995.
54. KILIAN, M., RÖLLA, G. Initial colonization of teeth in monkeys as related to diet. **Infect. Immun.**, Washington, v.14, p.1022-1027, 1976.
55. KLOCK, B., KRASSE, B. Caries status and microbiol conditons in children in 1973 and 1984. **Scand J. Dent. Res.**, Copenhagen, v.95, n. , p.13-17, , 1987.
56. _____, _____. Microbiol and salivary conditions in 9 to 12 year old children. **Scand. J. Dent. Res.**, Copenhagen, v.85, n.1, p.56-63, Jan. 1977.
57. KÖNIG, K.G. Caries activity in induced by frequency- controled feeding of diets containing sucrose or bread to Osborne-Mendel rats. **Archs. oral Biol.**, Oxford, v.14, n.8, p.991-993. Aug. 1969.
58. KRASSE, B. et al. Implation of caries-inducing streptococci in the human oral cavity. **Archs oral Biol.**, Oxford, v.12, n.2, p.231-236, Feb. 1967.
59. KRISTOFFERSSON, K., BIRKHED, D. Effects of partial sugar restriction for 6 weeks on numbers of *Streptococcus mutans* in saliva and interdental plaque in man. **Caries Res.**, Basel, v.21, n.1, p.79-86, Jan./Feb. 1987.

60. KURAMITSU, H.K. Recent advances in defining the cariogenicity of mutans *streptococci*: molecular genetic approaches. **Eur. J. Epidemiol.**, v.3, p.257-260, 1987. APUD BOWEN, W.H., TABAK, L.A. **Cariologia para década de 90**. Ed. Santos, 1995.
61. LANG, N.P. et al. Longitudinal clinical and microbiological study on the relationship between infection with *Streptococcus mutans* and the development of caries in humans. **Oral Microbiol. Immunol.**, v.2, p.39-47, ,1987.
62. LINGSTRÖN, P. et al. Effect of frequent consumption of starchy food items on enamel and dentin demineralization and on plaque pH in situ. **J. dent. Res.**, Washington, v.73, n.3, p.652-660, Mar. 1994.
63. LITTLETON, N.W., McCABE, R.M., CARTER, C.H. Studies of oral health in persons nourished by stomach tube. II. Acidogenic properties and selected bacterial components of plaque material. **Archs oral Biol.**, Oxford, v.12, n.5, p.601-609, May, 1967.
64. LOESCHE, W.J. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. **Microbiol. Rev.**, Washington, v.50, n.4, p.353-380, Dec. 1986.
65. _____. et al. Association of *S. mutans* with human dental decay. **Infect. Immun.**, Washington, v.11, n.6, p.1252-1260, June, 1975.

66. _____ et al. Longitudinal investigation of bacteriology of human fissure decay: epidemiology studies in molars shortly after eruption. **Infect. Immun.**, Washington, v.46, n.3, p.765-772, , 1984.
67. Mc DOUGALL, W.A. Studies on the dental plaque. IV. Levans and the dental plaque. **Aust. dent. J.**, Saint Leonards, v.9, n.1, p.1-5, Feb. 1964.
68. Mc NEE, S.G. et al. Effect of extracelular polysaccharides on diffusion of NaF and [¹⁴C] - sucrose in human dental plaque and in sediments of the bacterium *Streptococcus sanguis* 804. NCTC. **Archs oral Biol.**, Oxford, v.27, n.11, p.981-986, Nov. 1982.
69. MACPHERSON, L.M.D., MACFARLANE, T.W., STEPHEN, K.W. An intra oral appliance study of the plaque microflora associated with early enamel demineralization. **J. dent. Res.**, Washington, v.69, n.11, p.1712-1716, Nov. 1990.
70. _____ et al. The effect of sucrose application and implantation of mutans *Streptococci* on the microbiol composition of three-week experimental plaque - An *in situ* study. **J. dent. Res.**, Washington, v.69, n.11, p.1706-1711, Nov. 1990.
71. MANDEL, I.D. Relation of saliva and plaque to caries. **J. dent. Res.**, Washington, v.53, n.2, p.246-266, 1974. [abstract, 2].
72. MARSH, P.D. Host defense and microbiol homeostasis: Role of microbiol interactions. **J. dent Res.**, Washington, v. 68, p. 1567-1575, Nov. 1989. [Special Issue]

73. MICHALEK, S.M. et al. Low sucrose levels promote extensive *Streptococcus mutans* induced dental caries. **Infect. Immun.**, Washington, v.16, n.2, p.712-714, May, 1977.
74. MINAH, G.E., LOESCHE, W.J. Sucrose metabolism by prominent members of the flora isolated from cariogenic and non-cariogenic dental plaques. **Infect. Immun.**, Washington, v.17, n.1, p.55-61, July, 1977.
75. _____, SOLOMON, E.S., CHU, K. The association between dietary sucrose consumption and microbial populations shifts at six oral sites in man. **Archs oral Biol.**, Oxford, v.30, n.5, p.397-401, May, 1985.
76. MIRANDA, V.C. **Verificação de estreptococos em placa dental, sulco gengival e língua de crianças com dentição mista e permanente suas relações com o índice de cárie e flúor.** Tese (Livre-Docência) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas Araraquara, Universidade Estadual Paulista, 1977. 122p.
77. MÜHLEMANN, H.R. Radiotelemetry of the pH of interdental areas exposed to various carbohydrates. In: MCHUGH, W.D., ed. **Dental Plaque.** Edinburg: Livingstone, 1970. p.179-186.
78. NEWBRUN, E. **Cariology**, Chicago: Quintessence, 1989, p.115-120.

