

ALMENARA DE SOUZA FONSECA SILVA

INFLUÊNCIA DE CARBOIDRATOS NA FERMENTAÇÃO E NA SÍNTESE
DE POLISSACARÍDEOS EXTRACELULARES INSOLÚVEIS PELA
PLACA DENTÁRIA *IN VITRO*. AÇÃO DO ÍON CITRATO.

Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba, da
Universidade Estadual de Campinas,
para obtenção do Grau de Mestre
em Ciências, Área de Fisiologia e
Biofísica do Sistema Estomatognático.

PIRACICABA - SP

1997

Si38i

31011/BC

ALMENARA DE SOUZA FONSECA SILVA

INFLUÊNCIA DE CARBOIDRATOS NA FERMENTAÇÃO E NA SÍNTESE
DE POLISSACARÍDEOS EXTRACELULARES INSOLÚVEIS PELA
PLACA DENTÁRIA *IN VITRO*. AÇÃO DO ÍON CITRATO.

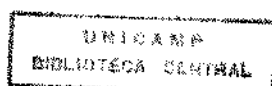
Esta exemplar foi devidamente
registrado, conforme resolução
CC 76/1036/83.
Piracicaba 15 de maio de 1997.
Ass: *Car. W. M. M.*

Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba, da
Universidade Estadual de Campinas,
para obtenção do Grau de Mestre
em Ciências, Área de Fisiologia e
Biofísica do Sistema Estomatognático.

Orientador:
Prof. Dr. Carlos Eduardo Pinheiro
FOP - UNICAMP

PIRACICABA - SP

1997



9108162

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	8138i
V.	8138i
1.º N.º	31011
2.º N.º	281/97
0	☐
0	☒
P.º 00	8138i
DATA	12/08/97
N.º CDD	

CM-00 099 50 2- 7

Ficha Catalográfica Elaborada pela Biblioteca da FOP/UNICAMP

S38i Silva, Almenara de Souza Fonseca.
Influência de carboidratos na fermentação e na síntese de polissacarídeos extracelulares insolúveis pela placa dentária *in vitro*. Ação do íon citrato / Almenara de Souza Fonseca Silva. - Piracicaba : [s.n.], 1997.
104f. : il.
Orientador : Carlos Eduardo Pinheiro.
Tese (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.
1. Placas dentárias. 2. Carboidratos. 3. Polissacarídeos. 4. Fermentação. I. Pinheiro, Carlos Eduardo. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

19.CDD - 617.632
- 574.192 94
- 547.782
- 612.015 1

Índices para o Catálogo Sistemático

1. Placas dentárias	617.632
2. Carboidratos	574.192 94
3. Polissacarídeos	547.782
4. Fermentação	612.015 1



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de **Mestrado**, em sessão pública realizada em 11/04/97, considerou o candidato aprovado.

1. Carlos Eduardo Pinheiro

A handwritten signature in cursive script, appearing to read "Carlos Eduardo Pinheiro", written over a horizontal line.

2. Enilson Antonio Sallum

A handwritten signature in cursive script, appearing to read "Enilson Antonio Sallum", written over a horizontal line.

3. Maria Cecília Ferraz de Arruda Veiga

A handwritten signature in cursive script, appearing to read "Maria Cecília Ferraz de Arruda Veiga", written over a horizontal line.

Aos meus pais, Milton e Lourdes, a quem devo tudo,
minha eterna gratidão.

À minha filha Rafaela, por constituir minha força.

Ao Leandro, pelos constantes momentos de
estímulo e apoio.

dedico este trabalho.

Dedico, ainda, de modo especial,

ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Pinheiro, não só
pela orientação segura, mas também pelos exemplos
de dedicação ao ensino e amor à ciência.

AGRADECIMENTOS

Aos Professores Doutores ALCIDES GUIMARÃES, MARIA CECÍLIA FERRAZ DE ARRUDA VEIGA, CLÁUDIA HERRERA TAMBELI, FERNANDA KLEIN MARCONDES e professores colaboradores do Curso de Mestrado em Fisiologia e Biofísica do Sistema Estomatognático pelo incentivo, orientação e amizade.

À Professora Doutora SÔNIA VIEIRA, pela orientação na elaboração da análise estatística.

Ao Professor Doutor JAIME APARECIDO CURY, por nos permitir a utilização do Laboratório de Bioquímica da FOP-UNICAMP.

Ao Sr. CARLOS ALBERTO APARECIDO FELICIANO, técnico de laboratório, pela colaboração e atenção dispensada durante a execução deste trabalho.

À Sra. LUZIA DE FÁTIMA DA SILVA, pela correção das referências bibliográficas.

À Sra. VERA MARIA BARBOSA LUPORINI, pela revisão do texto.

A MILTON DE SOUZA JR., meu irmão, pela sua colaboração valiosa e apoio.

Aos Professores Doutores ARNALDO POMILIO e WALTER MACHADO DE CAMPOS JR., possibilitando-me ingressar na carreira universitária, pela confiança em mim depositada que só poderá ser retribuída pela minha lealdade.

Aos colegas LUCIANE, EGÍDIO, LINÁH, ROGÉRIO e aos companheiros de curso, pela amizade e pelos momentos agradáveis que compartilhamos.

