

MARIA AUGUSTA BESSA REBELO

ESTUDO *in situ* DA COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DA PLACA DENTAL EM
FUNÇÃO DA FREQUÊNCIA DIÁRIA DO USO DE SACAROSE

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

PIRACICABA - SP

1994

R241e

17490/BC

Este trabalho foi
brevemente corrigido conforme
requisito CCPG 036/83
15/06/94
Jaime

MARIA AUGUSTA BESSA REBELO

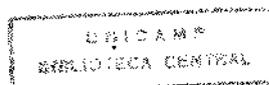
ESTUDO *in situ* DA COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DA PLACA DENTAL EM
FUNÇÃO DA FREQUÊNCIA DIÁRIA DO USO DE SACAROSE

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

Orientador Prof. Dr. JAIME APARECIDO CURY

PIRACICABA - SP

1994



À DEUS, por estar sempre presente.

À meus pais, Carmen e José Jorge
Rebello e meus irmãos Eber, Ney,
Fernanda, Luiza, Rosana, Elaine,
Janete e Paula, pelo amor , carinho
e exemplo de lutar por ideais
verdadeiros e viver dignamente.

Ao Piccinini,
pela grande prova de amor.

dedico este trabalho

Ao Prof. JAIME APARECIDO CURY, pela orientação segura e precisa durante a realização deste trabalho bem como pelo incentivo à minha formação científica, meu reconhecimento, gratidão e respeito.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Amazonas, pela oportunidade de realização deste curso.

Aos colegas do Departamento de Estomatologia da Faculdade de Ciências da Saúde - UFAM, pelo apoio recebido.

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

Aos Profs. Dr. Mathias Vitti e José Francisco Höfling ex-coordenador e coordenador do curso de Pós-Graduação em Biologia e Patologia Buco-Dental pela atenção dedicada.

Aos técnicos do Laboratório de Bioquímica Oral, FOP-UNICAMP, Mariza de Jesus Carlos Soares e Sr. Waldomiro Vieira Filho, 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. Rosana Cristina Pereira Parente, do Departamento de

Estatística da Universidade Federal do Amazonas pela realização da análise estatística, sobretudo pela amizade, apoio e estímulo com os quais me recebeu.

Aos Profs. LUIS ANDRÉ FREIRE PIMENTA e MÔNICA CAMPOS SERRA pela colaboração com a documentação fotográfica.

Aos Profs. Dr. CELSO PAULINO DA COSTA e Dra. MARINÊS NOBRE DOS SANTOS, da FOP - UNICAMP, pelo apoio e amizade.

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

Ao CENA - USP, na pessoa da Técnica de Nível Superior Iolanda Aparecida Rufini (Tatinha) pela realização das análises de cálcio.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação, especialmente à Cláudia Faria, Elizabeth, Fabiana, Miralva, Rosely, Francisco, Maria Rita e Rosângela Verlengia, pelo saudável convívio.

As alunas de pós-graduação trabalhando no Laboratório de Bioquímica Oral da FOP-UNICAMP, Elaine Benelli, Eliane M. Franco, Helena U. Decico e Silvana Boldrini pelo companheirismo.

À Bibliotecária do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia - INPA, Ana Luíza Belém Rebelo, pela correção das referências bibliográficas.

À técnica de nível superior do Departamento de Diagnóstico Oral Elza M. Thomazini, pela atenção dedicada.

À Sra. Ana Maria Corsa de Arruda Oliveira, secretária geral dos cursos de Pós-Graduação da FOP-UNICAMP, pela atenção recebida.

Aos voluntários participantes deste estudo, Eneida, Rita, Cláudia, Eliane, Helena, Beth, Fabiana, Roberta, Lílian, Maria José e Viviane, pelo exemplo de responsabilidade.

À CILENE MARIA 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.

ÍNDICE

- 1 - INTRODUÇÃO
- 2 - REVISÃO DA LITERATURA
- 3 - PROPOSIÇÃO
- 4 - MATERIAIS E MÉTODOS
 - 4.1 Delineamento Experimental
 - 4.2 Fase Preparatória
 - 4.2.1 Preparação dos Blocos Dentais
 - 4.2.2 Confeccção dos dispositivos intra orais
 - 4.3 Fase Clínica
 - 4.4 Fase Laboratorial
 - 4.4.1 Peso Úmido da Placa Dental
 - 4.4.2 Avaliação Qualitativa de cárie dental
 - 4.4.3 Tratamento da Placa Dental
 - 4.4.4 Dosagem de Flúor na Placa Dental
 - 4.4.5 Dosagem de Fósforo na Placa Dental
 - 4.4.6 Dosagem de Cálcio na Placa Dental
 - 4.4.7 Dosagem de Carboidrato Total Solúvel em Ácido
 - 4.4.8 Dosagem de Carboidrato Total Solúvel em Alkali
 - 4.4.9 Análise de Flúor na Água de Abastecimento Público
 - 4.5 Análise Estatística
- 5 - RESULTADOS

- 6 - DISCUSSÃO
- 7 - CONCLUSÃO
- 8 - RESUMO
- 9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS
- 10 - ANEXOS

1. INTRODUÇÃO

A cárie dental tem uma complexa etiologia multifatorial; hospedeiro, substrato e microbiota interagem durante um certo período de tempo causando desmineralização do esmalte dental e isto ocorre em consequência do desequilíbrio físico-químico entre a sucessão dos fenômenos de desmineralização e remineralização, que ocorrem na interface dente-placa dental quando da ingestão de carboidratos fermentáveis.

A placa dental consiste de um agregado de bactérias imersas em um material amorfo chamado matriz da placa que é constituída de componentes orgânicos e inorgânicos. As células bacterianas compreendem aproximadamente 60 a 70 % do volume da placa enquanto que a matriz compreende o restante. A matriz concede a integridade estrutural da massa bacteriana, e consiste de polímeros sintetizados pelas bactérias, macromoléculas e de outros elementos derivados da saliva e fluido gengival.

Entre os componentes orgânicos, proteínas bacterianas e salivares compreendem aproximadamente metade do peso seco da placa. A matriz da placa em adição à sua alta concentração de proteínas, contém carboidratos e lipídios. Muitos dos carboidratos da matriz consistem de

polímeros (principalmente glucanos e frutanos) sintetizados pelas bactérias a partir de açúcares da dieta, particularmente a sacarose. As células bacterianas também podem conter carboidratos na forma de polissacarídeos intracelulares, tipo glicogênio, que são estocados como grânulos e atuam como um reservatório energético para serem usados durante os períodos de ausência de substratos da dieta.

Com relação aos componentes inorgânicos eles compreendem 5 a 10% do peso seco da placa. A concentração de cálcio e fósforo na placa dental é alta em relação a saliva. Em adição potássio, sódio, magnésio, cobre, ferro e flúor também estão presentes. A maior parte do cálcio na placa está na forma não iônica mas solubilização pode ocorrer quando há queda do pH, assim o cálcio da placa torna-se ionizado e pode ter um papel significativo na determinação de dissolução do esmalte. A concentração de flúor na placa dental (peso úmido) é aproximadamente 5-10 ppm e é maior em comunidades com água fluoretada (NIKIFORUK,1985).

A cariogenicidade da placa dental deve ser função de sua composição tanto orgânica como inorgânica. Assim a presença de polissacarídeos na matriz da placa determina, quando da ingestão de carboidratos fermentáveis, uma queda mais acentuada do pH na interface dente placa (JENKINS, 1978, FU & ZERO, 1991, MARGOLIS & MORENO, 1992). Por outro lado, a concentração de Ca x P x F determina o

grau de saturação do fluido da placa em relação ao produto de solubilidade do esmalte (MARGOLIS *et al* 1988a, MORENO & MARGOLIS 1988, TATEVOSSIAN 1990, MARGOLIS & MORENO,1992), de finindo se haverá ou não desmineralização quando das quedas de pH. (MORENO & MARGOLIS 1988, MARGOLIS *et al* 1988a, TATEVOSSIAN 1990, MARGOLIS & MORENO 1992, MARGOLIS *et al* 1993).

Assim, de acordo com ASHLEY & WILSON (1977) a ingestão de uma dieta rica em açúcar leva um aumento da concentração de carboidratos na placa e diminuição de cálcio e fosfato, o que fatalmente a tornaria mais cariogênica. Entretanto quando se discute o papel da dieta no desenvolvimento de cárie é abordado mais a importância da frequência do consumo de carboidratos entre as refeições, em decorrência do estudo clássico de Vipeholm (GUSTAFSON *et al* 1954). A literatura não tem abordado a importância da frequência em termos de composição da placa dental, particularmente em relação ao importante papel do flúor¹ no desenvolvimento de cárie.

Deste modo o objetivo deste trabalho foi estudar se a frequência da utilização de sacarose induzia à alterações na composição bioquímica da placa dental e consequente desenvolvimento de cárie dental.

¹Flúor - termo genérico para definir as formas iônicas (ion, flúor, fluoreto), ionizável e não ionizável do elemento flúor.

2. REVISÃO DA LITERATURA

GUGGENHEIM em 1970, descreveu uma abrangente revisão considerando diferentes aspectos da formação de polissacarídeos extracelulares em relação à placa dental, conforme exposição a seguir. A primeira evidência direta da ocorrência de polissacarídeos na placa dental foi fornecida por McDOUGALL em 1964. Extratos de amostra de placa precipitados com etanol 70% foram hidrolisados e análises revelaram que frutose era o único componente. O autor concluiu sobre essa base que o polisacarídeo era um levano que correspondia de 0,3 - 2,9% do total do peso seco de 25 amostras individuais. Uma similar investigação foi realizada por CRITCHLEY *et al* (1967), que extraíram amostras de placas com água fria e subsequentemente com hidróxido de sódio 0.5 N. 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 repetido após uma incubação *in vitro* da amostras de placas em sacarose; o material solúvel em água encontrado foi uma mistura de frutano e glucano, enquanto que na fração solúvel em álcali encontrou-se um glu

cano 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 glucosídicas encontradas foram hexopiranosídeo 1-6 e/ou 1-2 e cetofuranosídeo 2-6. Sendo portanto concluído que os polissacarídeos na placa eram dextranos e levanos. En tratanto, os produtos da reação foram somente identificados qualitativamente por cromatografia de papel. O dextrano foi o principal polissacarídeo encontrado na matriz da placa, en quanto que o levano correspondeu apenas 1 a 2 % do total do peso seco. A minúscula quantidade de polissacarídeos extra celulares extraíveis 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 es tudadas. Duas frações de polissacarídeos extracelulares foram isoladas a partir de estreptococos do grupo mutans, e ambos evidenciaram ser glucanos, mas somente uma fração foi solúvel em água (DONOHUE *et al.*, 1966; GUGGENHEIM *et al.*, 1966).

E portanto a partir desta revisão pode-se concluir que uma das características da placa dental é a habilidade para sintetizar substâncias extracelulares. Polissacarídeos extracelulares e glico-proteínas salivares parecem ser os principais constituintes da matriz da placa e são produzidos por determinadas bactérias orais a partir

da sacarose. Os polissacarídeos isolados da placa dental tem sido demonstrado serem glucanos e frutanos. Entretanto estes compostos não são homogêneos do ponto de vista químico ou morfológico, apresentando diferenças na solubilidade. Análises químicas, incluindo alguns trabalhos estruturais, tem sido feitas principalmente sobre frações que eram solúveis em água e sobre o material que foi extraído com soluções alcalinas fracas. A fração de polissacarídeos insolúveis somente foi extraída com alcali forte. Devido suas propriedades químicas e físicas os glucanos insolúveis tem sido considerados como a "peça de resistência" da matriz da placa dental.

ASHLEY em 1971 realizou um estudo cujo objetivo foi relacionar a prevalência de cárie nos dentes superiores posteriores em estudantes com as concentrações de cálcio e fósforo na placa coletada desta região, e avaliar os efeitos do nível de cálcio e fósforo na saliva parotídeana e a ingestão do açúcar na dieta. Após profilaxia e polimento, os estudantes absteram-se da escovação dental por 48 horas. Eles foram indagados sobre sua dieta, em particular atenção à ingestão de açúcar. Após 48 horas, eles mastigaram um doce por 5 minutos, e a placa foi coletada após 30 minutos; isto foi feito para padronizar a última exposição ao açúcar. A divisão de grupos de baixa e alta incidência de cáries foi de acordo com suas superfícies lisas dos dentes posteriores. Os

resultados mostraram que indivíduos com baixo índice de cárie tem significativamente maior nível de cálcio na placa ($p < 0,05$), fósforo inorgânico ($p < 0,001$), e fósforo total ($p < 0,01$) e uma significativamente menor ingestão de açúcar no período de 48 horas ($p < 0,05$).

ASHLEY em 1972, continuando seus estudos investigou os efeitos da saliva parotídeana e açúcar da dieta sobre a placa em 4 regiões dentais (superior anterior, inferior anterior, superior posterior e inferior posterior), e a relação entre as concentrações de cálcio e fósforo da placa e prevalência de cáries nessas regiões. Noventa e nove (99) estudantes participaram do estudo que envolveu coleta de saliva, profilaxia, polimento, e 48 horas de abstenção de escovação dental antes da coleta de placa. Concentrações de Ca e P da saliva parotídeana tiveram correlação positiva, exceto na região anterior. Em contraste, observou-se uma correlação negativa entre a experiência de açúcar durante as 48 horas de acumulação de placa e concentração de cálcio e fósforo na placa, especialmente na região anterior (p de $< 0,001$ a $< 0,05$). Correlações significantes foram encontradas entre placas e cárie na região posterior onde uma relação inversa entre a concentração de fósforo inorgânico e total e CPO de todas as superfícies ($p < 0,001$ e $< 0,01$) foi observada. Esses achados suportam a hipótese que desmineralização do esmalte é significativamente afetada pela concentração de Ca e P da

placa, que por sua vez está relacionada à composição salivar e experiência de açúcar na dieta.

FRY & GRENBY, 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 coletada para análise. Os voluntários abstiveram-se de qualquer procedimento de higiene oral por 3 dias antes da 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. Comparado com a dieta normal, a dieta com redução de sacarose produziu uma placa contendo significativamente mais carboidrato solúvel, mas não houve diferença nos carboidratos totais insolúveis, ou em "levanos" solúveis. Níveis de cálcio solúvel na placa foram similares nos dois regimes, mas a placa com redução de sacarose conteve mais fósforo do que a placa normal.

GIBBONS & VAN HOUTE, 1973, em seus relatos sobre formação de placa dental citam que possivelmente o melhor exemplo de adesão interbacteriana mediada por polímeros bacterianos diz respeito aos Streptococcus 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.

MANDEL,1974, estudou a relação da saliva e placa à cárie dental, e observou 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, 115 g /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.

De acordo com ASHLEY,1975a, os resultados de 3 estudos sobre à placa de crianças e adultos, indicaram que a resposta da placa a uma única exposição de 5 minutos à cubos de açúcar ou doces depende da condição inicial da placa. Assim, significativa diminuição no nível de cálcio e fósforo na placa foi observada nas placas previamente com

restrição de açúcar, mas não na placa sem esta condição.

GAWRONSKI *et al* (1975) realizaram um estudo com o objetivo de avaliar o efeito da sacarose sobre a concentração de polissacarídeo extracelulares. Assim, adultos jovens entre 21 e 24 anos de idade foram examinados por acumulação de placa após 4 dias de abstenção de higiene oral. A placa foi coletada da superfície lingual e vestibular de 28 dentes. Oito indivíduos que acumularam placa em excesso a 40 mg (peso úmido) enquanto ingeriam 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 semelhante 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. Citam ainda VAN HOUTE (1964) que mostrou que a população microbiana capaz de estocar polissacarídeo intracelular aumenta durante uma dieta rica em sacarose.