79. REBELO, M.A.B. *Estudo in situ da composição bioquímica da placa dental em função da frequência diária do uso de sacarose.* Tese (Mestrado em Bioquímica) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba. Universidade Estadual de Campinas, 1994. 103p.
80. RÖLLA, G., SCHEIE, A.A., CIARDI, J.E. Role of sucrose in plaque formation. *Scand. J. dent. Res.*, Copenhagen, v.93, n.2, p.105-111, 1985.
81. RÖLLA, G., et al. High amounts of lipoteichoic acid in sucrose-induced plaque *in vivo*. *Caries Res.*, Basel, v.14, n.4, p.235-238, July/Aug. 1980.
82. RUGG-GUNN, A.J. Diet and dental caries. In: MURRAY, J.J., ed. *The prevention of dental disease.* Oxford: Oxford Medical Publ., 1983, p.3-82.
83. SCHEIE, A.A. et al. Microbiol composition, pH-depressing capacity and acidogenicity of 3-week smooth surface plaque developed on sucrose - regulated diets man. *Caries Res.*, Basel, v.18, n.1, p.74-86, Jan/Feb. 1984.
84. SGAN-COHEN, H.D. et al. The effect of previous diet on plaque pH response to different food. *J. dent. Res.*, Washington, v.67, n.11, p.1434-1437, Nov. 1988.
85. SKINNER, A., CONNOLLY, P., NAYLOR, M.N. The influence os the replacement of dietary by maltose on the formation and biochemistry of human dental plaque. *Archs oral Biol.*, Oxford, v.27, n.7, p.603-8, July, 1982.

86. SREEBNY, L.M. The sugar-caries axis. *Int. dent. J.*, Bristol, v.32, n.1, p.1-12, Mar. 1982.
87. STAAT, R.H. et al. Effects of dietary sucrose levels on the quantity and microbiol composition of human dental plaque. *J. dent. Res.*, Washington, v.54, n.4, p.872-880, July/Aug. 1975.
88. STEPHAN, R.M. Intra-oral hydrogen-ion concentrations associated with dental caries activity. *J. dent. Res.*, Washington, v.23, n.4, p.257-266, Aug. 1944.
89. THEILADE, E., BUDTZ-JÖRGENSEN, E., THEILADE, J. Predominant cultivable microflora of plaque on removable dentures in patients with healthy oral mucosa. *Archs oral Biol.*, Oxford, v.28, n.8, p.675-680, August, 1983.
90. TORRES, S.A. **Avaliação do ágar SB20 e MSB na contagem de Estreptococos do Grupo mutans na saliva e na placa dental de adolescente.** Tese (Doutorado em Odontopediatria) - Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", 1990. 123p.

91. VAN DER HOEVEN, J.S. et al. **The interaction of *Actinomyces viscosus* with oral streptococci in plaque of gnotobiotic rats. Ecological significance of antibacterial activity in plaque.** Thesis (Phylosophy Doctor) - Univeristy of Nymegen, 1974. p.18. APUD BOWEN, W.H., TABAK, L.A. **Cariologia para década de 90.** Ed. Santos, 1995.
92. VAN HOUTE, J. Bacterial specificity in the etiology of dental caries. **Int. dent. J.**, Bristol, v. , n.30, p.305-326, 1980.
93. _____, AASENDEN, R. & PEEBLES, T.C. Oral colonization of *Streptococcus mutans* in human subjects with low caries experience given fluoride supplements from birth. **Archs oral Biol.**, Oxford, v.23, n.5, p.361-366, May, 1978.
94. VAN HOUTE, J., RUSSO, J. Factors influencing the cariogenicity of *Streptococcus mutans*. In: HAMADA, S. et al., ed. **Molecular microbiology and immunobiology of *Streptococcus mutans*.** Amsterdam: Elsevier, 1986. p. 157-169.
95. _____, _____, PROSTAK, K.S. Increased pH lowering ability of *Streptococcus mutans* cells masses associated with extracelular glucan - rich matrix material and the mechanism involved. **J. dent. Res.**, Washington, v.68, n.3, p.451-459, Mar. 1989.

96. VAN PALENSTEIN-HELDERMAN, W.H., IJSSELDIJK, M., HUIS IN'T VELD, J.H.J. A selective medium for the two major subgroups of the bacterium *Streptococcus mutans* isolated from human dental plaque and saliva. **Archs oral Biol.**, Oxford, v.28, n.7, p.599-603, July, 1983.
97. VON DER FEHR, F., LÖE, H., THEILADE, E. Experimental caries in man. **Caries Res.**, v.4, p.131-148, 1970.
98. WENNERHOLM, K., BIRKHED, D., EMILSON, C.G. Effects of sugar restriction on *Streptococcus sobrinus* in saliva and dental plaque. **Caries Res.**, Basel, v.29, n.1, p.54-61, Jan./Feb. 1995.
99. ZERO, D.T., ANNE, K.M., FU, J. Adaptative response of *S. mutans* to growth at low pH. **J. dent. Res.**, Washington, v.70, p.493, Apr. 1991. [Abstract, 1814]
100. ZERO, D.T., VAN HOUTE, J., RUSSO, J. The intra-oral effect on enamel demineralization of extracelular matrix material synthesized from sucrose by *Streptococcus mutans*. **J. dent. Res.**, Washington, v.65, n.6, 918-923, 1986.
101. _____ et al. An improved intra-oral enamel demineralization test model for the study of dental caries. **J. dent. Res.**, Washington, v.71, n.10, p.871-878, Oct. 1992.
102. _____ et al. Effect of growth at low pH on virulence of *S. mutans*. **J. dent. Res.**, Wahington, v.69, p.318, Mar. 1990. [Abstract 1680].