Às Sras. SHIRLEY ROSANA SBRAVATTI MORETO e MIRIS CRISTINA RECCHIA, pela atenção e amizade à minha pessoa.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram na execução deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS E ABREVIATURAS.....	ix
RESUMO	xi
1 - INTRODUÇÃO	1
2 - REVISÃO DA LITERATURA	12
2.1 - Metabolismo Bacteriano	13
2.2 - Ocorrência do Citrato nos Tecidos Mineralizados e sua Relação com Cárie	37
3 - MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1 - Coleta de Placa	43
3.2 - Preparo da Suspensão de Placa Dentária	43
3.3 - Fermentação	44
3.4 - Síntese de Polissacarídeos Extracelulares Insolúveis	45
3.5 - Concentrações dos Carboidratos utilizados na Análise de Fermentação	47
3.6 - Concentrações dos Carboidratos utilizados na Análise da Síntese de Polissacarídeos Insolúveis	47
4 - RESULTADOS	49
5 - DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	75
6 - CONCLUSÃO	88
SUMMARY	90
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92

LISTA DE TABELAS

P.

TABELA 1 - Fermentação de carboidratos pela placa dentária <i>in vitro</i> , na ausência de citrato-----	51
TABELA 2 - Fermentação de carboidratos pela placa dentária <i>in vitro</i> , na presença de 50 mM de citrato-----	52
TABELA 3 - Fermentação de carboidratos pela placa dentária <i>in vitro</i> , na presença de 100 mM de citrato-----	53
TABELA 4 - Análise de variância dos resultados de fermentação na ausência e na presença do íon citrato-----	57
TABELA 5 - Comparação dos valores médios de fermentação de carboidratos na ausência de citrato-----	58
TABELA 6 - Comparação dos valores médios de fermentação de carboidratos na presença de 50 mM de citrato-----	58
TABELA 7 - Comparação dos valores médios de fermentação de carboidratos na presença de 100 mM de citrato-----	59
TABELA 8 - Comparação dos valores médios de fermentação de glicose em diferentes concentrações de citrato-----	59
TABELA 9 - Comparação dos valores médios de fermentação de sacarose em diferentes concentrações de citrato-----	60
TABELA 10 - Comparação dos valores médios de fermentação de frutose em diferentes concentrações de citrato-----	60

TABELA 11- Comparação dos valores médios de fermentação de dextrina em diferentes concentrações de citrato-----	61
TABELA 12 - Síntese de PEI pela placa dentária <i>in vitro</i> , na presença de carboidratos e ausência de citrato-----	64
TABELA 13 - Síntese de PEI pela placa dentária <i>in vitro</i> , na presença de carboidratos e citrato 50 mM-----	65
TABELA 14 - Síntese de PEI pela placa dentária <i>in vitro</i> , na presença de carboidratos e citrato 100 mM-----	66
TABELA 15 - Análise de variância dos resultados de Síntese de PEI na presença de carboidratos e na ausência e presença do íon citrato-----	70
TABELA 16 - Comparação dos valores médios de síntese de PEI na presença de carboidratos e ausência de citrato-----	71
TABELA 17 - Comparação dos valores médios de síntese de PEI na presença de carboidratos e citrato 50 mM-----	71
TABELA 18 - Comparação dos valores médios de síntese de PEI na presença de carboidratos e citrato 100 mM-----	72
TABELA 19 - Comparação dos valores médios de síntese de PEI, na presença de glicose em diferentes concentrações de citrato-----	72
TABELA 20 - Comparação dos valores médios de síntese de PEI, na presença de sacarose em diferentes concentrações de citrato-----	73
TABELA 21 - Comparação dos valores médios de síntese de PEI, na presença de frutose em diferentes concentrações de citrato-----	73

Tabela 22 - Comparação dos valores médios de síntese de PEI,
na presença de dextrina em diferentes concentrações de
citrato-----74

LISTA DE FIGURAS E ABREVIATURAS

P.

- FIGURA 1 - Valores médios da fermentação da glicose, sacarose, frutose e dextrina pela placa dentária *in vitro*, na ausência de citrato-----54
- FIGURA 2 - Valores médios da fermentação da glicose, sacarose, frutose e dextrina pela placa dentária *in vitro*, na presença de 50 mM de citrato-----55
- FIGURA 3 - Valores médios da fermentação da glicose, sacarose, frutose e dextrina pela placa dentária *in vitro*, na presença de 100 mM de citrato-----56
- FIGURA 4 - Valores médios de fermentação pela placa dentária *in vitro*, segundo a concentração de citrato para cada carboidrato-----61
- FIGURA 5 - Valores médios de síntese de PEI pela placa dentária *in vitro*, na presença de glicose, sacarose, frutose e dextrina e ausência de citrato-----67
- FIGURA 6 - Valores médios de síntese de PEI pela placa dentária *in vitro*, na presença de glicose, sacarose, frutose e dextrina e citrato 50 mM-----68
- FIGURA 7 - Valores médios de síntese de PEI pela placa dentária *in vitro*, na presença de glicose, sacarose, frutose e dextrina e citrato 100 mM-----69

FIGURA 8 - Valores médios de síntese de PEI, pela placa dentária

in vitro, segundo a concentração de citrato, para cada

carboidrato-----74

CPOD-----dentes cariados, perdidos e obturados

PEI-----polissacarídeo extracelular insolúvel

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo verificar a influência de carboidratos freqüentemente consumidos na dieta, como glicose, sacarose, frutose e dextrina, na fermentação e na síntese de polissacarídeos extracelulares insolúveis pela placa dentária *in vitro* e a inibição destas atividades metabólicas promovida pelo íon citrato.

Para tal, foi utilizada uma suspensão de placa dentária (10 mg / ml de tampão fosfato 0,01 pH 7,0), que foi incubada na presença dos substratos a 37°C, durante 2 horas para fermentação e 18 horas para a síntese de polissacarídeos extracelulares insolúveis (PEI).

A fermentação foi medida por titulação com solução de NaOH 0,05N. A avaliação da síntese de PEI foi realizada pela dosagem de carboidratos totais. O citrato de sódio foi acrescentado aos meios de incubação, nas concentrações de 50 e 100 mM.