Prosseguindo seus estudos ASHLEY em 1975 b, realizou uma pesquisa sobre a relação entre os níveis de cálcio e fósforo na placa dental e o CPOS em meninos de 11 a 14 anos que, durante esse estudo, fizeram uso de

dentifricio sem flúor. A coleta de placa foi feita aos 6, 12 e 24 meses, após o exame odontológico inicial, e foi referida como visitas A, B e C respectivamente. Os resultados dessa pesquisa mostraram que todos os coeficientes de correlação entre as concentrações de Ca e P e o CPOS total e o CPOS para superfícies lisas foram negativas nas visitas A, B e C, sendo que foram alcançadas diferenças estatísticas em 10 das 12 combinações nas visitas B e C, mas não na visita A. Foi observado também, ao final de um período de dois anos, que todos os coeficientes de correlação entre os níveis de cálcio e fósforo e a experiência de cárie foram negativas e seguiram um padrão semelhante àqueles já encontrados.

AGUS *et al* ,1976, realizaram uma pesquisa sobre a associação do conteúdo de flúor total de placa com a experiência individual de cárie de 72 escolares com idade de 9 a 13 anos, residentes em Katoomba, Sydney e Yass, que continham, na água de consumo, menos de 0,1 ppmF, 1,0 ppmF 4 anos antes da amostragem e 1,0 ppmF 16 anos antes da amostragem, respectivamente. A média das concentrações de flúor na placa dental dos escolares de Katoomba foi de 13,5 ppm enquanto em Sidney foi obtida uma média de 22,6 ppm e em Yass 25,6 ppm (peso seco). Foi observada uma associação inversa significativa da concentração de flúor total na placa com a experiência individual de cárie para os escolares da cidade de Sydney e também quando analisada toda

a amostra.

Em suas subseqüentes pesquisas ASHLEY & WILSON, 1977a, estudando a relação entre experiência de açúcar da dieta e quantidade e composição bioquímica da placa dental em humanos, obtiveram os seguintes resultados em diferentes situações descritas abaixo:

a) Experimento preliminar: comparação da placa em relação à dietas ricas e livres de açúcar.

Dez voluntários adultos com idade variando entre 19 a 44 anos, dedicaram dois dias para uma dieta experimental durante sucessivas semanas. Após uma profilaxia em cada ocasião, os voluntários abstiveram-se de higiene oral e consumiram uma dieta por eles mesmo selecionada da qual todas as fontes de açúcar da dieta foram eliminadas. Durante o período da dieta rica em açúcar, as bebidas consumidas foram suplementadas com sacarose, entre 10 a 15 ingestões, dependendo do consumo normal de cada voluntário. Durante o período livre de açúcar, uma dieta virtualmente idêntica foi consumida, sendo que com as bebidas não suplementadas. A placa foi coletada de cada voluntário uma hora após o consumo da bebida suplementada ou não com sacarose. Os resultados obtidos mostraram que a dieta rica em açúcar foi associada com uma concentração significativamente menor de cálcio e fósforo inorgânico e significativamente maior concentração de carboidratos totais em relação às dietas livres de açúcar.

b) Placa de dois dias: 15 minutos após exposição de açúcar

Após profilaxia, 99 estudantes abstiveram-se de higiene oral por 2 dias, durante este tempo relacionaram por escrito suas dietas. Cada voluntário então mastigou um doce por 5 minutos; a coleta de placa foi realizada 15 minutos após remoção do doce da boca. Os resultados mostraram que a concentração de fósforo inorgânico e cálcio da placa foram inversamente relacionados ao conteúdo de açúcar da dieta.

c) Placa de dois dias: após uma noite sem alimentação.

Uma ou duas semanas após o experimento (b), 43 daqueles estudantes novamente abstiveram-se de higiene oral por 2 dias, fazendo um relato completo de sua dieta. A placa foi coletada após uma noite em jejum, tendo decorrido um mínimo de 8 horas após ingestão de alimentos ou bebidas.

De acordo com os resultados obtidos, a correlação da composição da placa com a dieta não mostrou relação entre o tempo após a ingestão de açúcar e a composição da placa, exceto uma correlação negativa com carboidratos insolúveis em álcali. Entretanto, existe uma correlação positiva entre concentração de carboidratos da placa, com a exceção dos carboidratos solúveis em álcali, e a quantidade de açúcar na dieta, e em particular ao açúcar total dissolvido ($p < 0,01$). Uma correlação negativa significativa entre açúcar total dissolvido e concentração de cálcio foi observada.

d) Placa desenvolvida: variabilidade do tempo após exposição do açúcar.

Amostras de placa dental foram coletadas de 51 escolares, com idade inicial entre 11-12 anos, em intervalos anuais em um período de 3 anos. Não foram impostas restrições de higiene oral. Uma história retrospectiva da dieta foi obtida 24 horas antes da coleta de placa. Os resultados mostraram que não houve correlação significativa entre concentração de cálcio e fósforo da placa e os parâmetros da dieta. Concentrações de carboidratos totais, solúveis em água e insolúveis em álcali da placa mostraram uma relação inversa no primeiro e segundo ano, e uma relação direta no terceiro ano à ingestão de açúcar.

ASHLEY & WILSON, 1977b, realizaram um estudo longitudinal sobre o incremento de cárie e a composição bioquímica da placa dental, e observaram a existência de uma correlação negativa entre incidência de cárie durante três anos e as concentrações de Ca e P da placa dental coletada no primeiro e no segundo ano após o exame inicial.

Em 1977, RÖLLA & BOWEN sugeriram um mecanismo de concentração de íon flúor na placa dental, em que íons cálcio da saliva são ligados a grupos ácidos fixados na placa e os íons flúor são atraídos para o cálcio ligado, como contra íons através de forças eletrostáticas.

SCHAMSCHULA *et al* em 1977, estudaram as concentrações de cálcio e fósforo em amostras de placa de 72

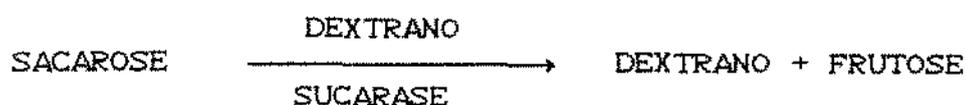
escolares residentes nas cidades de Kattomba, Sydney e Yass, selecionados de acordo com o nível de flúor na água de consumo. Pelos resultados obtidos, os autores não observaram diferenças significativas entre as 3 áreas para as concentrações de Ca e P.

JENKINS & EDGAR em 1977, descreveram que as fontes de flúor na placa dental podem ser os fluidos orais, a dieta, ou o esmalte. Citam ainda, que de acordo com HARDWICK (1970) o esmalte foi considerado ser a mais provável fonte de flúor na placa, sustentado por seus achados que estabelecem uma relação inversa entre peso ou espessura da placa e concentração de flúor.

JENKINS ,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 converte-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 sua 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 a superfície da bactéria. As enzimas utilizam a energia da ligação entre frutose e glicose para sintetizar uma mistura de polímeros, (glucanos, com a maioria das ligações na posição 1 + 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 (o carboidrato total é aproximadamente 15%). (2) Outra enzima (levanosacarase) converte sacarose em levanos - polímeros extracelulares da frutose razoavelmente solúveis, com ligações na posição 2 + 6, mas são formados em uma extensão menor do 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* 1978, observaram que mudanças visuais semelhantes á 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 oral pelos 2 grupos não mostrou diferenças significantes. Embora a concentração de carboidratos no grupo sacarose tenha sido significativamente maior.

Após estudarem a cinética do fosfato inorgânico na placa dental, TATEVOSSIAN & GOULD ,1979, concluíram que o efeito local do aumento de fósforo inorgânico não contribui significativamente para a inibição da produção de ácido e que quando o fósforo inorgânico foi introduzido na placa separadamente e após bochecho com sacarose houve um aumento na sua concentração no fluido da placa, o que poderia exercer um efeito local de curta duração, por ação de massa, sobre a dissolução e remineralização do esmalte.

WYCOFF *et al* ,1980, realizaram um estudo no qual crianças bochecharam duas vezes ao dia com uma solução concentrada de glicerofosfato de cálcio ou uma solução placebo. A placa foi coletada a cada duas semanas durante oito semanas, sendo determinado anteriormente o índice de Silness e Løe. Os resultados indicaram um menor índice de placa e uma maior concentração de fósforo para o grupo experimental em relação ao grupo controle nas 4 semanas de exame.

BREX *et al* em 1981, afirmaram 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.. Este autor cita FOLKE *et al* (1972) que encontraram que a quantidade de sacarose na dieta não influencia a quantidade de placa formada durante um período de 4 dias. Cita ainda que, CARLSSON & EGELBERG ,1965, demonstraram que indivíduos recebendo uma dieta básica livre de carboidratos ou suplementada com glucose a 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. Afirman ainda que, em estudos recentes com culturas, foi observado que bochechos frequentes com soluções concentradas de glucose ou

sacarose, aumentaram o número de bactérias desenvolvidas sobre filmes plásticos aplicados à superfícies dentais durante períodos de alta concentração de carboidratos na cavidade oral. Polissacarídeos extracelulares sintetizados pelos microorganismos da placa a partir da sacarose podem ser importante 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 a partir da sacarose. Polissacarídeos intracelulares são produzidos como granulos de reserva por muitas espécies bacterianas a partir de vários carboidratos tais como glucose, frutose e sacarose. Os resultados desta pesquisa indicam que frequentes bochechos com água, glucose ou sacarose não tem influência detectável 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.

GAUGLER & BRUTON (1982) estudaram aspectos específicos da placa dental, com o objetivo de avaliar a relação existente entre a prevalência de cárie e a quantidade e natureza de flúor na placa, de pessoas com ou sem cárie. Foi observado que a placa dos indivíduos livres de cárie continha uma concentração média de flúor total 40 % maior do que aquela dos indivíduos com cárie.

Em 1982, GROBLER *et al* realizaram uma pesquisa onde avaliaram os níveis de flúor, cálcio e fósforo na placa dental de 149 crianças de 6 a 7 e de 12 a 13 anos de idade de ambos os sexos, divididas em 3 grupos, de acordo com a concentração de flúor na água de consumo, que na cidade de Klipfontein era de 2,5 ppmF, enquanto Garies e Elim continham 1,06 e 0,02 ppmF respectivamente. Os resultados mostraram que menores concentrações de fósforo e flúor, e maior concentração de cálcio estavam associadas com níveis mais baixos de flúor na água de abastecimento.

SKINNER *et al* (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 ($p=0,052$).

McNEE *et al* em 1982, realizaram um estudo avaliando os efeitos dos polissacarídeos extracelulares sobre a difusão de NaF e [14 C] - sacarose na placa dental; seus resultados mostraram que a presença de polissacarídeo extracelular na placa influencia levemente o índice de difusão. Entretanto, o tempo total para difusão através da placa pode ser aumentado se a presença de polissacarídeo extracelular resulta em uma espessa camada de placa.

Estudando a associação entre as concentrações

de cálcio e fósforo da placa e saliva e cárie dental SHAW *et al*, 1983, coletaram amostras de placa e saliva de 55 crianças entre 13 e 15 anos: 23 destas eram livres de cáries (grupo N), enquanto as outras 32 apresentavam evidências de alta atividade de cárie com um CPOS médio de 25,9 (grupo H). A concentração média de cálcio na placa posterior das crianças no grupo N foi 3,57 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (peso seco), comparado com 1,63 $\mu\text{g}/\text{mg}$ no grupo H. A concentração média de cálcio na placa anterior foi 11,55 $\mu\text{g}/\text{mg}$ no grupo N e 2,57 $\mu\text{g}/\text{mg}$ no grupo H. As diferenças entre os grupos N e H foram estatisticamente significantes ($p < 0,01$). Diferenças significantes similares foram encontradas entre os níveis de fósforo na placa. Embora a concentração média tanto de cálcio como fósforo na saliva tenha sido maior para o grupo N do que para o grupo H, somente para fósforo a diferença alcançou significância estatística ($p < 0,05$). O presente estudo, entretanto, mostrou que níveis de cálcio e fósforo são significativamente maior na placa coletada de crianças sem experiência de cárie do que em crianças susceptíveis à cáries.

De acordo com RÖLLA *et al* em 1985, a sacarose é conhecida por possuir um maior potencial para induzir cáries do que a glucose e a frutose ,apesar do fato dos mo nossacarídeos causarem uma alta ou mesmo 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.

CARLSSON em 1986, em seus relatos sobre o metabolismo do açúcar e cárie, cita que os microrganismos também necessitam de energia mesmo quando não estão crescendo. Há necessidade de energia, por exemplo, para a regulação osmótica, a manutenção do pH intracelular e para a renovação de proteínas e ácidos nucleicos. Na ausência de fontes exógenas de energia, essas necessidades devem ser satisfeitas a partir de fontes endógenas. Muitas bactérias presentes na microbiota dos dentes têm uma reserva de energia potencial sob a forma de polissacarídeos intracelulares (glicogênio). Esses polissacarídeos são usualmente formados quando os açúcares estão presentes em excesso e alguns nutrientes limitam o crescimento dos organismos. Sob tais condições, o reservatório intracelular de frutose - 1,6 P e de outros intermediários glicolíticos aumenta e tem início a síntese de polissacarídeos através da ativação da ADP - glucose fosforilase. Esses polissacarídeos intracelulares são formados a partir de qualquer tipo de açúcar que possa ser convertido em glicose 1-P. Uma grande atenção tem-se concentrado no possível papel dos

polissacarídeos intracelulares na patogenicidade dos microorganismos cariogênicos, pois durante os períodos do dia nos quais nenhum açúcar é suplementado pela dieta para a microbiota dos dentes, eles podem ser usados como fontes de energia e os ácidos são excretados. Cita ainda, que a maioria das bactérias no seu ambiente natural estão cercadas por matrizes altamente hidratadas chamadas de glicocálices, que quase sempre são constituídas de heteropolissacarídeos. Os precursores destes polímeros são formados no citoplasma, transportados através da membrana celular por carregadores lipídicos e polimerizados do lado de fora da membrana. Todos esses polímeros podem ser sintetizados sempre que existam quantidades adequadas de energia, assim como fontes disponíveis de carbono e nitrogênio. Algumas bactérias orais também têm a habilidade de produzir polissacarídeos a partir da sacarose. As glicosiltransferases, que são enzimas extracelulares, clivam a sacarose, liberam a frutose e obtém energia para a conversão extracelular da glicose em glucanos altamente ramificados. Em alguns desses glucanos, as moléculas de glicose apresentam uma ligação predominantemente do tipo α (1 + 3), e são geralmente altamente insolúveis, rígidos e podem formar agregados fibrosos, chamados atualmente de mutanos. Outros glucanos apresentam predominantemente ligações α (1 + 6), formam cadeias flexíveis e quase sempre são solúveis, sendo chamados de dextranos. Algumas bactérias podem também formar polímeros

extracelulares da frutose (frutanos) a partir da sacarose, que usualmente apresentam um alto peso molecular, mas são bastante solúveis.