Os resultados demonstraram que a glicose produziu a maior quantidade de ácidos e a sacarose sintetizou a maior quantidade de polissacarídeos extracelulares insolúveis, quando

comparados com os outros carboidratos. O íon citrato foi capaz de inibir significativamente a fermentação e a síntese de polissacarídeos extracelulares insolúveis.

PALAVRAS-CHAVE:

Placa dental - Fermentação - Síntese de polissacarídeos insolúveis - Carboidratos - Citrato

1- INTRODUÇÃO

A placa dentária é definida como uma agregação heterogênea de microrganismos sobre a superfície dos dentes, organizando-se em sítios, que possuem um ambiente dinâmico (THEILADE⁸⁸, 1977; LISTGARTEN⁴⁵, 1988; MORHART & FITZGERALD⁵³, 1976).

Sendo assim, tem despertado muito o interesse dos pesquisadores, nos últimos anos, sobretudo por ser considerada o principal agente etiológico das cáries e doenças periodontais.

O papel da placa no desenvolvimento da doença periodontal foi evidenciado pela indução experimental de gengivite por meio da eliminação dos métodos de higiene oral, permitindo acúmulo de bactérias na superfície do dente (LOE et al⁴⁶, 1965), quando há o crescimento da microbiota residente, podendo ocorrer alterações inflamatórias dos tecidos gengivais, em resposta à toxicidade dos produtos bacterianos como enzimas, toxinas e metabólitos finais, que causam injúria ao tecido, desencadeando uma reação de defesa do hospedeiro por meio de mecanismos mediadores inflamatórios que têm como objetivo a neutralização do agente injuriante.

O edema e as alterações proliferativas do tecido gengival durante os estágios iniciais da reação inflamatória

causam uma hipertrofia gengival, que resultaria no recobrimento da placa dentária anteriormente supra-gengival, tornando-a subgengival, favorecendo o aparecimento de espécies bacterianas anaeróbicas durante o desenvolvimento da doença (LISTGARTEN⁴⁴, 1976, LISTGARTEN⁴⁵, 1988).

O desenvolvimento da cárie dental envolve uma tríade de fatores indispensáveis, que se interagem em uma relação dinâmica de forma que: a microbiota da placa, os carboidratos da dieta e a susceptibilidade do dente constituem os componentes desse sistema integrado (HOUTE³⁴, 1994; PINHEIRO⁶⁵, 1983a, PINHEIRO⁶⁶, 1983b, PINHEIRO⁶⁷, 1983c).

O processo carioso provoca a desmineralização do esmalte do dente por ácidos orgânicos, produzidos a partir da fermentação de carboidratos pelos microrganismos da placa dentária (HOUTE³³, 1980; HUANG et al³⁵, 1981; FEATHERSTONE et al¹⁸, 1981).

Como essas doenças atingem uma grande parcela da população, várias medidas têm sido tomadas, com o objetivo de prevenir seu aparecimento.

Com referência à placa bacteriana, deve-se salientar que o seu desenvolvimento e o seu metabolismo são dois fatores fundamentais que podem ser relacionados.

Ao se considerar o desenvolvimento da placa, sabemos que o início de sua formação ocorre com a colonização da camada acelular amorfa chamada película adquirida, que é formada pela adsorção seletiva de glicoproteínas salivares à superfície do esmalte. O início desta colonização ocorre pela adsorção da bactéria do ambiente oral na superfície da película, aderindo-se de modo reversível, porém certos microrganismos tornam-se firmemente aderidos e começam a proliferar. Durante a fase de multiplicação, ocorre uma interação entre células bacterianas mediadas por polímeros extracelulares sintetizados pelas próprias bactérias e também ocorre aposição de novos microrganismos, promovendo o desenvolvimento da placa (LIE⁴¹, 1977; GIBBONS & VAN HOUTE²⁴, 1973).

A persistência desses colonizadores originais em seus respectivos nichos dependerá de acessibilidade a nutrientes e de sua capacidade de adaptação ao meio. A atividade metabólica dessa massa de microrganismos exercerá efeitos seletivos na flora da placa, de forma que o microrganismo que pode adaptar-se permanece e se desenvolve, enquanto outro que não se adapta é rapidamente eliminado, promovendo mudanças quantitativas e qualitativas na composição microbiana. Em sete dias, o processo leva ao estabelecimento da placa madura, onde a microbiota alcança

um balanceado equilíbrio dinâmico (MORHART & FITSGERALD⁵³, 1976; LISTGARTEN⁴⁵, 1988; THEILADE⁸⁸, 1977; SOCRANSKY & MANGANIELLO⁷⁹, 1971).

No que diz respeito ao metabolismo, consideramos que a fermentação e a síntese de polissacarídeos extracelulares insolúveis são de importância relevante e estão relacionadas com a virulência da placa.

Durante o processo de colonização da superfície dentária pelos microrganismos, a síntese de polissacarídeos extracelulares por diversas espécies de *Streptococcus* e *Actinomyces* é de grande importância para sua adesividade. A habilidade dessas bactérias se aderirem deve-se à presença de enzimas denominadas glicosiltransferases em suas membranas, as quais utilizam a sacarose para formar polímeros de glicose insolúveis chamados glicanas com altas proporções de ligações α -(1 $\rightarrow$ 3) que servem como componentes estruturais da matriz da placa. Estas glicanas permitem aglutinação de bactérias específicas que possuam, em suas superfícies celulares, sítios receptores, possibilitando que várias bactérias se liguem à mesma molécula de polímero, promovendo o aumento da massa microbiana. A matriz formada pelos polissacarídeos serve como proteção e reorganização desses microrganismos sobre o dente, podendo concentrar substâncias

necessárias para o crescimento da placa e também agir como barreira para a difusão dos ácidos e entrada de tampões da saliva (GUGGENHEIN²⁸, 1970; SONJU & ROLLA⁸¹, 1973; ROLLA⁷⁰, 1989).

A outra característica importante é a fermentação. As bactérias utilizam os carboidratos da dieta e aqueles liberados de glicoproteínas salivares, para produzir ATP e obter energia através da via glicolítica, devido ao ambiente da placa ser anaeróbico. O principal produto final desse processo é o ácido láctico, embora outros ácidos orgânicos possam se formar como acetato, propionato e formato, determinando uma rápida diminuição do pH da placa dentária (GUEDES²², 1975; VAN DER HOVEN & FRANKEN⁹⁰, 1982; ROLLA et al⁷¹, 1985).

Por ser a placa dentária um sistema aberto, está exposta ao ambiente oral, ficando sujeita à entrada de componentes, que geralmente são constituintes da dieta e têm a habilidade de influenciar o metabolismo da placa (KLEINBERG³⁷, 1970).

Muitos estudos já demonstraram que os hábitos dietéticos e a composição dos alimentos podem afetar a

composição química da placa, o tipo de bactérias encontradas e a atividade metabólica dessas bactérias (MENAKER⁵⁰, 1980; NEWBRUN⁵⁶, 1990).

Carboidratos de resíduos alimentares que permanecem na cavidade oral, quando entram em contato com a placa, são utilizados pelas bactérias para obtenção de energia, necessária à manutenção de sua integridade, tendo como resultado dessa degradação a formação de ácidos, que causam a redução do pH, promovendo a desmineralização do esmalte do dente, afetando a atividade de cárie. A existência de uma grande variedade de carboidratos promove, na placa, respostas diferentes; geralmente, monossacarídeos são capazes de produzir alterações bruscas de pH, devido à sua rápida metabolização, enquanto os dissacarídeos e polissacarídeos necessitam ser hidrolisados por enzimas, antes de serem catabolizados; a retentividade é um fator capaz de influenciar a produção de ácidos, pois prolonga a utilização dos açúcares o que aumentaria a duração da resposta do pH (KLEINBERG³⁷, 1970).

Dos carboidratos normalmente consumidos, a sacarose é conhecida por possuir o mais alto potencial indutor de cárie, apesar de estimular uma produção ácida semelhante à de outros monossacarídeos como glicose e

frutose. A cariogenicidade da sacarose está associada à sua utilização pelas bactérias para síntese de polissacarídeos extracelulares insolúveis, pois esse açúcar possui uma alta energia de ligação entre os carbonos anoméricos C_1 da glicose e C_2 da frutose, que é utilizada pelas enzimas glicosiltransferases na síntese de glicanas que promovem a adesividade, resultando em um pesado acúmulo de placa (NEWBRUN⁵⁷, 1972 ; ROLLA et al⁷¹, 1985).

Evidências relacionando consumo de sacarose e prevalência de cárie são amplamente encontradas na literatura.

A cárie ocorria com pouca frequência no homem primitivo e comprovações arqueológicas mostraram que ela existiu em todas as idades do homem civilizado, porém, a partir de 1850, coincidindo com o comércio do açúcar de cana e farinhas refinadas, houve um aumento da incidência de cáries. Estudos demonstraram que em tribos primitivas, à proporção que dietas nativas não contendo sacarose mudaram para incluir produtos contendo açúcar, a prevalência de cárie aumentou (PINHEIRO⁶⁶, 1983).

O consumo freqüente de sacarose favorece a aderência de bactérias nas superfícies dos dentes induzindo a um aumento de cáries de superfícies lisas (ROLLA⁷⁰, 1989),

também pode causar um aumento da acidogênese, produzindo freqüentes reduções no pH da placa. Este fator ambiental favoreceria o desenvolvimento de bactérias com potencial acidúrico, promovendo a estas uma vantagem de crescimento sobre espécies mais sensíveis aos ácidos. Ocorreria então uma mudança qualitativa na microbiota da placa com o aumento nas proporções de *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus*, que são organismos capazes de crescer e produzir substancial quantidade de ácidos em baixos níveis de pH, promovendo maiores reduções do pH, que é um fator requerido para desmineralização do esmalte (HOUTE³³, 1980; HOUTE³⁴, 1994).

Existem componentes na dieta, como compostos químicos, vitaminas e aminoácidos que possuem propriedades cariostáticas ou podem inibir processos metabólicos na placa como é o caso das proteínas ricas em arginina, ácidos graxos, píroxidina e o cobre (BOWEN⁶, 1994).

Alguns produtos naturais como o cacau (PAOLINO⁶⁰, 1982), queijo (SILVA et al⁷⁸, 1986) e o guaraná (PINHEIRO⁶⁸, 1987) demonstraram capacidade anticariogênica em animais de laboratório.

Entre estes componentes encontra-se o citrato, que é um elemento comum à dieta, presente nas frutas cítricas, de baixa toxicidade e que apresenta propriedades anticariogênicas, quando acrescentado à dieta cariogênica ou injetado em ratos (MC CLURE & RUZICKA⁴⁹, 1946; MOREIRA⁵², 1982; PAVARINI⁶¹, 1980).

Por outro lado, o citrato, além de ser um metabólito intermediário, que passa pelo ciclo de Krebs, resultando no aumento de ATP do tecido, faz parte integrante da estrutura dos tecidos mineralizados, inclusive dos dentes (HARTLES²⁹, 1964; HARTLES & LEAVER³⁰, 1960; SORTINO et al⁸², 1971).

A confirmação de que o citrato age como um inibidor enzimático da via glicolítica, com ação mais específica sobre a fosfofrutoquinase (SRERE⁸³, 1965), poderia relacionar seu efeito anticariogênico com a inibição do metabolismo bacteriano.