MORENO & MARGOLIS, 1988, fizeram um estudo no qual a composição do fluido da placa foi determinado em 4 grupos de 50 estudantes (18 a 22 anos de idade), que abstiveram-se de higiene oral por 36 horas e não comeram ou beberam por pelo menos 1 hora antes da coleta da placa. As amostras de placa de cada grupo foram agrupadas (pool) sob óleo mineral em pequenos tubos de centrifuga e centrifugados à 37.000 g por uma hora, 4°C. Os sobrenadantes foram então combinados sob óleo mineral e centrifugados à 5000 g (4°C) por 15 minutos. Os resultados mostraram que a composição inorgânica do fluido da placa nos 4 grupos foi similar e em acordo com valores relatados por outros investigadores. A composição média foi Ca, 7,07 ± 0,51 mmol/L; P, 23,2 ± 5,3 mmol/L; Na, 18,6 ± 2 mmol/L; K, 85,1 ± 5,3 mmol/L; Mg, 3,9 mmol/L; Cl, 42,8 ± 9 mmol/L; F, ~ 0,004 mmol/L; pH, 5,69 (5,63 - 6,01). Acetato, propionato, succinato, butirato, lactato, e formato foram determinados em duas amostras analisadas, com acetato e propionato sendo os ácidos predominantes. Foi também demonstrado, que a capacidade tampão no fluido da placa foi essencialmente relacionado a sua composição de ácidos orgânicos. Entretanto, foi notado que quando o pH inicial no fluido da placa excedeu 6,5, o fosfato contribuiu significativamente para a capacidade

tampão. A contribuição de outras moléculas solúveis (proteínas, peptídeos, aminoácidos) à capacidade tampão observada parece ser pequena. Produtos de atividade iônica calculados sugerem que o fluido da placa é saturado em relação aos minerais do esmalte.

MARGOLIS *et al.*, 1988a, analisaram a composição do fluido da placa (em pool) de indivíduos agrupados de acordo com a idade (8 a 11, 14 a 17, 18 a 25 anos) e índice de cáries (livres de cárie, CF, CPOS = 0; susceptíveis à cáries, CS, CPOS > 10). Os voluntários receberam uma profilaxia dental uma semana antes da coleta de placa, absteram-se de higiene oral por 48 horas, e não comeram ou beberam pelo menos uma hora anterior à coleta de placa. As amostras de placas de cada grupo foram colocadas sob óleo mineral e contrifugadas (15.000 g) por 45 minutos em temperatura ambiente. Os sobrenadantes foram analisados para ácidos orgânicos, anions inorgânicos, cátions mono- e divalentes, e valores de pH. Os íons Na^+ , NH_4^+ , K^+ , Ca^{++} , Mg^{++} , Cl^- , e fosfato estavam presentes em todas as amostras. Os ácidos acético e propiônico foram predominantes, compreendendo acima de 75% dos ácidos presentes, enquanto que os ácidos succínico, láctico, fórmico e butírico estavam presentes em menor concentração. Dentro de cada grupo de idade, o valor médio para pH, concentração de NH_4^+ , Mg^{2+} e ácido butírico foi significativamente maior para o grupo CF. Avaliações indicam que o fluido da placa é supersaturado em

relação ao esmalte e ao fosfato dicálcio diidratado ($\text{Ca.HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$), com um significativamente maior grau de saturação em relação ao esmalte no grupo CF. Esses resultados sugerem que o fluido da placa de indivíduos CF tem um maior potencial de remineralização em relação aos indivíduos CP.

CURY, em 1989, discutindo a dinâmica do desenvolvimento da lesão de cárie e os mecanismos de ação do flúor, afirma que a cárie dental é uma consequência do desequilíbrio entre os fatores de desmineralização e remineralização e que a presença de flúor nos fluidos da placa e esmalte pode controlar o desenvolvimento do processo de cárie, por inibir o processo de desmineralização e ativar a remineralização.

NEWBRUN em 1989, descreve 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 comparam 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 um substrato dietético no processo da cárie de superfície lisa pode ser explicado

no campo da bioquímica. Cárie de superfície lisa depende do crescimento de placa dental. Várias investigações independentes demonstraram claramente a presença de polissacarídeos extracelulares, tanto os glucanos quanto os levanos na 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 e 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 ligadas à superfície da célula e mostram uma alta especificidade para a sacarose como um substrato. As enzimas envolvidas nessa síntese, glicosil e frutossil transferases foram isolados e purificadas do S. sanguis e S. mutans.

NOBRE DOS SANTOS & CURY em 1989, realizaram um estudo sobre a composição inorgânica da placa dental durante a fluoretacão, paralisação e refluoretacão da água de abastecimento público, obtiveram os seguintes resultados : F^- (ng/mg) 21,7, 1,7 e 17,3; Ca^{++} (µg/mg) 7,8, 5,5, 4,2; P (µg/mg) 9,2, 9,2 e 6,0 respectivamente, em termos de peso seco.

TATEVOSSIAN em 1990a em um estudo de revisão,

descreveu que a concentração de flúor total na placa varia entre 5 a 10 ppm (peso úmido). A variabilidade de dados na literatura sobre flúor na placa é em parte atribuída à problemas analíticos relacionados ao limite de detecção do eletrodo para flúor. Uma mudança na classificação do flúor da placa é necessário, uma vez que recentes trabalhos indicam que existem 2 pools de flúor na placa: < 5% do flúor total está no fluido da placa com íon livre, e a grande porção restante do flúor total é designado como F ligado (>95%) que pode ser extraído por ácido perclórico 0,5 mol/l. Fontes de flúor na placa incluem a dieta, saliva e fluido gengival; o esmalte é improvável ser uma fonte regular para flúor na placa a menos que seja revestido diariamente com compostos de flúor lábil, como fluoreto de cálcio, ou liberado pela desmineralização. A localização e natureza do flúor não iônico não está estabelecida, mas a presente evidência é consistente com uma localização intracelular. Flúor não iônico pode ser liberado por ácidos produzidos na placa durante fermentação do açúcar, mas isto provavelmente não alcança uma concentração iônica alta o bastante por um período de tempo suficiente para exercer uma significativa inibição da acidogênese da placa. Evidências epidemiológicas mostrando correlações entre concentrações de F na placa e prevalência de cáries não excluem a possibilidade de efeitos coincidentes do F da água.

MARSH & BRADSHAW em 1990, realizaram um estudo

in vitro com o objetivo de avaliar o efeito do flúor sobre a estabilidade da comunidade bacteriana oral e seus resultados mostraram que, o flúor pode interferir com a ecologia da microbiota da placa e assim ter uma contribuição significativa na prevenção da cárie dental.

De acordo com TATEVOSSIAN, 1990b, de aproximadamente 82% de água na placa dental, apenas 30 a 35% é extracelular. Isto constitui uma camada aquosa revestindo o dente como um fino filme, principalmente em torno da margem cervical e faces interproximais onde a espessura da placa é maior. O amplo tamanho deste compartimento extracelular livre de água, auxilia a separação por simples centrifugação. O fluido então obtido é chamado "fluido de placa". O fluido de placa permeia a bactéria que causa cárie dental e inflamação gengival, e contém a matéria prima usada e produzida pelas bactérias e também os produtos das lesões produzidas no esmalte e na gengiva marginal. O fluido da placa tem aproximadamente duas vezes a capacidade tampão da saliva em repouso e contribue por volta de 1/4 com a capacidade tampão total da placa. Este autor cita CAREY *et al.*, 1986; MORENO & MARGOLIS, 1988, que afirmam que a capacidade tampão no fluido da placa é de interesse primário durante flutuações no pH, como visto na curva de Stephan, porque o pH é uma importante variável na determinação do grau de saturação no fluido da placa. O grau de saturação irá estabelecer o ponto no qual o esmalte sob a placa sofrerá

des-remineralização. Sob jejum ou condições de repouso, o fluido da placa tem sido calculado ser supersaturado em relação ao produto de solubilidade do esmalte.

Continuando seu relato TATEVOSSIAN (1990b) descreveu sobre a origem e significância do cálcio, fosfato e grau de saturação. Devido a concentração de íons cálcio na saliva ser menor em relação ao fluido da placa, e devido isto não ser o caso para o plasma, uma fonte crevicular para cálcio do fluido é inteiramente possível. O esmalte dental pode ser uma fonte de cálcio durante flutuações de pH. Fosfato inorgânico pode ser liberado a partir de fosfatos orgânicos pela atividade fosfatase, a qual é alta no fluido da placa e é sensível à flutuações na concentração de fosfato. A pequena quantidade de fosfato orgânico no fluido da placa é uma indicação de uma fonte de fosfato orgânico na placa, que pode ser bactéria, transmigração de PMN, células epiteliais gengivais, células epiteliais salivares e da bochecha, ou plasma via fluido gengival. Cálcio e fosfato são íons comuns na determinação das forças que conduzem a desmineralização ou remineralização do esmalte dental.

MARGOLIS, 1990, durante o simpósio sobre "Fluido da placa e propriedades da interface placa/esmalte" apresentou as seguintes considerações: As mudanças químicas efetuadas pela fermentação dos carboidratos da dieta por microrganismos específicos na placa são refletidas em mudanças na composição do fluido da placa dental. A

magnitude de algumas dessas mudanças - por exemplo, mudanças na atividade de espécies de ácidos e no grau de saturação em relação aos minerais do esmalte - deve, em princípio, estar diretamente relacionada à intensidade do desafio cariogênico. Assim, a importância do fluido da placa é que os resultados de mudanças químicas induzidas pela atividade microbiana é refletida no meio, o qual está em íntimo contato com a superfície do esmalte, e que este meio é acessível à análises químicas e bioquímicas.

FU & ZERO, 1991, compararam o efeito da espessura da placa sobre a retenção de glicose e ácidos orgânicos produzidos por placas contendo ou não glucanos, utilizando um modelo intra-oral de desmineralização do esmalte. Seus resultados mostraram que a presença de glucano aumenta o índice de difusão e produção de ácido na camada mais profunda da placa adjacente à superfície dental.

MARGOLIS & MORENO em 1992, com o objetivo de estudar a composição do fluido da placa de indivíduos livres de cáries e cáries-positivo após exposição à sacarose, realizaram a seguinte pesquisa. A composição de um "pool" de fluido da placa a partir de amostras de 5 populações foi determinada antes e em tempos selecionados (7, 15, 30 e 60 minutos) após um bochecho com sacarose a 10%. Os voluntários foram agrupados de acordo com seu índice de cárie (livres de cárie, CF, CPOS=0 ; cáries-positivo, CP, CPOS > 10). Também foram estudadas amostras obtidas de

superfícies com manchas brancas e de superfícies íntegras da mesma boca de dois grupos adicionais ao grupo CP. O fluido da placa foi isolado por centrifugação e analisados para ácidos orgânicos, íons inorgânicos (cromatografia iônica), e pH (microeletrodos). Antes da exposição à sacarose, o fluido da placa do subgrupo CF e de superfícies íntegras dos voluntários CP apresentaram maior valor de pH do que as amostras do subgrupo CP e de superfícies com manchas brancas, respectivamente; por outro lado a composição iônica foi similar. Fluidos de placas em jejum foram também constatados serem supersaturados em relação ao esmalte e ter um grau significativamente maior nas amostras CF, sugerindo que o fluido na placa CF tem um maior potencial de remineralização do que as amostras CP. Após exposição à sacarose, uma rápida diminuição do pH do fluido da placa foi observada, que correspondeu primariamente à produção de ácido láctico. Para todos os tempos examinados, a média de pH e grau de saturação do esmalte (DS(En)) foram baixas e a concentração de ácido láctico foi maior nas amostras CP do que nas amostras CF; diferenças observadas foram estatisticamente significantes aos 7 minutos para pH e DS(En), e aos 7, 15 e 30 minutos para ácido láctico. Baixos valores de DS(En) sugerem que o fluido da placa de indivíduos CP têm um mensurável maior potencial cariogênico. A concentração de cálcio também aumentou no fluido da placa, após exposição à sacarose e à níveis similares nas amostras

de indivíduos CF e CP, apesar da ~~significativamente menor~~ produção de ácido nas amostras CF. Estes últimos resultados parecem estar associados com achados adicionais que o total de placa do subgrupo CF contém significativamente mais cálcio do que as amostras dos indivíduos CP. A disponibilidade de íons minerais como cálcio na placa pode, portanto, ter um importante papel no controle da desmineralização do esmalte.

MARGOLIS *et al*, 1993, realizaram um estudo no qual "pool" de amostras de placa foram obtidas de (1) superfície coronal de 2 grupos de indivíduos livres de cárie (CF). (2) superfície coronal com mancha branca de um grupo de indivíduos cárie-positivo (CP), e (3) superfícies de raiz exposta livre de cárie (RCF) e raízes de indivíduos cárie positivo (RCP). As amostras da placa foram obtidas antes e 3 minutos após um bochecho de 1 minuto com solução de sacarose a 0,5, 1, 2, 5 e 10%. O fluido da placa foi então isolado de cada amostra de placa por centrifugação e analisada para íons inorgânicos, ácidos orgânicos, e valores de pH. Com o aumento da concentração de sacarose: (1) o pH e grau de saturação (DS) do fluido da placa em relação aos minerais do dente diminuíram; (2) os valores do pH e DS das amostras CP e RCP foram consistentemente menor do que nas amostras CF e RCF, respectivamente; (3) a concentração de ácido láctico no fluido da placa aumentou e foi consistentemente maior nas amostras CP e RCP do que nas amostras CF e RCF, respectivamente. A composição química do

fluido da placa, após exposição à sacarose, mostrou correlação com a história da cárie. Esses autores citam DIBDIN & SHELLIS, 1988 e VAN HOUTE *et al* 1989, que sugerem que o potencial acidogênico da placa *in vivo* pode também ser influenciado pelos polímeros que constituem parte da matriz da placa. Citam como exemplo, evidências que sugerem que polímeros tais como o glucano, produzido pelos estreptococos do grupo mutans a partir da sacarose, podem aumentar a porosidade da placa pelo aumento da distância interbacteriana e efetuar um aumento da difusão do substrato (sacarose) na placa. Um aumento na porosidade da placa pode, portanto, levar a um aumento na acidogênese bacteriana.

Portanto, a revisão da literatura mostra a preocupação dos autores com a composição orgânica e inorgânica da placa dental em termos de sua cariogenicidade. Tendo em vista a carência de dados a respeito do efeito da frequência do consumo de sacarose na composição bioquímica da placa dental, particularmente em relação ao flúor, nos propusemos a realizar este trabalho.

3 - PROPOSIÇÃO

Estudar o efeito da frequência da utilização de sacarose na composição orgânica e inorgânica da placa dental.

4. MATERIAL E MÉTODO

4.1. 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

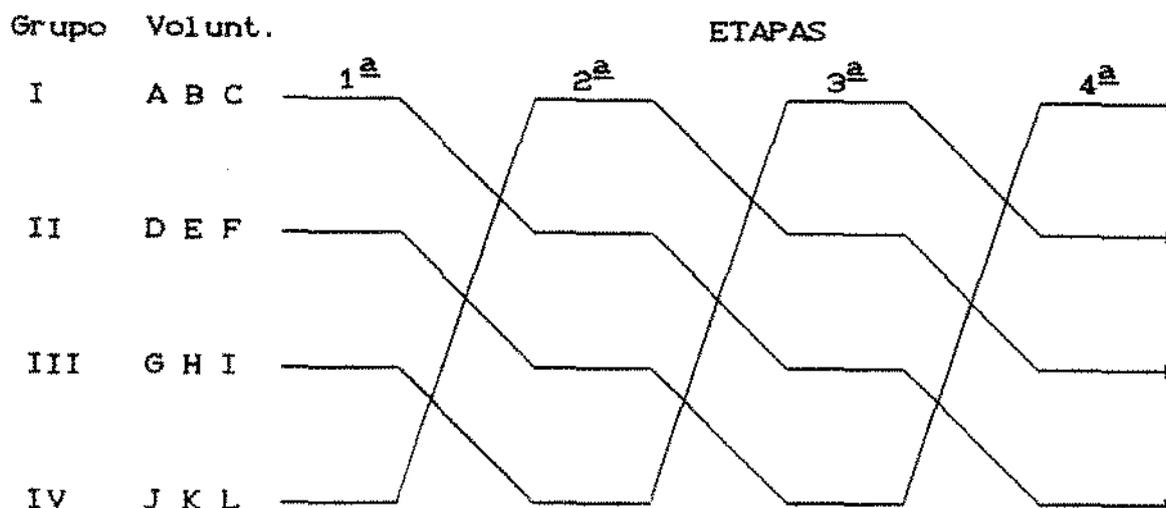
Grupo II : Utilizando Sacarose 4 vezes ao dia

Grupo III : Utilizando Sacarose 2 vezes ao dia

Grupo IV : Não utilizando Sacarose

O período total do estudo compreendeu quatro (4) etapas de vinte e oito (28) dias com intervalo de no mínimo sete (7) dias, entre cada etapa. Em cada etapa foram utilizados doze (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

4.2. Fase Preparatória

4.2.1. 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 as extrações. Foram selecionados dentes sem defeitos no esmalte e com mais de 2/3 de 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/150mm) e micro-motor CS421 DENTEC 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 (2) minutos, removendo-se assim aproximadamente 50 µm da camada externa do esmalte dental (FEATHERSTONE & ZERO,1992). Assim foram obtidos 192 blocos, os quais foram divididos casualmente para cada voluntário em cada etapa.

4.2.2. Confeccção dos Dispositivos Intra-orais

Foram confeccionados quatro (4) dispositivos intra-orais palatinos para cada voluntário (um para cada etapa do experimento), nos quais foram preparadas quatro (4) 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 um 1 mm entre o bloco e a tela para permitir acúmulo de placa dental (BENELLI *et al*,1993),(Figura 1).



Figura1 - Dispositivo intra-oral palatino

4.3. Fase Clínica

Doze voluntários adultos residentes em Piracicaba (região de água fluoretada) com bom estado de saúde oral 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 (Anexo 1).

4.4. Fase Laboratorial

Após cada etapa do período experimental placa dental foi coletada e os blocos dentais foram analisados.

4.4.1 Peso Úmido 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 número 15 e então com uma espátula plástica de ponta fina (JON) foi coletada a placa

dental, após 1 noite de jejum, formada sobre os blocos de esmalte, sendo imediatamente transferida para tubos de microcentrifuga pré-pesados, e o peso úmido da placa foi determinado utilizando-se balança Analitical Plus OHAUS.

4.4.2 Avaliação Qualitativa de cárie dental

Os blocos dentais foram limpos e as alterações no esmalte foram documentadas fotograficamente (NIKON N505/Medical NIKKOR 120mm (M=1/11) 1:4, aumento 1.5x) e histologicamente (microdurômetro SHIMADZU HMV - 2000).

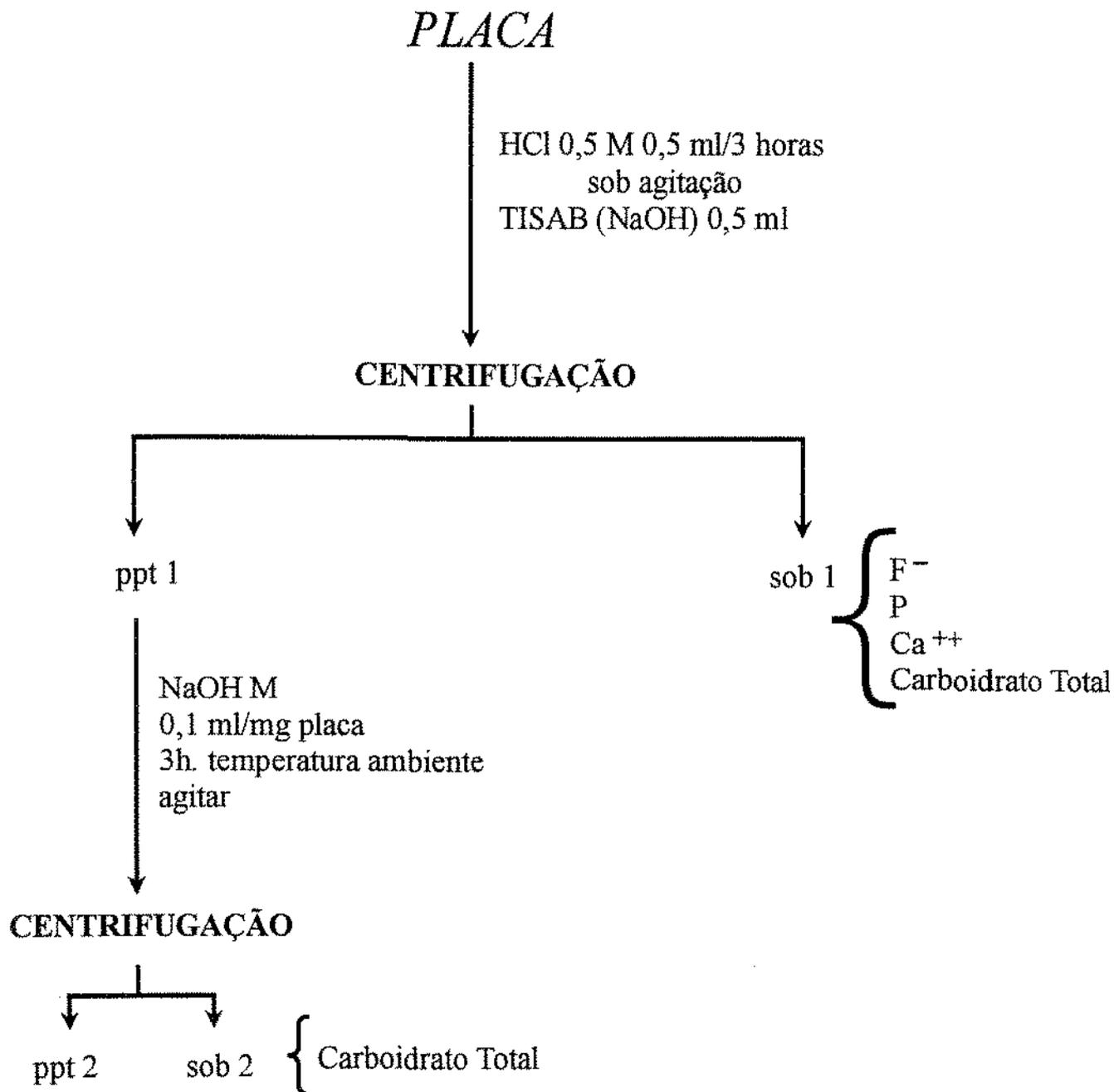
4.4.3 Tratamento da Placa Dental

Para determinação da concentração de flúor, cálcio, fósforo e polissacarídeos solúveis e insolúveis em ácido, as amostras das placas foram tratadas com 0,5 ml de HCl 0,5 M durante três (3) horas, sob agitação. A seguir o ácido foi neutralizado com 0,5 ml de TISAB¹ (contendo 20 g/NaOH/l) e os tubos foram centrifugados em centrífuga Incibras Spin 1, durante 1 minuto; sendo então no sobrenadante (S 1) determinadas as concentrações de

¹ TISAB (Tampão acetato 1,0 M, pH 5,0, contendo NaCl 1,0M, CDTA (Ácido diaminociclohexanotetra-acético) 0,4% e 20 g de NaOH/l)

flúor, fósforo, cálcio e carboidratos solúveis em ácido. Enquanto que no precipitado (P 1) foi adicionado 0,10 ml de NaOH M/mg de placa, deixando-se três (3) horas em temperatura ambiente e em seguida os tubos foram centrifugados (micro-centrifuga) durante 1 minuto, sendo então no sobrenadante (S 2) determinada a concentração de polissacarídeos insolúveis em ácido (solúvel em álcali).

O fluxograma abaixo, resume o tratamento da placa.



4.4.4 Determinação de Flúor na Placa Dental

A concentração de flúor nas amostras (S 1) foi determinada utilizando-se potenciômetro ORION E A 940 através de um eletrodo específico para flúor ORION 94-09, sendo a calibração do aparelho, realizada com padrões de 0,10 a 1,0 $\mu\text{g F}^-/\text{ml}$ preparados com TISAB (20 g NaOH/l) a 50% contendo HCl 0,25M . A leitura das concentrações de flúor nas amostras foram expressas em $\mu\text{g F}^-/\text{ml}$, sendo o resultado expresso em $\mu\text{g F}^-/\text{g}$ de placa.

4.4.5 Determinação de Fósforo na Placa Dental

A determinação da concentração de fósforo inorgânico na placa dental foi realizada pelo método FISKE & SUBBAROW (1925), que tem como princípio que o fósforo dos fosfatos minerais é transformado em fosfomolibdato, o qual é em seguida reduzido pelo ácido alfa-amino-naftol sulfônico a um produto de cor azul, cuja intensidade de coloração é proporcional ao teor de fósforo inorgânico presente na amostra. Sendo assim, foi pipetado 0,25 ml de amostra (S 1) e acrescentou-se 2,05 ml de água deionizada, 0,5 ml de ácido molibdico, agitou-se e após 10 minutos adicionou-se 0,2 ml de redutor agitando-se imediatamente e após 20 minutos a intensidade de cor foi

medida em um espectrofotômetro BECKMAN DU-65 a 660 nm. O resultado foi expresso em mg P/g de placa.

4.4.6 Determinação de Cálcio na Placa Dental

O cálcio foi determinado através de espectrofotometria de absorção atômica utilizando-se o espectrofotômetro PERKIN ELMER modelo 306. O resultado foi expresso em mg Ca/g de placa.

4.4.7 Determinação de Carboidrato Total Solúvel em Ácido

A determinação de carboidratos solúveis nas amostras (S 1) foi realizada pelo método de dosagem de carboidratos totais (DUBOIS *et al* 1956) que se baseia na reação de um açúcar quando na presença de um ácido forte (H_2SO_4) formar compostos furfúricos a partir de uma pentose ou hexose. Os compostos furfúricos na presença de fenol obtém uma coloração laranja, cuja intensidade é proporcional ao teor de açúcar presente na amostra. Decorrido 20 minutos, após as amostras terem sido preparadas, a intensidade de cor foi medida em um

espectrofotômetro BECKMAN DU-65 a 490 nm. O resultado foi expresso em μg /mg de placa.

4.4.8 Determinação de Carboidrato Total Solúvel em Álcali

A determinação de polissacarídeos solúveis em álcali contidos na amostra (S 2) foi realizada pelo método de dosagem de açúcar total (DUBOIS *et al* 1956) já descrito e as dosagens foram feitas no espectrofotômetro BECKMAN DU-65 .O resultado foi expresso em μg /mg de placa.

4.4.9 Análise de Flúor na água de Abastecimento Público

No decorrer das quatro (4) etapas experimentais, a concentração de flúor na água de abastecimento público de Piracicaba, foi avaliada diariamente, utilizando-se potenciômetro ORION E A 940 com um eletrodo específico para flúor modelo 94-09, utilizando-se para calibração do aparelho padrões de 0,1 a 1,0 ppm F^- .

4.5. Análise Estatística

Os dados foram analisados pelo delineamento "cross over", e as comparações de médias foram feitas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de significância (JONES & KENWARD, 1989).

5. RESULTADOS

5.1 Análise de Flúor na água

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

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

ETAPAS	ppm F ⁻	PERÍODO
1 ^a	0,64 ± 0,05	26/04 a 24/05/93
2 ^a	0,70 ± 0,18	31/05 a 28/06/93
3 ^a	0,72 ± 0,11	03/08 a 31/08/93
4 ^a	0,71 ± 0,05	12/10 a 09/11/93

5.2 Peso Úmido da Placa Dental (mg)

A análise de variância dessa variável indicou significância estatística apenas para efeito de indivíduo, (QMInd. = 45,0244).

A seguir apresentamos as médias e os respectivos desvios dos tratamentos (Sacarose/dia).

Tabela II- Médias e erro padrão da média dos pesos da placa dental, em função da frequência diária do uso de sacarose.

Tratamentos (Sacarose/dia)	mg
0	7,76 ± 1,04 a
2	12,17 ± 2,92 a
4	10,13 ± 2,69 a
8	12,18 ± 2,03 a

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

Verificou-se que os tratamentos não apresentaram nenhuma diferença significativa entre si, apesar de as maiores médias de peso da placa dental terem sido

encontradas com os tratamentos Sacarose 8x com média de 12,18 mg com desvio de $\pm 2,03$, seguido do tratamento Sacarose 2x com média de 12,17 mg e desvio de $\pm 2,92$ e do tratamento Sacarose 4x com média de 10,13 mg e desvio de $\pm 2,69$, e a menor média de peso da placa dental foi encontrada com a ausência do uso de Sacarose com média de 7,76 e desvio de $\pm 1,04$.

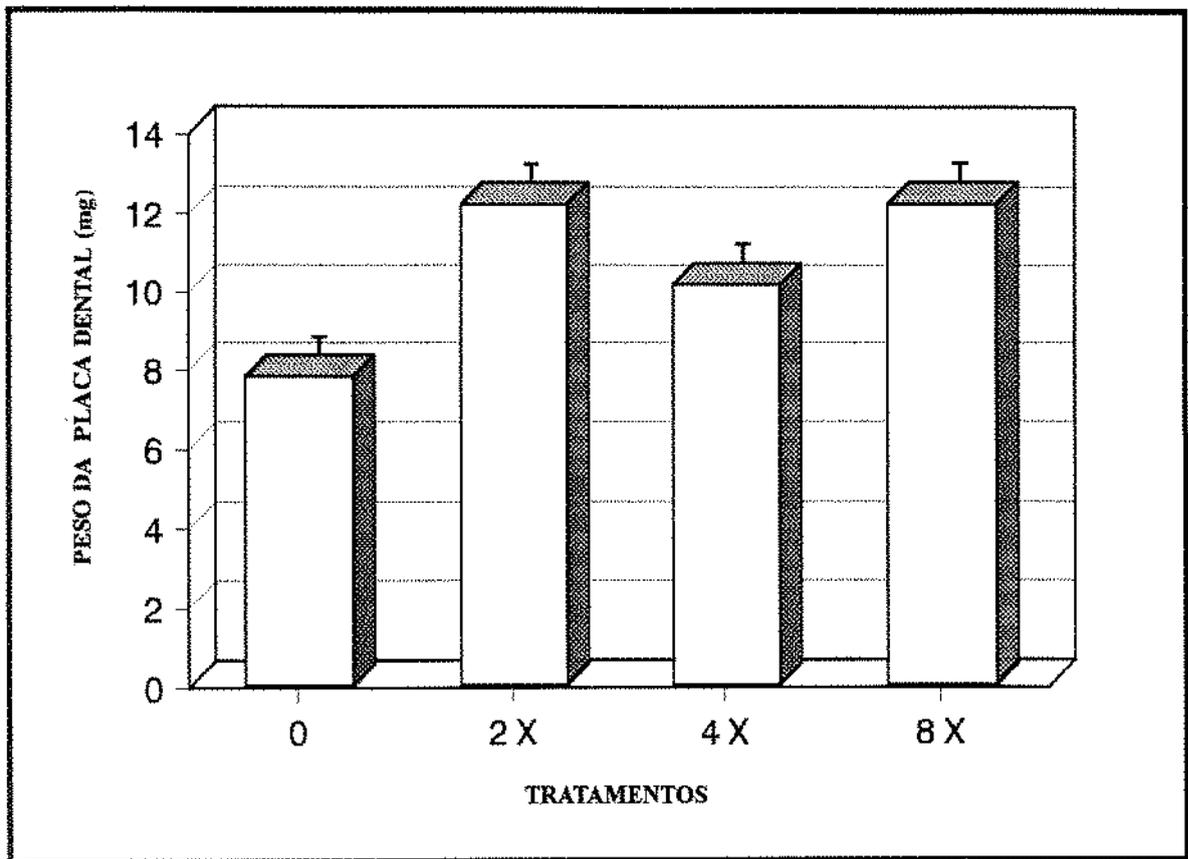


Figura 2 - Médias e erro padrão da média dos pesos da placa dental em função da frequência diária do uso de Sacarose.