Considerando a importância da dieta sobre o metabolismo da placa dentária, decidiu-se fazer uma análise comparativa da influência de açúcares comumente encontrados na dieta, na fermentação e na síntese de polissacarídeos

extracelulares insolúveis pela placa dentária *in vitro* e verificar o possível efeito inibitório do íon citrato sobre este metabolismo.

2- REVISÃO DA LITERATURA

Para maior facilidade da Revisão da literatura e melhor compreensão dos trabalhos, dividimos este capítulo em tópicos.

2.1 - Metabolismo bacteriano

MILLER et al.⁵¹ (1940) observaram que *in vitro*, amostras contendo suspensão de placa dentária produziam ácido láctico a partir de sacarose e maltose tão rapidamente, como de glicose e frutose, porém menos de lactose e amido.

STEPHAN & HEMMENS⁸⁵ (1947) observaram marcantes diferenças na curva de pH produzida por culturas puras de microrganismos orais, quando diferentes carboidratos foram utilizados como substrato. Foi notado, no geral, que os monossacarídeos glicose, frutose e galactose produziram as mais rápidas mudanças de pH, seguidas de sacarose e maltose, com lactose e amido, mostrando as menores alterações.

NEFF⁵⁵ (1967), comparando a produção de ácidos a partir de diferentes substratos pela placa dentária *in vivo*, verificou que a queda do pH, ocorrida poucos minutos após aplicação das soluções de sacarose, maltose, frutose e glicose

tinha características similares e alcançava um pH final por volta de 5,0; manose e galactose não causaram redução de pH tão pronunciada e mais ácido foi formado de amido cozido e maltose do que de amido não cozido.

KLEINBERG³⁷ (1970) caracterizou a placa dentária como um ambiente aberto, onde ocorre entrada de componentes metabólicos, principalmente carboidratos da dieta, os quais são degradados a ácidos pelas bactérias, acumulando-se e causando queda do pH. Considerou que : fermentabilidade, retentividade e a incapacidade de aumentar o fluxo salivar seriam fatores que poderiam aumentar a produção de ácido pela placa.

MÄKINEN e SCHEININ⁴⁷ (1972) relataram que o consumo de sacarose associado à redução da higiene oral causou aumento na atividade das enzimas invertase e dextranase. Maior atividade da aldolase foi observada nos grupos que consumiram frutose e a lactato desidrogenase aumentou nos grupos que utilizaram açúcares rapidamente fermentáveis como sacarose e glicose.

FROSTELL²⁰ (1973) constatou que *in vivo*, bochechos com soluções de sacarose, glicose e frutose induziram mudanças no pH que foram da mesma magnitude

para os três açúcares, porém, a solução de lactose causou redução do pH que foi significativamente menos pronunciada.

CARLSSON & GRIFFITH⁸ (1974) descreveram que, quando culturas de *Streptococcus* cresciam anaerobicamente, em um meio contendo excesso de glicose havia formação de lactato, como principal produto de fermentação; quando o meio era limitado em glicose, os principais produtos de fermentação formados por *S. sanguis* e *S. mutans* foram etanol, acetato e formato, enquanto os *S. salivarius* e *S. bovis* formaram principalmente lactato com quantidades variadas de etanol, acetato e formato. A diferença entre os produtos de fermentação das culturas, provavelmente deve-se à concentração intracelular de frutose-1:6-difosfato; em cultura de limitação em glicose, a concentração pode não ser alta suficientemente para ativar a desidrogenase lactato (que converte o piruvato em lactato) e, assim, o piruvato é convertido em etanol, acetato e formato pela reação piruvato-formato liase.

GEDDES²² (1975), estudando o pH da placa dentária, relatou a presença de acetato, propionato, n. butirato e os isômeros lactato L(+) e D(-) em todas as amostras. Os radicais ácidos voláteis eram predominantes na placa em repouso e, após a exposição ao açúcar, ocorria o

aumento da concentração de lactato, principalmente do isômero L(+) e diminuía a concentração dos ácidos voláteis. Decorridos 60 minutos após a exposição, embora a concentração de todos os ácidos estivesse mais alta, os ácidos voláteis voltavam a predominar na placa. Estes ácidos produzidos pela placa na presença de sacarose e glicose foram similares em quantidade e qualidade.

O amido causa menor redução do pH na placa que monossacarídeos; por ser uma molécula maior, ele não pode ser transportado através da membrana celular bacteriana, devendo ser degradado por enzimas a carboidratos de baixo peso molecular, antes de ser metabolizado. BIRKHED & SKUDE⁵ (1978) mostraram que a atividade da amilase na placa dentária é de importância para o metabolismo do amido e 25% dos microrganismos cultiváveis são capazes de produzir essa enzima extracelular, porém, a atividade da amilase bacteriana é baixa quando comparada com a atividade da amilase salivar.

BIRKHED³ (1978), pelo método de titulação automática, verificou a produção de ácidos em suspensões de placa a partir de vários carboidratos e concluiu que a fermentação com frutose foi 21% menor que com glicose e sacarose; essa menor acidogenicidade da frutose poderia ser

explicada por uma combinação de fatores, como alguns microrganismos não fermentarem frutose e o transporte e fosforilação desse monossacarídeo serem mais lentos que o da glicose.

DRUCKER & VERRAN¹⁴ (1980) relataram que *S. mutans*, *in vitro* promovia os mais baixos níveis de pH quando eram utilizados glicose e sacarose como substrato; níveis mais altos foram obtidos com sorbitol, triclorosacarose e xilitol, respectivamente; quando foram incubados juntos, a cariogenicidade da sacarose foi diminuída pela presença de triclorosacarose, pois ocorre inibição da atividade enzimática extracelular por competição com o mesmo sítio.