5.3 Dosagem de Flúor na Placa Dental

A análise de variância dessa variável indicou significância estatística para efeito de Período e de Tratamento, (QMper =198,0171 e QMTrat= 553,0649).

A seguir apresentamos as médias e os respectivos desvios ,dos tratamentos(Sacarose/dia).

Tabela III- Médias e erro padrão da média das concentrações de Flúor na placa dental, em função da frequência diária do uso de sacarose.

Tratamentos (Sacarose/dia)	$\mu\text{g F}^-/\text{g}$
0	18,71 \pm 3,31 c
2	9,64 \pm 2,81 b
4	2,65 \pm 0,77 a
8	2,69 \pm 0,44 a

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

Verificou-se que os tratamentos Sac.8x e Sac.4x não diferiram entre si de uma maneira significativa, e o intervalo da média de Sac.8x variou entre 2,25 e 3,13 e de Sac. 4x variou entre 1,88 e 3,42 . O tratamento Sac.2x diferiu do restante dos tratamentos e apresentou a média variando entre o intervalo de 6,83 e 12,45 e, finalmente o Tratamento 0 de Sac. apresentou a maior média de Flúor diferindo significativamente entre os demais e com média variando entre 15,40 e 22,02.

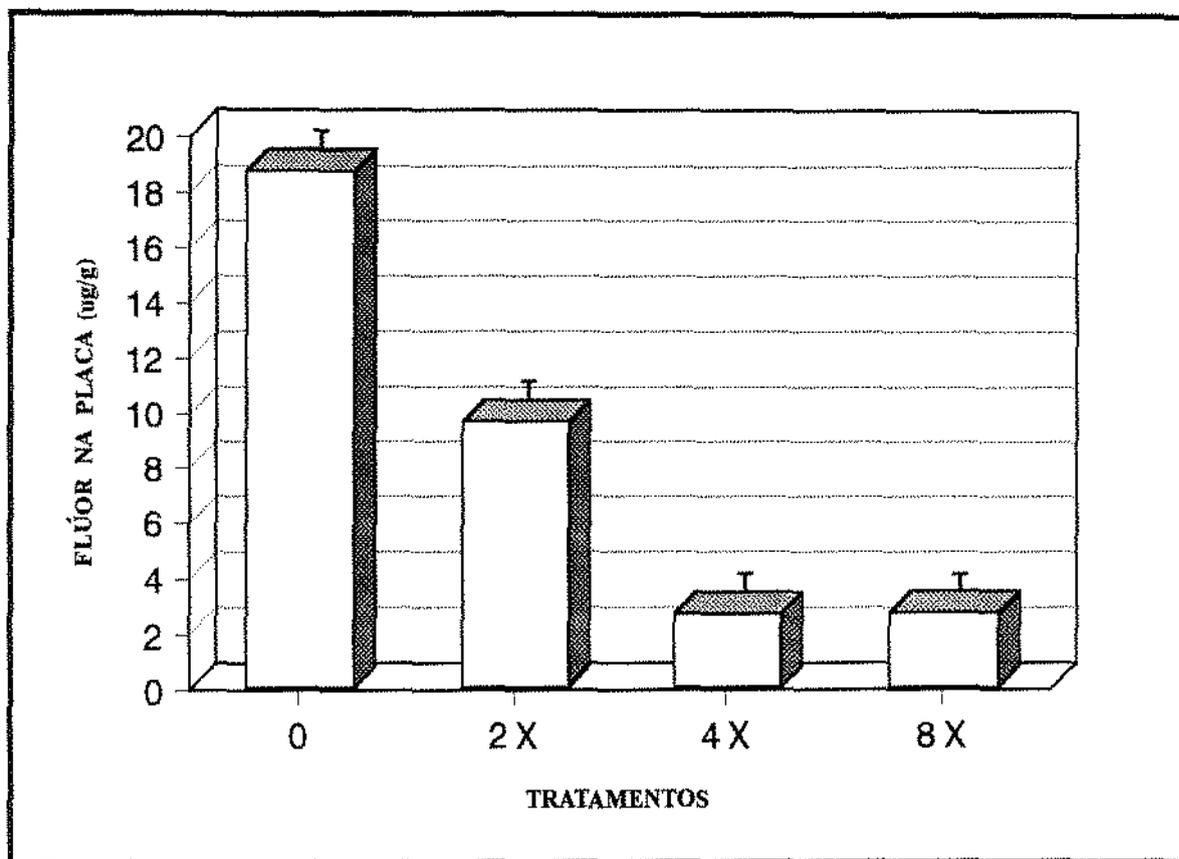


Figura 3 - Médias e erro padrão da média das concentrações de flúor na placa dental em função da frequência diária do uso de Sacarose.

5.4 Dosagem de Fósforo na Placa Dental

A análise de variância dessa variável indicou significância estatística para efeito de Período e de Tratamento, (QMper = 7,4831 e QMTrat= 24,9420).

A seguir apresentamos as médias e os respectivos desvios dos tratamentos(Sacarose/dia).

Tabela IV - Médias e erro padrão da média das concentrações de Fósforo na placa dental, em função da frequência diária do uso de sacarose.

Tratamentos (Sacarose/dia)	mg P/g
0	3,74 ± 1,12 b
2	0,75 ± 0,19 a
4	0,37 ± 0,06 a
8	0,37 ± 0,04 a

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

Verificou-se que os Tratamentos Sac.8x, Sac.4x e Sac.2x não diferiram significativamente entre si. Observa-se que a média do tratamento Sac.8x variou entre 0,33 e 0,41 , o tratamento Sac.4x teve sua média variando entre 0,31 e 0,43 e o tratamento Sac.2x com média variando entre 0,56 e 0,94. Pode-se verificar que, apesar desses três tratamentos não diferirem entre si, estatisticamente, o intervalo da média de Sac.2x não possui intersecção com os intervalos de Sac.4x e Sac.8x. E ainda, o tratamento 0 de Sacarose diferiu do restante significativamente , e teve sua média variando entre 2,62 e 4,86.

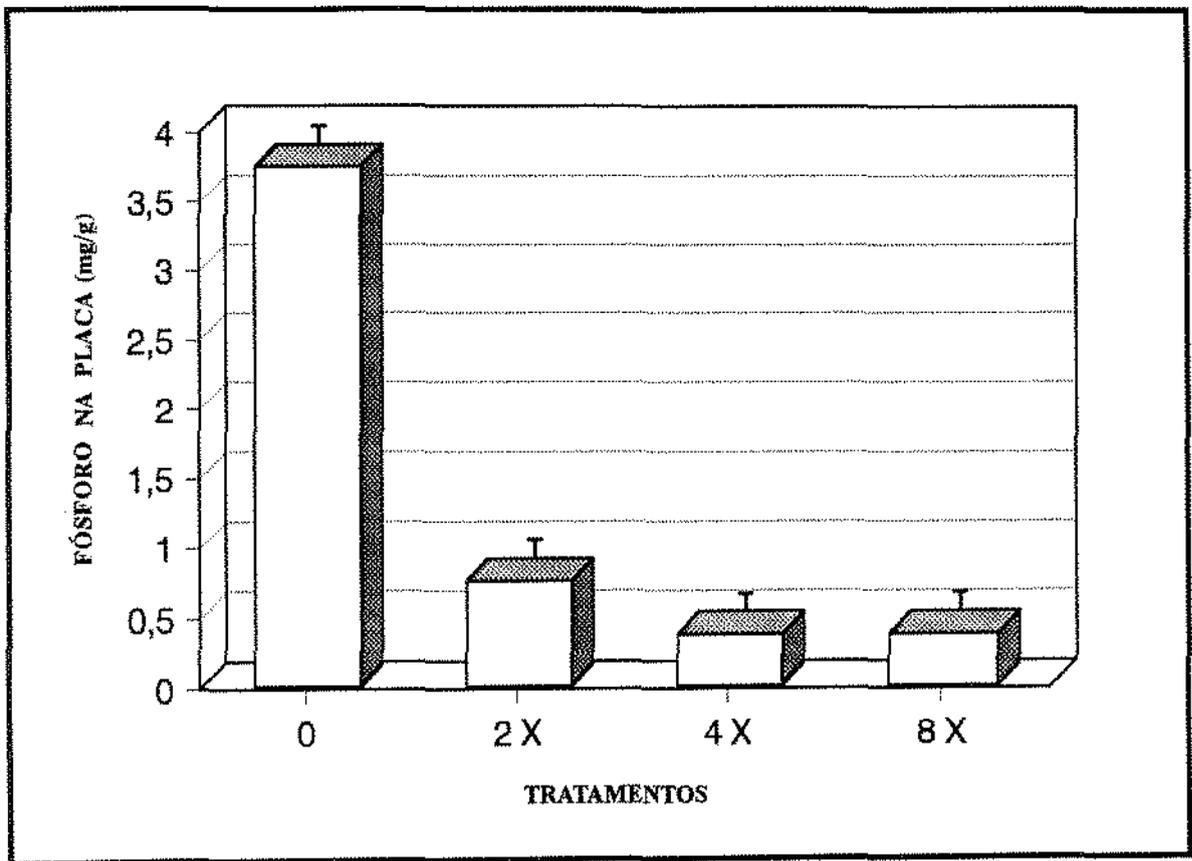


Figura 4 - Médias e erro padrão da média das concentrações de fósforo na placa dental em função da frequência diária do uso de Sacarose.

5.5 Dosagem de Cálcio na Placa Dental

A análise de variância dessa variável indicou significância estatística entre efeito de Período e efeito de Tratamento ($Q_{MPer}=71,0703$ e $Q_{mtrat}=163,4036$).

A seguir apresentamos as médias e os respectivos desvios dos tratamentos (Sacarose/dia).

Tabela V - Médias e erro padrão da média das concentrações de Cálcio na placa dental, em função da frequência diária do uso de sacarose.

Tratamentos (Sacarose/dia)	mg Ca/g
0	12,85 ± 2,51 b
2	3,99 ± 1,02 a
4	4,01 ± 1,09 a
8	4,17 ± 1,07 a

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

Verificou-se que o tratamento Sac.8x, com média variando entre 3,10 e 5,24, o tratamento Sac.4x, com média variando entre 2,92 e 5,10 e o tratamento Sac.2x, com média variando entre 2,97 e 5,01, não diferiram significativamente entre si, e esses três tratamentos diferiram de uma maneira significativa do tratamento 0 de Sacarose, que apresentou média variando entre 10,34 e 15,36.

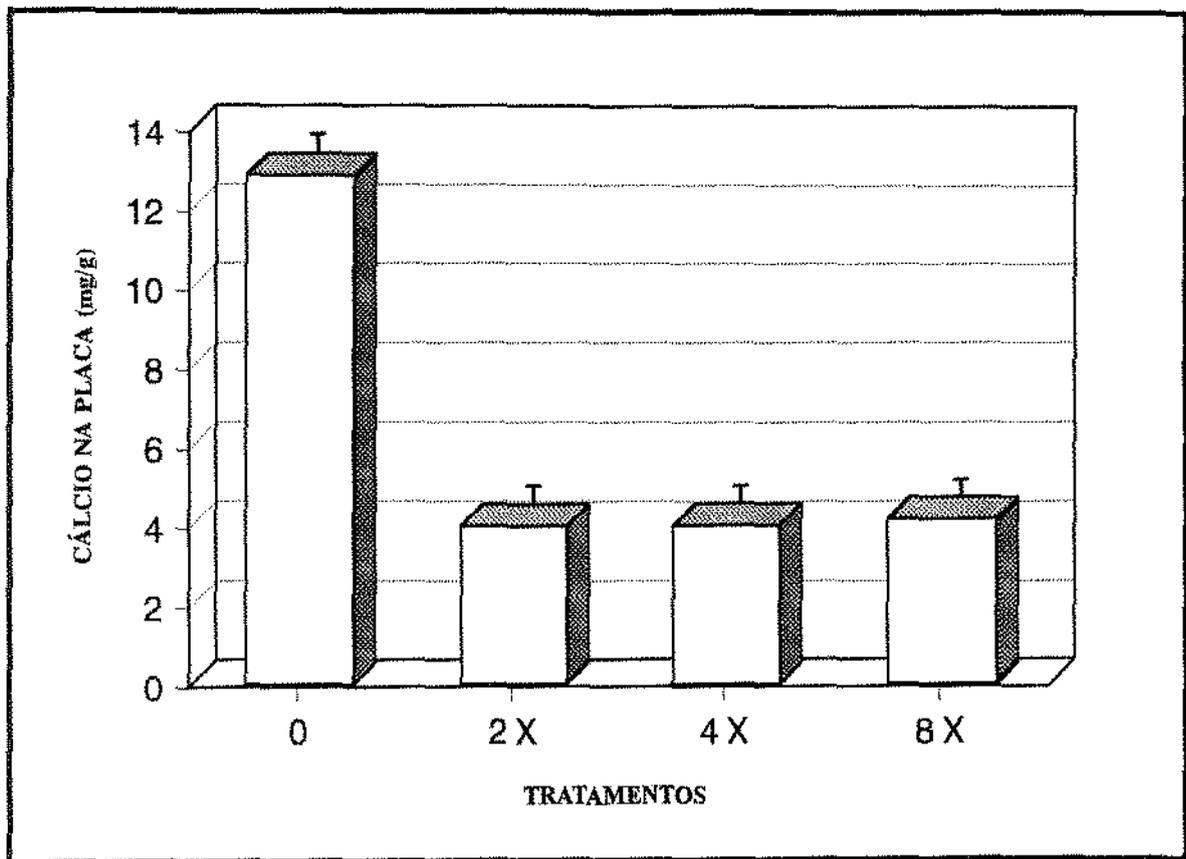


Figura 5 - Médias e erro padrão da média das concentrações de cálcio na placa dental em função da frequência diária do uso de Sacarose.

5.6 Carboidrato Total Solúvel em ÁCIDO

A análise de variância dessa variável indicou significância estatística entre efeito de Período e efeito de Tratamento ($Q_{MPer}=16,8140$ e $Q_{mtrat}=8,8509$).

A seguir apresentamos as médias e os respectivos desvios dos tratamentos (Sacarose/dia).

Tabela VI - Médias e erro padrão das concentrações de Carboidrato total solúvel em ÁCIDO na placa dental, em função da frequência diária do uso de sacarose.

Tratamentos (Sacarose/dia)	$\mu\text{g} / \text{mg}$
0	$5,65 \pm 0,68$ b
2	$3,78 \pm 0,63$ a
4	$3,56 \pm 0,60$ a
8	$4,75 \pm 0,73$ ab

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

Verificou-se que os tratamentos Sac.2x, com média variando entre 3,15 e 4,41, e o tratamento Sac.4x, com média variando entre 2,96 e 4,16, não diferiram entre si, e ambos não diferiram de Sac.8x, com média variando entre 4,02 e 5,48. Este tratamento (Sac.8x) por sua vez não diferiu do tratamento 0 de Sac., que apresentou média variando em 4,97 e 6,33, de uma forma significativa. Ou seja, o tratamento 0 de Sacarose, diferiu do dos tratamentos Sac.4x e Sac.2x e não diferiu significativamente do tratamento Sac.8x.

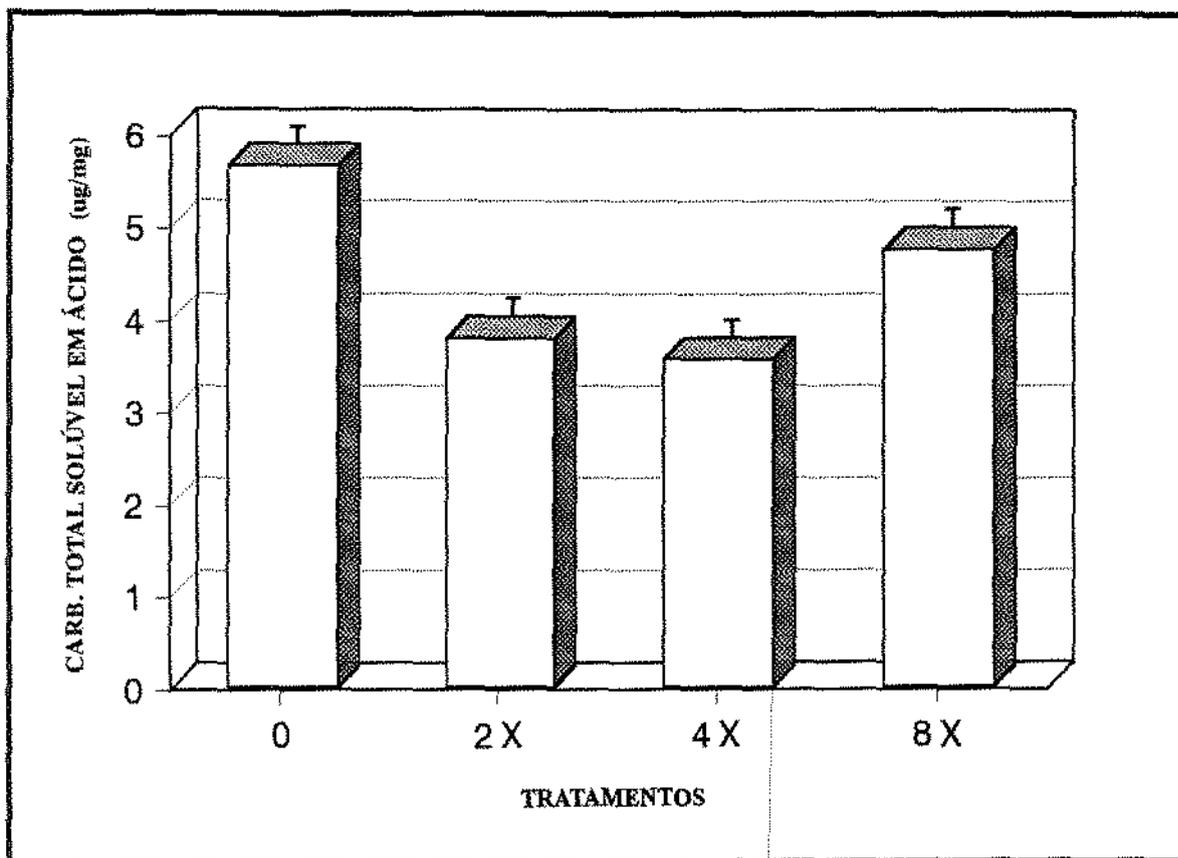


Figura 6 - Médias e erro padrão da média das concentrações de carboidrato total solúvel em Ácido, em função da frequência diária do uso de Sacarose.

5.7 Carboidrato Total solúvel em ÁLCALI

A análise de variância dessa variável indicou significância estatística para efeito de Tratamento (QMTrat=1.560,6759).

A seguir apresentamos as médias e os respectivos desvios, dos tratamentos (Sacarose/dia).

Tabela VII - Médias e erro padrão da média das concentrações de Carboidrato total solúvel em ÁLCALI, em função da frequência diária do uso de sacarose.

Tratamentos (Sacarose/dia)	$\mu\text{g} / \text{mg}$
0	12,00 \pm 2,60 b
2	11,54 \pm 1,81 b
4	13,95 \pm 3,29 b
8	35,84 \pm 6,93 a

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

Verificou-se que os tratamentos 0 de Sacarose, com média variando entre 9,40 e 14,60, o tratamento Sac.4x, com média variando entre 9,81 e 13,35, e o tratamento Sac.2x, com média variando entre 10,66 e 17,24, não diferiram entre si de uma maneira significativa. Apenas o tratamento Sac. 8x, com a média variando entre 28,91 e 42,77, diferiu significativamente dos demais tratamentos.

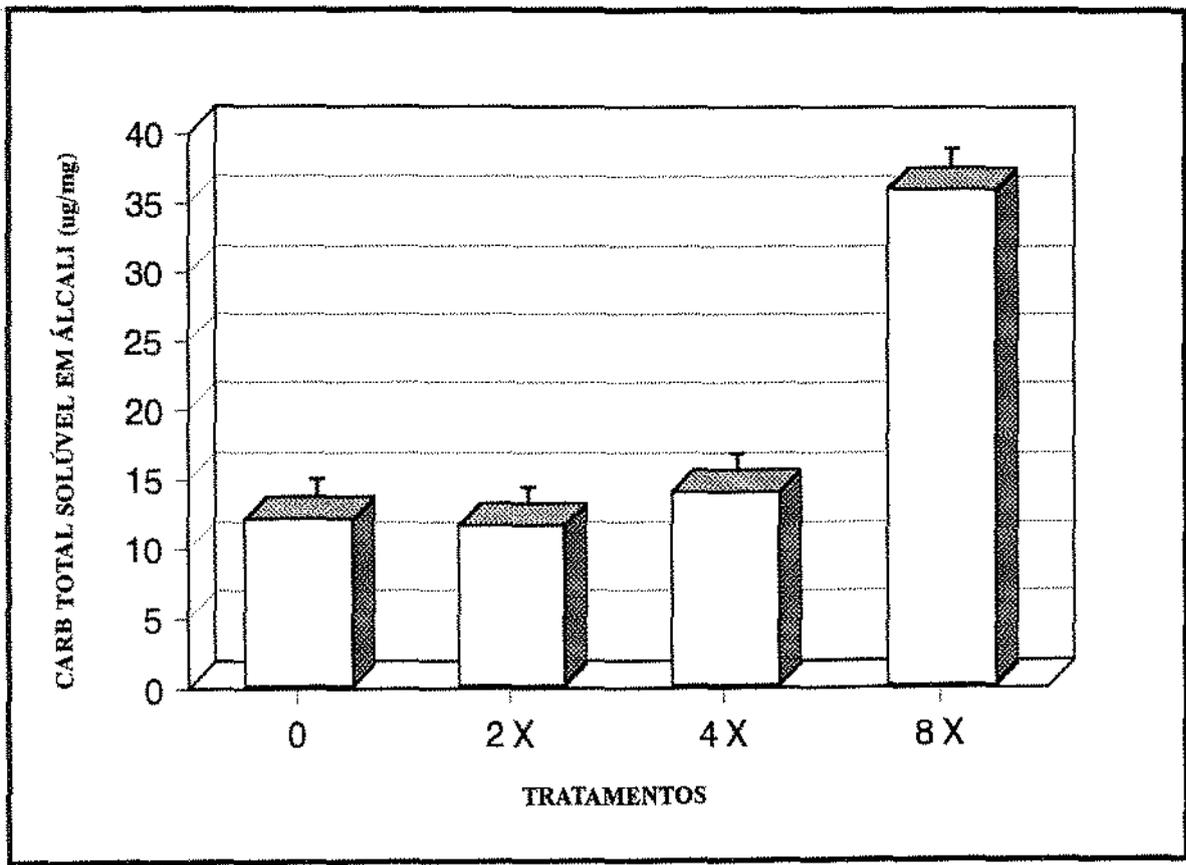


Figura 7 - Médias e erro padrão da média das concentrações de carboidrato total solúvel em Álcali, em função da frequência diária do uso de Sacarose.

5.8 Avaliação qualitativa de cárie dental

Ao exame visual podemos observar que o esmalte do bloco dental submetido ao tratamento com Sacarose 8x, apresentou uma maior perda de mineral representada pela presença de uma extensa lesão branca. Enquanto que no tratamento Sacarose 4x também observamos presença de lesão branca porém em uma menor extensão. Nos tratamentos Sacarose 2x e na ausência de Sacarose, não foi observada perda de mineral (Figura 8).



Figura 8 - Aspecto dos blocos dentais utilizados pelo voluntário B após os tratamentos com Sacarose (de 0 a 8x / dia).

Com os blocos dentais seccionados ao centro podemos observar os aspectos histológicos descritos a seguir. Nas Figuras 9 e 10 quando utilizou-se tratamento sem sacarose e sacarose 2x, respectivamente, podemos verificar ausência de cárie. Enquanto que na Figura 11, tratamento sacarose 4x podemos observar o desenvolvimento da lesão de cárie; e na Figura 12, com tratamento sacarose 8x uma lesão de cárie mais acentuada.

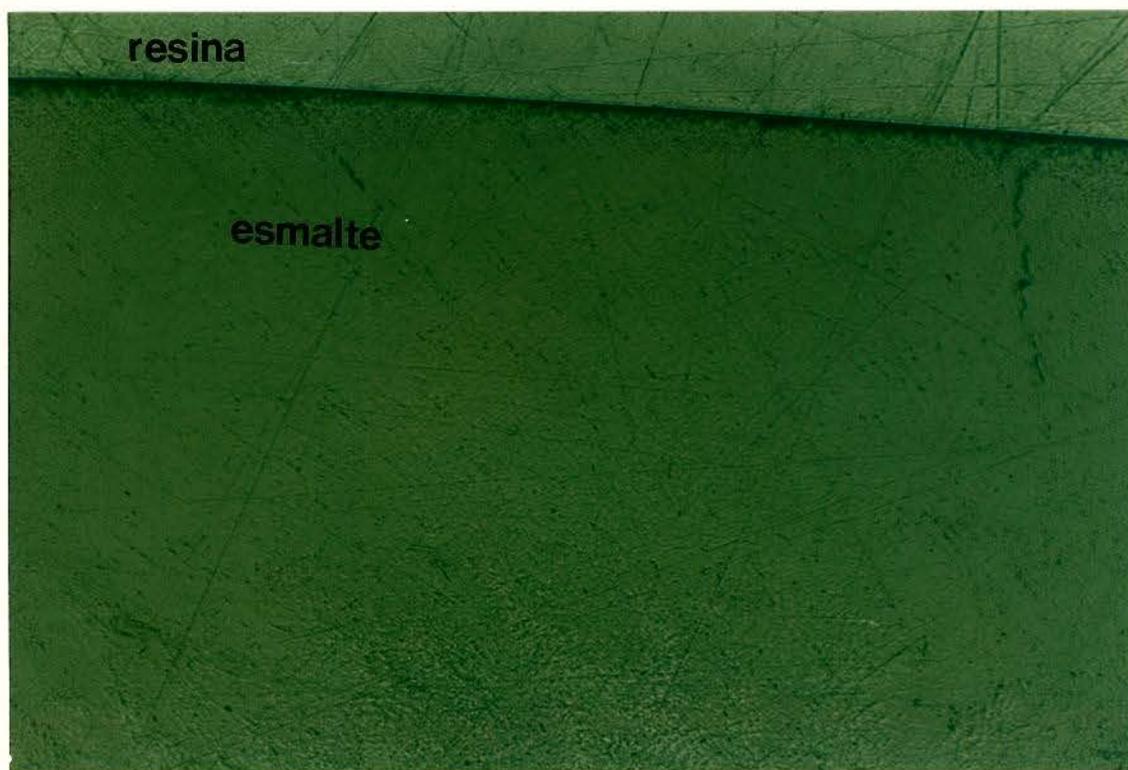


Figura 9 - Aspecto microscópico (x50) do
esmalte dental submetido ao tratamento 0 de sacarose



Figura 10 - Aspecto microscópico (x50) do esmalte dental submetido ao tratamento de Sacarose 2x /dia.

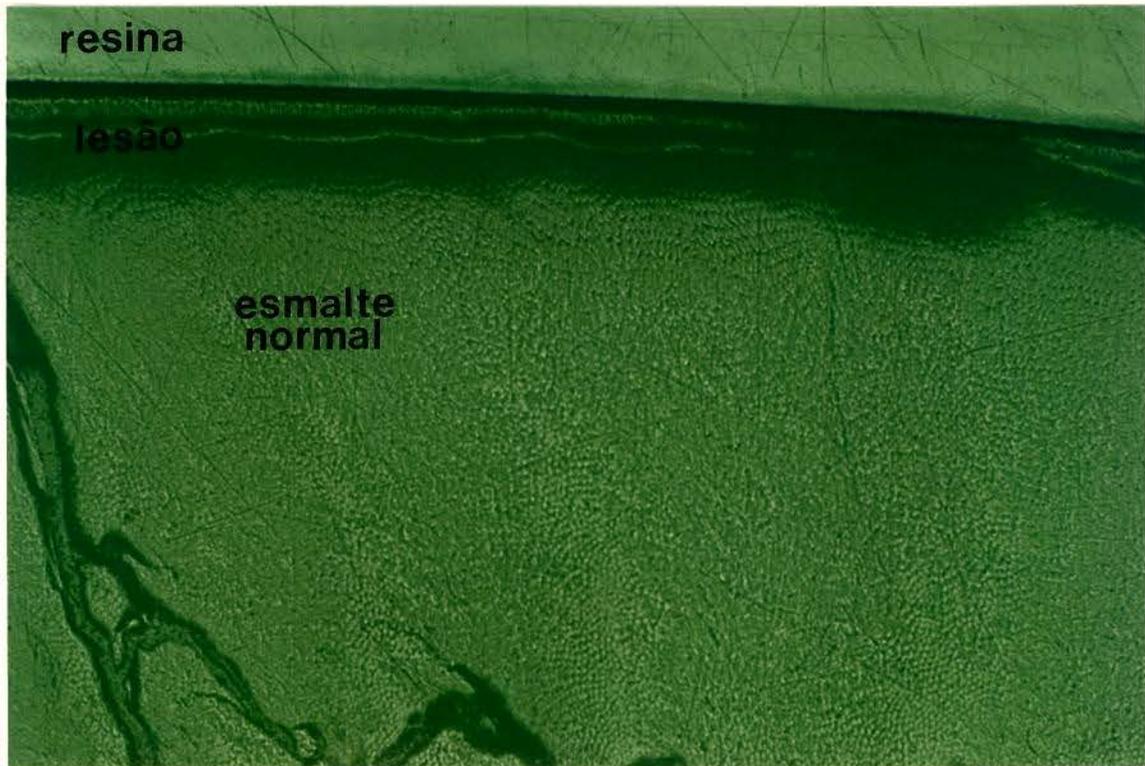


Figura 11 - Aspecto microscópico (x50) do esmalte dental submetido ao tratamento de Sacarose 4x /dia.



Figura 12 - Aspecto microscópico (x50) do esmalte dental submetido ao tratamento de Sacarose 8x /dia.