MORMANN & MUHLEMANN⁵⁴ (1981) observaram que a hidrólise enzimática do amido pela α amilase salivar produzia principalmente maltose, maltotriose e dextrina de baixo peso molecular e a degradação do amido, *in vivo*, era capaz de causar, na placa bacteriana interdental, uma redução de pH para 4,75, medida por meio de eletrodos de pH intraorais, muito provavelmente como resultado da fermentação das maltodextrinas.

GROBLER²⁷ (1982) investigou o grau de fermentação de baixas concentrações de carboidratos pela

placa dentária *in vitro*, por meio de mensuração de pH, na ausência de CO₂, e concluiu que glicose, frutose, manose, galactose, sacarose, lactose e maltose foram fermentados, promovendo redução de pH para 5,5 e que trealose e melibiose, também foram degradados porém em menor extensão.

VAN DER HOEVEN & FRANKEN⁹⁰ (1982) avaliaram a produção de ácidos na placa dental de ratos com e sem *Streptococcus mutans*, observando que os ácidos fórmico, acético e láctico normalmente predominavam nos dois grupos, porém, com a administração de sacarose havia uma mudança para fermentação homoláctica. No grupo inoculado com *S. mutans*, o pico do ácido láctico, 5 minutos após exposição à sacarose, foi significativamente maior, sugerindo que a rápida produção de ácido láctico seguida à sacarose seja o principal fator na cariogênicidade do *S. mutans*.

Várias enzimas extracelulares existem na placa, capazes de hidrolisar carboidratos que entram em contato com ela durante as refeições, promovendo uma quebra enzimática que resulta na liberação de produtos mais facilmente difusíveis e metabolizáveis pelos microrganismos. TATEVOSSIAN⁸⁷ (1982) testou a capacidade das enzimas hidrolisarem os carboidratos na placa dentária, observando

que substancial hidrólise de sacarose, maltose e amido ocorreu, com liberação de monossacarídeos fermentáveis e que a taxa de degradação de amido e maltose foi mais lenta que da sacarose. Foi observada atividade de β fructosidase, comprovada pela hidrólise de rafinose e também atividade de α glicosidase devido à hidrólise de maltose, trealose e melezitose, identificando duas enzimas que hidrolisam sacarose. O amido foi degradado à dextrina, maltose e glicose, sendo que a hidrólise do amido é cerca de cinco vezes mais rápida na saliva que na placa. Devido a difusão do amido ser mais lenta, quando comparada à sacarose, a amilase salivar assume importância fundamental para a liberação de oligossacarídeos solúveis e difusíveis; uma vez na placa, a degradação desse carboidrato é garantida pela combinação da amilase de origem bacteriana, α glicosidase e amiloglicosidase.

DISTLER & KRONCKE¹¹ (1983) estimaram a quantidade de ácidos láctico e voláteis em amostras de placa, antes e depois de exposição à sacarose *in vivo*. Na placa em repouso foram encontrados ácidos láctico e acético numa quantidade que correspondia aproximadamente a 70% do total de ácidos; propiônico e fórmico em uma quantidade de 10% cada e traços de butírico, valérico e succínico. Após o bochecho com sacarose, o lactato aumenta imediatamente enquanto ocorre diminuição na percentagem dos outros ácidos

e à medida que o tempo passa um lento padrão metabólico causa a diminuição do ácido láctico.

HAYES et al.³¹ (1983) compararam amostras de placa dentária obtidas de indivíduos livres de cárie e propensos, observando que *Actinomyces* e *Streptococcus* foram isolados de todas as amostras; uma alta taxa acidogênica foi encontrada em indivíduos com lesões ativas, enquanto baixas taxas foram encontradas em indivíduos livres de cáries, embora o total de microrganismos fosse similar; repetidos bochechos com sacarose causaram um aumento significativo na taxa acidogênica de amostras de pessoas propensas à cárie.

LAGERLOF et al.³⁹ (1985) estudaram os efeitos de diferentes concentrações de sacarose, glicose e frutose nas mudanças de pH causadas por *Streptococcus mitior* em boca artificial, que simulava o processo de depuração do açúcar oral, verificando que concentrações iniciais de 20% não provocaram diferenças significativas entre os açúcares e quando a bactéria era constantemente exposta à sacarose em concentrações entre 0,5 - 35%, o pH mínimo alcançava 4,03, porém caiu bem menos com uma depuração de açúcar normal, o que sugere que um método mais apropriado para reduzir a formação de ácido seria o consumo de estimulante de saliva,

como chicletes, que aumentaria o fluxo salivar e a capacidade tampão.

DUGUID¹⁷ (1985) relatou que *S. mutans*, quando submetidos a baixas concentrações de glicose, frutose e sacarose *in vitro* possuem um padrão de fermentação ácido-heteroláctica onde ácidos láctico, acético e fórmico são produzidos em quantidades similares e após a queda inicial do pH, houve ligeira elevação, sendo notado consumo de ácido láctico; isso não aconteceu quando foi adicionada sacarose à bactéria. Em altas concentrações, os resultados da fermentação dos açúcares são similares, com o ácido láctico como principal produto final e o pH caindo de 7 para 4.

DODDS & EDGAR¹² (1986) verificaram clinicamente que o amido, apesar de apresentar um baixo grau de cariogenicidade, pode ter esse potencial cariogênico afetado pelo nível de sacarose na dieta. Placas de voluntários que consumiram mais sacarose demonstraram um pH menor e uma maior concentração de lactato, após bochecho com amido do que placas daqueles que consumiram menos sacarose. Resultados semelhantes foram obtidos *in vitro*, demonstrando que o amido foi mais cariogênico quando consumido como parte de uma dieta rica em sacarose.