6. DISCUSSÃO

O desenvolvimento da cárie dental é função de condições físico-químicas subsaturantes do fluido da placa dental em relação ao produto de solubilidade do esmalte. Por outro lado a composição deste fluido deve refletir a constituição da placa dental, a qual depende das condições de como ela é formada (MANDEL 1974, GAWRONSKI *et al* 1975, ASHLEY 1975b, ASHLEY & WILSON 1977a, BRECX *et al* 1981, GAUGLER & BRUTON 1982, SHAW *et al* 1983, MORENO & MARGOLIS 1988, CURY 1989, TATEVOSSIAN 1990b, MARGOLIS & MORENO 1992, MARGOLIS *et al* 1993).

Os resultados do presente trabalho (Fig. 8, 9, 10, 11, 12) mostraram que o desenvolvimento de cárie foi função da frequência do uso de sacarose. Isto tem sido atribuído a predominância do fenômeno de Desmineralização em relação à Remineralização (GEDDES *et al* 1978, GUSTAFSON *et al* 1954), entretanto pouca atenção tem sido dada à composição e conseguinte propriedades da placa dental formada nestas condições.

Com relação ao peso da placa em função da frequência da utilização de sacarose (Tab.III) não foram ob-

servadas diferenças significativas, embora tenha havido tendência de maior peso quanto maior a frequência. Esta não diferença pode ser explicada pelo fato de que embora tenha sido permitido um acúmulo de placa por 28 dias, a espessura final foi limitada pela altura de 1 mm entre as superfícies dos blocos e a tela plástica que os protegia. Caso a espessura de placa não tivesse sido limitada, as diferenças seriam mais evidentes, pois reconhecidamente sacarose aumenta a quantidade de placa formada (MANDEL 1974, BRECX *et al* 1981, Mc NEE *et al* 1982, NEWBRUN 1989).

Entretanto, diferenças significativas nas concentrações de constituintes da placa foram observadas em função da frequência do uso de sacarose. Iniciando a discussão pelo íon flúor, observou-se uma redução significativa de ordem de 7x com o aumento da frequência da utilização de sacarose. Este dado não tem sido reportado na literatura e permite uma série de reflexões. Em primeiro lugar, as concentrações observadas quando da frequência de sacarose de 2 a 8x /dia estão de acordo com o relato na literatura internacional para região de água fluoretada (TATEVOSSIAN 1990a). Por outro lado, ao confirmar resultados anteriormente obtidos em Piracicaba (NOBRE DOS SANTOS & CURY, 1989) de 3,65 ppm F na placa dental de escolares bebendo água fluoretada, sugere que a ingestão de sacarose dos mesmos é maior que 2x /dia. A análise das alterações do esmalte em função da frequência do uso de sacarose (Figura 8), nos leva a su

por que o flúor da água é incapaz de impedir perda de mineral quando a placa não é removida e o consumo de açúcar é maior que 2x /dia. Por outro lado, partindo-se do suposto que as pessoas escovam os dentes, a associação da água fluoretada mais controle mecânico de placa deve resistir à maiores frequências de consumo de açúcar.

Ainda com relação a menor concentração de flúor na placa quanto maior a frequência da utilização de sacarose, isto indiretamente já foi relatado mas a causa era desconhecida. Deste modo, HARDWICK (1970) citado por JENKINS & EDGAR (1977), descreveu que a concentração de flúor da placa dental era menor quanto maior a quantidade de placa dos voluntários. Considerando que sacarose estimula a formação de placa, agora teríamos a explicação para o constatado no passado.

Deste modo, os resultados obtidos, nos fazem sugerir que uma placa dental formada quando da alta frequência do consumo de sacarose, teria em termos de flúor menores condições de suportar os desafios cariogênicos. Deve ser enfatizado que a concentração observada na placa quando do não uso de sacarose (Tab III) é suficiente para interferir com a ecologia da microbiota da placa (MARSH, 1990).

A respeito das concentrações de Ca e P na placa dental (Tab. IV e V) observou-se um decréscimo em função da maior frequência do uso de sacarose. Estes resultados estão de acordo com ASHLEY & WILSON (1977a), que mostraram em

adultos uma relação inversa entre as concentrações destes íons e a experiência dietética de açúcar dos mesmos. As concentrações de Ca e P na placa são extremamente importantes pois definirão se o esmalte sofrerá ou não desmineralização, quando da ingestão de carboidrato fermentável e produção de ácidos. Assim uma relação inversa entre as concentrações destes íons na placa (ASHLEY 1971, 1972, 1975b, ASHLEY & WILSON 1977a, GROBLER 1982, SHAW *et al* 1983) ou no seu fluido (TATEVOSSIAN 1990b, MARGOLIS 1990, MARGOLIS & MORENO 1992, MARGOLIS *et al* 1993) com a experiência de cárie tem sido relatada.

Deste modo, os dados do presente trabalho nos fazem sugerir que uma placa dental formada quando de alta frequência de consumo de sacarose, teria em termos de Ca e P menores condições de suportar os desafios cariogênicos.

Com relação à concentração de carboidratos encontrados na placa dental, em função da utilização de sacarose, os resultados obtidos devem ajudar a explicar o observado em relação a composição inorgânica. Do ponto de vista de estrutura da placa e por conseguinte suas propriedades, os componentes mais importantes são os carboidratos solúveis em álcali (insolúveis). Estes representam os polissacarídeos que dão estrutura a placa dental destacando-se os mutanos. Os resultados obtidos, mostram que houve uma tendência de maior concentração de carboidratos solúveis em álcali quanto maior a frequência da

utilização de sacarose, sendo observado o inverso com relação aos solúveis em ácido. ASHLEY & WILSON (1977a) observaram uma relação direta entre carboidratos totais da placa e uso prévio de açúcar na dieta, mas não em relação aos solúveis em álcali. Acreditamos que os resultados obtidos no presente trabalho são mais coerentes com o conhecimento atual da estrutura dos polissacarídeos da placa dental. Desse modo, a maior concentração de polissacarídeos solúveis em álcali (mutanos) levaria como consequência a uma placa dental mais cariogênica, pois segundo FU & ZERO (1991) que das mais acentuadas de pH ocorreriam na interface dente-placa. E ainda, DIBDIN & SHELLIS, 1988 e VAN HOUTE *et al* 1989, citados por MARGOLIS *et al* 1993, citam que o potencial acidogênico da placa dental *in vivo* pode também ser influenciado pelos polímeros que constituem parte da matriz da placa. Estes polímeros são produzidos especialmente pelos estreptococos do grupo mutans a partir da sacarose, e podem aumentar a porosidade da placa dental pelo aumento da distância interbacteriana e efetuando assim um aumento da difusão do substrato (sacarose). Um aumento na porosidade da placa pode, portanto, levar a um aumento na acidogênese bacteriana.

Por último, uma análise global dos resultados obtidos revela que quanto maior a frequência da utilização de sacarose leva a formação de uma placa dental com menor concentração inorgânica (Ca x P x F) e maior concentração de

polissacarídeo insolúvel. Deste modo, quando do uso de sacarose 8x /dia a placa apresenta 7x menos F, 10x menos P, 3x menos Ca e 3x mais polissacarídeos que a formada na ausência de sacarose. Assim, matematicamente em termos de peso, o aumento da massa da placa em termos de polissacarídeos, não explica isoladamente a redução proporcional iônica. Isto nos leva a sugerir que a diferença entre placas formadas na presença ou ausência de sacarose não está, exclusivamente em termos de cariogenicidade, na sua matriz de polissacarídeos. Eles por si só modificam as propriedades da placa, mas um fator adicional deve ser os componentes da placa que permitem um reservatório de íons protetores, cálcio, fosfato e principalmente flúor. Provavelmente a diferença esteja nas proteínas da matriz da placa dental formada na ausência ou presença de sacarose, o que deve ser objeto de outro estudo.

Deve ser enfatizado que o estudo aqui realizado foi o 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 as mesmas unidades experimentais são reutilizados no mesmo experimento. A característica que diferencia o "cross over" dos outros tipos de delineamento é que as medidas de tratamentos diferentes são obtidos de uma mesma unidade experimental.

Como principal vantagem, 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 recebam uma frequência controlada de sacarose.

7. CONCLUSÕES

- 1 - A placa dental formada na presença de sacarose apresenta uma menor concentração inorgânica (Ca, P, F) e menor concentração orgânica (polissacarídeo insolúvel) do que a formada na sua ausência;
- 2 - Em função da frequência do uso de sacarose forma-se uma placa dental com tendência para menor concentração inorgânica (Ca, P, F) e maior concentração orgânica (polissacarídeo insolúvel).
- 3 - A placa dental formada em função da frequência da utilização de sacarose teria menores condições físico-químicas de suportar desafios cariogênicos.

8. RESUMO

A cariogenicidade da placa dental deve ser função da sua composição. Pouco é conhecido sobre o efeito da frequência do uso de sacarose na composição da placa dental, particularmente em relação ao flúor. O delineamento experimental utilizado foi do tipo cruzado (4 x 4) realizado em 4 etapas de 28 dias. Doze voluntários utilizando dispositivos intra-orais palatinos, contendo 4 blocos de esmalte dental humano (3 x 3 mm), participaram deste estudo. Durante a 1^a etapa enquanto 03 voluntários não usaram sacarose, 03 gotejaram sobre os blocos de esmalte 2x /dia sacarose a 20%, 03 4x /dia e 03 8x /dia. Após cada etapa a placa dental formada sobre os blocos foi coletada para análise. Os voluntários bebiam água fluoretada a 0,7 ppm e usaram dentifrício não fluoretado. A placa dental foi pesada e após extração com HCl 0,5 M, foram determinadas as concentrações solúveis de Ca, P, F e carboidrato total. O precipitado foi extraído com NaOH N determinando-se a concentração de carboidrato total. Os resultados obtidos (média ± erro padrão) mostraram respectivamente em função da frequência do uso de sacarose (de 0 a 8x /dia): F⁻ (18,71 ± 3,31 ; 9,64 ± 2,81 ; 2,65 ± 0,77 ; 2,69 ± 0,44 em µg/g) ;

P ($3,74 \pm 1,12$; $0,75 \pm 0,19$; $0,37 \pm 0,06$; $0,37 \pm 0,04$ em mg/g) ; Ca^{++} ($12,85 \pm 2,51$; $3,99 \pm 1,02$; $4,01 \pm 1,09$; $4,17 \pm 1,07$ em mg/g). A análise estatística mostrou que a frequência do consumo de sacarose reduz significativamente ($p < 0,05$) as concentrações de Ca^{++} , P e F^{-} de placa e aumenta a de carboidrato solúvel em álcali. Conclui-se que a placa dental formada em função da frequência do uso de sacarose tem menor capacidade de resistir ao desafio cariogênico.

SUMMARY

Sugar intake modify the composition of dental plaque, but there are doubts about the concentration of inorganic substances and few data about fluoride, mainly related to frequency of sucrose exposure. To evaluate this, it was performed a crossover study in four phases of 28 days. Twelve volunteers using acrylic palatal appliances, containing 4 blocks (3 x 3 mm) of dental enamel took part in this study. During each phase while 03 volunteers didn't use sucrose, 03 dropped on the enamel blocks 2x/day sucrose 20%, 03 4x/day and 03 8x/day. After each phase the dental plaque formed on the blocks was collected for analysis. The volunteers were drinking fluoridated water 0.7 ppm and used a non-fluoride dentifrice. Dental plaque was weighed and after extraction with HCl 0.5M the soluble concentrations of Ca, P, F and total carbohydrate were determined. The precipitate was extracted with NaOH and the alkali soluble carbohydrate concentration was determined. The results (mean \pm sd) related to sucrose frequency (from zero to 8x/day) were respectively FC(18.71 \pm 3.31; 9.64 \pm 2.81; 2.65 \pm 0.77; 2.69 \pm 0.44 in μ g/g); PC(3.74 \pm 1.12; 0.75 \pm 0.19; 0.37 \pm 0.06; 0.37 \pm 0.04 in mg/g); Ca (12.85 \pm 2.51; 3.99 \pm 1.02; 4.01 \pm 1.09; 4.17 \pm 1.07 in mg/g); carbohydrate acid soluble (5.65 \pm 0.68; 3.78 \pm 0.63; 3.56

± 0.60 ; 4.75 ± 0.73 $\mu\text{g}/\text{mg}$); carbohydrate alkali-soluble (12.00 ± 2.60 ; 11.54 ± 1.81 ; 13.95 ± 3.29 ; 35.84 ± 6.93 $\mu\text{g}/\text{mg}$). Statistical analyses showed that frequency of sucrose consumption reduced significantly ($p \leq 0.05$) the dental plaque Ca, P and F concentrations and increased the carbohydrate alkali-soluble concentration. It was concluded that as the frequency of sucrose exposure increases, more cariogenic will be the dental plaque formed.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUS, H. M., SCHAMSCHULA, R. G., BARMES, D. E., BUNZEL, M.
Associations between the total fluoride content of dental
plaque and individual caries experience in Australian
children. Community Dent. Oral Epidemiol., Copenhagen, v.4,
n.5, p.210-4, 1976.

AGUS, H. M., UN, P. S., COOPER, M. H., SCHAMSCHULA, R. G. Ionized and
bound fluoride in resting and fermenting dental plaque and
individual human caries experience. Archs. Oral Biol.
Oxford, v.25, n.8-9, p.517-22, 1980.

ASHLEY, F. P. Effects of single exposure to sugar on calcium
and phosphorus concentrations of dental plaque. J. Dent.
Res., Washington, v.54, n.5, p.1015-8, Sep-Oct 1975.

_____. Calcium and Phosphorus concentration of dental
plaque related to dental caries in 11 to 14-year-old male
subjects. Caries Res., Basel, v.9, p.351-362, 1975.

_____. Relationships between dietary sugar intake,
parotid saliva, plaque calcium, and phosphorus concentra-
tions and caries. J. Dent. Res., Washington, v.50, n.5,
p.1212, 1971.

_____. Relationship of diet, saliva, plaque and caries. J. Dent. Res., Washington, v.51, n.5, p.1234, 1972.

ASHLEY, F.P., WILSON, R.F. Dental plaque and caries. A 3-year longitudinal study in children. Br. Dent. J., London, v.142, n.3, p.85 - 91, 1977b.

_____. The relationship between dietary sugar experience and the quantity and biochemical composition of plaque in man. Archs. Oral Biol., Oxford v.22, p. 409 - 414, 1977a.

BENELLI, E. M., SERRA, M.C., RODRIGUES Jr., A.L., CURY, J.A. An in situ study of glass ionomer cement anticariogenic potencial. Caries Res., Basel, v.27, p.280 - 284, 1993.

BRECK, M., THEILADE, J., ATTSTRÖM, R. Ultrastructural estimation of the effect of sucrose and glucose rinses on early dental plaque formed on plastic films. Scand. J. Dent. Res. Oslo, v.89, p.157-164, 1981.

CARLSSON, J. Metabolic activities of oral bacteria

- In: THYLSTRUP, A & FEJERSKOV, O. Textbook of Cariology, Munksgaard, Copenhagen ,p.74-98, 1986.
- CURY, J. A. Uso de flúor. In: BARATIERI, L. N. et al. Dentística: procedimentos preventivos e restauradores. São Paulo, Quintessence, p.43-67, 1989.
- DUBOIS, M., GILLES, K. A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A., SMITH, F. Colorimetric method for determinations of sugars and related substances. Analyt. Chem., v.28, p.350-356, 1956.
- FEATHERSTONE, J. D. B., ZERO, D.T. An in situ model for simultaneous of demineralization and enhancement of remineralization. J. Den. Res., Washington, v.71 (Sp iss), p. 804-810, 1992.
- FISKE, C. M., SUBBAROW, Y. The colorimetric determination of phosphorus. J. Biol. Chem., Baltimore, v.86, n.2, p.375-400, 1925.
- FRY, A. J. and GRENBY The effects 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, p.873-882, 1972.

FU, J., ZERO, K. M., ANNE, K. M., DASS, A. Effect of plaque thickness on glucose retention and acid productions. J. Dent. Res., Washington, v.70, Spec.iss., Abstracts 1815, 1991.

GAUGLER, R. W., BRUTON, W. F. Fluoride concentration in dental plaque of naval recruits with and without caries. Archs. Oral Biol., Oxford, v.22, n.4, p.269-272, 1982.

GAWRONSKI, T. H., STAAT, R. A., ZAKI, H. A., HARRIS, R. S., FOLKE, L. E. A. Effects of dietary sucrose levels on extracellular polysaccharide metabolism of human dental J. Dent. Res., Washington, v.54, n.4, p.881-890, 1975.

GEDDES, D. A. M., COOKE, J. A., EDGARD W. M., JENKINS, G. N. The effect of frequente sucrose mouthrinsing on the induction *in vivo* of caries-likes changes in human dental enamel. Archs. Oral Biol. vol.23, pp. 663-665, 1978.

GROBLER, S. R., REDDY, J. VAN WIK, C. W. Calcium, phosphorus, fluoride, and pH levels of human Dental Plaque from areas of varying fluoride levels J. Dent. Res. Washington, v.61, n.8, p.986-988, 1982.

GUGGENHEIM, B. Extracellular polysaccharides and microbial

- plaque. Int. Dent. J., Surrey, v.20, n.4, p.657-678, 1970.
- GUSTAFSON, B. E., QUENSEL, C. E., LANKE, L. S., LUNDQVIST, C., GRAHNEN, H., BONOW, B. E., KRASSE, B. The Vipeholm Dental Caries Study. The effect of different levels of carbohydrate intake on caries activity in 438 individuals observed for five years. Acta Odontol. Scand., Oslo, v.11, p.232-364, 1954.
- JENKINS, G. N. Pellicle, plaque and calculus. The physiology and biochemistry of the mouth. 4.ed. Oxford, Blackwell, p.360-413, 1978.
- JENKINS, G. N., EDGAR, W. M. Distribution and forms of F in saliva e plaque. Caries Res., Basel, v.11 (suppl.1), p.226-237, 1977.
- JONES, B., KENWARD, C. Design and analysis of cross over trials. London, Chapman and Hall, p.340, 1989.
- McNEE, S. G. GEDDES, D. A. M., WEETMAN, D. A., SWEENEY, D. BEELEY, J. A. Effect of extracelular polysaccharides on diffusion of NaF and (14 C) - sucrose in human dental plaque and in sediments of the bacterium Streptococcus sanguis. Archs. Oral Biol., Oxford, v.27, p.981-986, 1982.

MAKINEN, K. K. SODERLING, E., HURTTIA, H., LEHTONEN, O.P.,
LUUKKALA, E. Biochemical, microbiologic, and clinical
comparisons between two dentifrices that contain
different mixtures of sugar alcohols. J. Am. Dent.
Assoc., Chicago, v.111, p.745 - 750, 1985.

MANDEL, I. D. Relation of saliva and plaque to caries.
J. Dent. Res., Washington, v.53, suppl.2,p.246-271, 1974.

MARGOLIS, H.C. An assessment of recent advances in the study
of the chemistry and biochemistry of dental plaque fluid.
J. Dent. Res., Washington, v.69, n.6, p.1337-1342, 1990.

MARGOLIS, H.C., ZHANG, Y. P., VAN HOUTE, J., MORENO, E. C.
Effect of sucrose concentration on the cariogenic
potential of pooled plaque fluid from caries - free and
caries - positive individuals. Caries Res., Basel,
v.27,p.467-473, 1993.

MARGOLIS, M.C., DUCKWORTH, J.H., MORENO, E.C. Compositions of
pooled resting plaque fluid from caries-free and caries-
susceptible individuals. J. Dent. Res., Washington,
v.67,n.12, p.1468-1475, 1988.

MARGOLIS, H.C., MORENO, E.C. Compositions of pooled plaque

fluid from caries-free and caries-positive individuals following sucrose exposure. J. Dent. Res., Washington, v.71. n.11, p.1776-1784, 1992.

MARSH, P.D., BRADSHAW, D.J. The effect of fluoride on the stability of oral bacterial communities *in vitro*. J. Dent. Res., Washington, v.69, Spec.iss., p.668-671, february, 1990.

MORENO, E. C., MARGOLIS, H. C. Composition of human plaque fluid. J. Dent. Res., Washington, v.67, n.9, p.1181-1189, septembre, 1988.

NEWBRUN, E. Cariology. Chicago, Quintessence, p.115-120, 1989.

NIKIFORUK, G. Understanding dental caries. Basel: Karger, p.122-143, 1985.

NOBRE DOS SANTOS, M., CURY, J. A. Dental Plaque Fluoride is lower after discontinuation of water fluoridation. Caries Res., Basel, v.22, p.318-317, 1988.

RÖLLA, G., BOWEN, W. H. Concentration of fluoride in plaque - a possible mechanism. Scand. J. Dent. Res., Oslo, v.85, p.149-151, 1977.

RÖLLA, G., SCHEIE, A. A., CIARDI, J. E. Role of Sucrose in plaque formation. Scand J. Dent. Res., Oslo, v.93, p.105-111, 1985.

SCHAMSCHULA, R. G., AGUS, H., BUNZEL, M., ADKINS, B.L., BARMES, D.E.. The concentrations of selected major and trace minerals in human dental plaque. Archs. Oral Biol., Oxford, v.22, p. 321-325, 1977.

SHAW, L., MURRAY, J. J., BURCHELL, C. K., BEST, J.S.. Calcium and phosphorus content of plaque and saliva in relation to dental caries. Caries Res., Basel, v.17, p.543-548,1983.

SCHEININ, A. The effect of various sugar on the formation and chemical composition of dental plaque Ind. Dent. J., Surrey, v.21, n.3, p.302-321, 1971.

SKINNER, A., CONNOLLY, P., NAYLOR, M. N. The influence of the replacement of dietary sucrose by maltose on the formation and biochemistry of human dental plaque. Archs. Oral Biol., Oxford, v.27, n.7, p.603-8, 1982.

TATEVOSSIAN, A. J. Fluoride in dental plaque and its

effects . J. Dent. Res., Washington, v. 69 Spec. iss, p. 645-683, 1990.

TATEVOSSIAN, A. Facts and artefacts in research on human dental plaque fluid. J. Dent. Res. , Washington, v. 69, n. 6, p. 1309-1315, 1990 b.

TATEVOSSIAN, A., GOULD, C. T. The kinetics of inorganic phosphate in human dental plaque and saliva. Archs. Oral Biol., Oxford, v. 24, p. 461-466, 1979.

WYCOFF, S. J., MORRIS, M. E., NEWBRUN, E. The effect of mouthrinse containing calcium glucerophosphate on the chemical composition and development of plaque in human. J. Dent. Res., Washington, v. 59, n. 1, p. 23-8, 1980.

10 - ANEXOS

ANEXO I

ESTUDO *in situ* DA COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DA PLACA DENTAL EM FUNÇÃO DA FREQUÊNCIA DIÁRIA DO USO DE SACAROSE.

INSTRUÇÕES AOS VOLUNTÁRIOS

- 1 - O estudo será dividido em 4 etapas. Sendo cada etapa de 28 dias e com intervalo de 1 semana.
- 2 - A água ingerida deverá ser necessariamente de abastecimento público de Piracicaba.
- 3 - Durante o período do experimento e uma semana antes de cada etapa não utilizar nenhum produto contendo flúor, exceto água.
- 4 - Os dispositivos intra-orais deverão ser utilizados durante todo o dia, inclusive para dormir, exceto durante as refeições e higiene oral, sendo nestes períodos os aparelhos acondicionados na caixa plástica fornecida, contendo no seu interior um algodão umedecido.
- 5 - A escovação habitual deverá ser feita apenas com o dentifrício fornecido. Os dispositivos devem ser higienizados, escovando-se a parte interna dos mesmos.
- 6 - Será fornecida uma solução de sacarose 20%, da qual se colocará 01 gota sobre cada bloco de esmalte contido no dispositivo intra-oral, esperar 5 minutos e colocá-lo na boca. Este procedimento deverá ser feito (n) vezes ao dia, de acordo com o delineamento experimental, como segue abaixo:

0 - sem sacarose
2x - 8:00h 20:00h
4x - 8:00h 11:00h 15:00h 18:00h
8x - 8:00h 9:30h 11:00h 14:00h
15:30h 17:00h 19:00h 21:00h

7 - Os voluntários atestam que estão participando espontaneamente desta pesquisa.

ANEXO II

Tabela VII- Peso da Placa Dental (mg)

Grupos (i)	Indivd (m)	Período (j)			
		1	2	3	4
1	A	T1= 16,12	T2= 9,50	T3= 16,58	T4= *
	B	T1= 8,28	T2= 8,80	T3= 11,28	T4= 7,90
	C	T1= 14,50	T2= 9,14	T3= 30,25	T4= 8,57
2	D	T2= 7,65	T3= 11,72	T4= 3,73	T1= 9,48
	E	T2= 6,34	T3= 8,30	T4= 12,70	T1= 4,09
	F	T2= 17,19	T3= 12,21	T4= 10,63	T1= 23,28
3	G	T3= 7,28	T4= *	T1= 16,56	T2= *
	H	T3= 5,53	T4= *	T1= 2,93	T2= 0,84
	I	T3= 1,16	T4= 3,70	T1= 9,15	T2= 6,03
4	J	T4= 9,96	T1= 16,62	T2= 31,26	T3= 33,33
	K	T4= 5,18	T1= 3,18	T2= *	T3= 2,81
	L	T4= 7,44	T1= 21,98	T2= 4,60	T3= 5,60

* não quantificado

Tabela VIII- Dosagem de F^- na placa dental ($\mu g F^-/g$)

Grupos (i)	Indivd (m)	Período (j)			
		1	2	3	4
1	A	T1= 2,57	T2= 1,16	T3= 4,58	T4= *
	B	T1= 4,80	T2= 0,29	T3= 1,38	T4= 33,41
	C	T1= 2,85	T2= 1,54	T3= 0,71	T4= 27,53
2	D	T2= 4,93	T3= 5,20	T4= 13,48	T1= 1,79
	E	T2= 6,77	T3= 5,08	T4= 14,64	T1= 3,44
	F	T2= 2,52	T3= 1,01	T4= 0,84	T1= 0,88
3	G	T3= 17,44	T4= *	T1= 1,25	T2= *
	H	T3= 12,57	T4= *	T1= 5,73	T2= *
	I	T3= 24,83	T4= 20,56	T1= 1,96	T2= 1,63
4	J	T4= 17,47	T1= 2,54	T2= 0,24	T3= 1,37
	K	T4= 27,99	T1= 3,77	T2= *	T3= 12,38
	L	T4= 12,45	T1= 0,69	T2= 4,82	T3= 29,10

* não quantificado

Tabela IX - Dosagem de Fósforo na placa (mg P/g)

Grupos (i)	Indivd (m)	Período (j)			
		1	2	3	4
1	A	T1= 0,36	T2= 0,36	T3= 0,44	T4= *
	B	T1= 0,48	T2= 0,34	T3= 0,35	T4= 6,68
	C	T1= 0,74	T2= 0,19	T3= 0,19	T4= 3,54
2	D	T2= 0,50	T3= 0,28	T4= 1,06	T1= 0,35
	E	T2= 0,50	T3= 0,29	T4= 1,99	T1= 0,29
	F	T2= 0,19	T3= 0,30	T4= 0,39	T1= 0,47
3	G	T3= 0,86	T4= *	T1= 0,30	T2= *
	H	T3= 0,56	T4= *	T1= 0,42	T2= *
	I	T3= 1,97	T4= 1,23	T1= 0,31	T2= 0,23
4	J	T4= 9,58	T1= 0,39	T2= 0,28	T3= 0,30
	K	T4= 7,62	T1= 0,10	T2= *	T3= 1,64
	L	T4= 1,56	T1= 0,24	T2= 0,77	T3= 1,84

* não quantificado

TABELA X - Dosagem de Cálcio na Placa (mg Ca/g)

Grupos (i)	Indivd (m)	Período (j)			
		1	2	3	4
1	A	T1= 4,10	T2= 2,30	T3= 1,50	T4= *
	B	T1= 5,70	T2= 1,70	T3= 1,60	T4=21,10
	C	T1= 6,30	T2= 2,60	T3= 0,80	T4=11,40
2	D	T2=10,60	T3= 1,50	T4=11,70	T1= 2,00
	E	T2= *	T3= 3,60	T4= 8,90	T1= 3,80
	F	T2= 5,20	T3= 3,10	T4= 2,40	T1= 1,40
3	G	T3= 8,10	T4= *	T1= 1,40	T2= *
	H	T3= 4,20	T4= *	T1=14,00	T2= *
	I	T3= *	T4= 7,20	T1= 2,10	T2= 3,40
4	J	T4= 23,30	T1= 1,10	T2= 0,90	T3= 0,80
	K	T4= *	T1= 6,80	T2= *	T3= 9,10
	L	T4= 16,80	T1= 1,40	T2= 5,40	T3= 9,60

* não quantificado

Tabela XI - Carboidrato Total Solúvel em ÁCIDO ($\mu\text{g} / \text{mg}$)

Grupos (i)	Indivd (m)	Período (j)			
		1	2	3	4
1	A	T1= 3,25	T2= 2,25	T3= 2,48	T4= *
	B	T1= 4,72	T2= 3,49	T3= 3,99	T4= 5,82
	C	T1= 2,72	T2= 3,44	T3= 2,91	T4= 7,12
2	D	T2= 1,00	T3= 1,83	T4= 9,65	T1= 8,55
	E	T2= 3,53	T3= 3,53	T4= 4,70	T1= 8,17
	F	T2= 5,91	T3= 3,27	T4= 6,29	T1= 5,17
3	G	T3= 2,19	T4= *	T1= 2,29	T2= *
	H	T3= 2,08	T4= *	T1= 7,02	T2= *
	I	T3= 5,51	T4= 5,21	T1= 3,37	T2= 4,57
4	J	T4= 2,31	T1= 1,89	T2= 1,60	T3= 2,66
	K	T4= 5,68	T1= 7,86	T2= *	T3= 5,35
	L	T4= 4,12	T1= 1,98	T2= 6,29	T3= 9,55

* não quantificado

Tabela XII - Carboidrato Total Solúvel em ÁLCALI ($\mu\text{g} / \text{mg}$)

Grupos (i)	Indivd (m)	Período (j)			
		1	2	3	4
1	A	T1= 63,98	T2= 8,00	T3= 8,35	T4= *
	B	T1= 41,02	T2= 31,37	T3=12,53	T4= 5,57
	C	T1= 7,70	T2= 17,25	T3=18,73	T4= 5,92
2	D	T2= 25,25	T3= 14,62	T4=27,22	T1= 27,00
	E	T2= 12,79	T3= 10,25	T4=15,09	T1= 11,32
	F	T2= 15,25	T3= 11,87	T4=17,65	T1= 22,30
3	G	T3= 6,44	T4= *	T1=31,67	T2= *
	H	T3= 4,99	T4= *	T1=14,69	T2= 2,61
	I	T3= *	T4= 17,25	T1=76,54	T2= 1,04
4	J	T4= 7,38	T1= 50,75	T2= *	T3=24,91
	K	T4= 3,15	T1= 68,62	T2= *	T3= 8,18
	L	T4= 8,79	T1= 14,50	T2= 11,99	T3= 6,10

* não quantificado