DODDS & EDGAR¹³ (1988) determinaram o potencial cariogênico de sete tipos de alimentos utilizando o método de mensuração do pH da placa após seu consumo e, em seguida, classificaram esses alimentos de acordo com a severidade da resposta do pH. Comparado a outros métodos, os pesquisadores o consideraram válido para confirmar o potencial cariogênico dos alimentos e notaram que existia uma significativa relação entre a severidade da alteração do pH da placa e a concentração de lactato e acetato no seu fluido, porém a correlação entre os dados do pH e a retenção de carboidratos não foi significativa.

SERPENTINO et al.⁷⁵ (1988) verificaram que o açúcar mascavo apresentava uma atividade acidogênica e de formação de placa comparável à do açúcar refinado e que isso se devia ao seu alto teor de sacarose.

SGAN-COHEN, et al.⁷⁶ (1988) observaram que após uma dieta prévia de 48 horas, rica em açúcares, a resposta imediata do pH da placa para alimentos doces específicos era significativamente mais ácida do que após uma dieta com pouco açúcar, levando a concluir que o hábito de consumir carboidratos rapidamente fermentáveis favorece um tipo de flora acidúrica e acidogênica, aumentando o potencial acidogênico da placa.

SOET et al.⁸⁰ (1989) mostraram em um estudo que existem diferenças nas propriedades acidogênicas dos diferentes *Streptococcus* orais e que embora todas as espécies investigadas fossem capazes de produzir ácidos, *Streptococcus sobrinus* foi capaz de sustentar a produção ácida a partir de glicose em níveis de pH abaixo de 6.0, enquanto outras espécies cessaram ou foram fortemente inibidas, indicando o alto potencial acidogênico desse microrganismo.

LINGSTROM et al.⁴² (1991) avaliaram os efeitos dos amidos quimicamente modificados na redução do pH da placa dentária humana; seis produtos comercialmente disponíveis foram analisados e comparados com o amido solúvel. Os resultados mostraram que *in vitro*, os amidos modificados eram menos hidrolisados pela α amilase que o amido solúvel, porém, *in vivo*, os dois tipos de amidos reduziram o pH da placa na mesma proporção, possuindo propriedades cariogênicas similares.

SALAKO & KLEINBERG⁷² (1992) concluíram que tanto *in vivo* quanto *in vitro*, a galactose produz menor redução do pH do que a glicose, sugerindo que microrganismos residentes na cavidade oral têm menor capacidade galactolítica que glicolítica. Esta variação na

capacidade foi atribuída a diferenças no processo de transporte de membrana e no padrão metabólico para galactose, que normalmente resulta de uma fermentação tipo heteroláctico, com formação de mais ácidos fracos, como acético, resultando em menor queda do pH comparada à glicose.

MATEE et al.⁴⁸ (1993), tentando encontrar uma explicação para a abundância de *Streptococcus mutans* encontrada na placa dentária de crianças da Tanzânia que consumiam uma dieta rica em amido e contendo quantidades mínimas de sacarose, testaram *in vitro* a fermentação de carboidratos em diferentes farinhas à base de amido por *Streptococcus mutans*, observando que a quantidade de ácido produzida pelas bactérias poderia indicar que estas se adequaram ao substrato e seriam capazes de metabolizá-lo, causando uma subsequente queda do pH que poderia ter uma consequência ecológica, promovendo o crescimento de bactérias acidúricas na placa dental.

GEDDES²³ (1994) evidenciou o efeito da combinação e sequência da ingestão de alimentos e bebidas sobre o pH da placa dentária *in vivo*. Os estudos sobre eventos biológicos intra-orais, durante ingestão de alimentos, mostraram que se uma refeição incluir um item que contenha

carboidrato como sacarose, glicose ou frutose, que é rapidamente fermentado por microrganismos da placa, ocorrerá queda do pH. Se outro componente for ingerido imediatamente antes, durante ou depois, poderá influenciar esta alteração do pH. De grande importância seria o último item da refeição, pois se ele consistir de um alimento que não contenha carboidrato e for estimulante do fluxo salivar, promoverá um rápido "clearance" e aumento da capacidade tampão, levando a um aumento do pH da placa e com isso, protegendo os dentes.

LINGSTROM et al⁴³ (1994) concluíram que o consumo freqüente de alimentos à base de amido e sacarose provocava desmineralização de esmalte e dentina, porém, o amido promovia uma desmineralização significativamente menor, como também foi menor a queda do pH.

GIBBONS & NYGAARD²⁵ (1968) estudaram a síntese de polissacarídeos extracelulares em *Streptococcus* conhecidos por indução à formação de placa e verificaram que estes microrganismos, na presença de sacarose, se aderiam às paredes dos tubos de ensaio, formando depósitos gelatinosos e que este fenômeno parecia depender da síntese de polissacarídeos insolúveis, que possuíam maior peso

molecular e relativa viscosidade em relação aos polímeros solúveis.

CRITCHELEY⁹ (1969) analisou a placa formada em macacos alimentados por meio de tubos estomacais e que receberam glicose em pó *ad libitum* por via oral. A análise demonstrou que polissacarídeos intra e extracelulares foram formados de glicose e a degradação química e cromatografia desses polissacarídeos extracelulares extraídos sugerem que eles não eram dextranas, contendo outros açúcares, além de glicose.

LEACH et al⁴⁰ (1969) verificaram que microrganismos da placa humana foram capazes de produzir polissacarídeos extracelulares *in vivo* e *in vitro* a partir de glicose, frutose, maltose e sacarose. Exposições prolongadas desses microrganismos a cada açúcar respectivo produziram polissacarídeos extracelulares que eram uniformemente compostos de glicose e rápidas exposições produziam polissacarídeos que eram característicos de cada açúcar individual.

GUGGENHEIM²⁸ (1970) relatou que os polissacarídeos extracelulares produzidos por grande número de bactérias orais são os principais constituintes da matriz

da placa. Por meio de análise, foi observado que estes polissacarídeos não eram compostos homogêneos sob o ponto de vista químico e morfológico e apresentavam diferenças de solubilidade, possuindo uma fração solúvel em água, de fácil hidrólise por enzimas da placa, sendo considerados carboidratos de reserva e uma fração de polissacarídeos insolúveis que revelou apresentar domínio da ligação α (1-3) e resistência à hidrólise enzimática, sendo considerados peças de resistência na matriz da placa. Além das glicanas, que são homopolissacarídeos extracelulares específicos, sintetizados por *Streptococcus* e *Actinomyces*, a partir da sacarose, outros importantes componentes da matriz são os heteropolissacarídeos capsulares, sintetizados por bactérias, por meio de diferentes padrões metabólicos utilizando vários açúcares, sendo observada, através de eletromicrografia, formação de cápsula de glicose em *Streptococcus* crescidos em meio contendo este açúcar.

NEWBRUN et al.⁵⁹ (1971) verificaram que polissacarídeos extracelulares de *S. salivarius*, *S. mutans* e *S. sanguis* possuíam partículas elipsoidais e que as moléculas, principalmente as glicanas, tinham tendência à agregação e se aglutinavam, sendo que essa propriedade poderia ser importante para a formação da placa.

SCHEININ & MAKINEN⁷⁴ (1971) observaram as mudanças na formação e composição química da placa dentária, ocasionadas pelo consumo de carboidratos, em 46 voluntários, concluindo que os mais baixos índices de placa e as menores quantidades foram encontrados no grupo xilitol seguido por frutose, glicose e os maiores valores foram encontrados no grupo sacarose, sendo que as diferenças encontradas entre os grupos glicose e sacarose não eram significantes. Estudos químicos da composição revelaram alto conteúdo de polissacarídeos no grupo sacarose e a concentração de ácido láctico aumentou na seguinte ordem: xilitol, frutose, glicose e sacarose.

As glicanas que recobrem as células de bactérias, crescidas em sacarose, se aderem à superfície celular, por meio de sítios receptores específicos e promovem aglutinação dos microrganismos. KELSTRUP & FUNDER-NIELSEN³⁶ (1972) sugeriram que a agregação de células de *S. mutans*, que foram recobertas por polissacarídeos extracelulares, ocorria por meio de ligações intermoleculares de hidrogênio entre grupos hidroxil livres, sendo que os polissacarídeos estavam negativamente carregados em rede, de forma que a agregação só ocorria na presença de cátions que neutralizavam as cargas.

NEWBRUN⁵⁷ (1972) relatou que os polissacarídeos extracelulares sintetizados por glicosiltransferases obtidas de *Streptococcus* orais eram homopolímeros de glicose, contendo apenas traços de frutose e nitrogênio e testando algumas enzimas disponíveis comercialmente mostraram que amiloglicosidases foram praticamente inefetivas na hidrólise, porém, as dextranases promoveram uma degradação das glicanas bacterianas com taxas variando entre 20 a 90%. Os polissacarídeos sintetizados por *Streptococcus sanguis*, considerada espécie não cariogênica, foram rápida e extensivamente degradados enquanto aqueles sintetizados por *Streptococcus mutans*, apresentaram grande variabilidade no grau de quebra enzimática, notando-se similaridade na taxa de hidrólise para glicanas obtidas de microrganismos pertencentes ao mesmo grupo imunológico.

HOTZ, et al³² (1972) demonstraram que do peso seco da placa, colhida de 3.500 crianças, 29% dos carboidratos presentes eram solúveis e continham 6,9% de carboidratos, 1,2% de nitrogênio e 4% de proteína; a porção insolúvel correspondia a 67,1%, contendo 11,3% de carboidratos e 7,4% de nitrogênio. A composição de açúcar das hidrólises mostrou que glicose era o principal açúcar constituinte e que a matriz de polissacarídeos insolúveis continha predominantemente ligações α (1-3), sendo calculada

corresponder a 1,35% da placa; 5,6% do peso seco consistiam de pequenas moléculas de carboidratos solúveis formados de glicose e oligossacarídeos com ligações α (1-6).

SCHEININ & MAKINEN⁷³ (1972) avaliaram o efeito do consumo de açúcares na formação e composição química da placa de 72 voluntários divididos em seis grupos: 1-sacarose, 2-frutose-sorbitol, 3-frutose-glicose, 4-frutose-xilitol, 5-xilitol, 6-sacarose-maltose. O estudo foi realizado em dois períodos testes de cinco dias, com intervalo de quatro semanas para normalização, sendo que no primeiro período, a dieta dos grupos foi suplementada com sacarose e no segundo período com as misturas de açúcares correspondentes e revelou que nos grupos frutose-xilitol, xilitol e sacarose-maltose o índice de placa e o peso da placa fresca foram significativamente menores e que não houve diferença significativa entre os grupos sacarose e frutose-glicose. A análise química demonstrou que houve redução dos carboidratos da placa quando foram utilizadas as misturas de açúcares e a sacarose promoveu crescimento dos *Lactobacillos*.

VAN DER HOEVEN⁸⁹ (1974) verificou que a administração de dietas ricas em glicose ou sacarose produzia o desenvolvimento de uma massiva quantidade de placa, com profundas mudanças na flora oral. Foi observado que a

sacarose estimulava o aumento do número de *Streptococcus* e a glicose, o crescimento da população de *Actinomyces viscosus*, que eram capazes de produzir um muco extracelular.

STAAT, et al⁸⁴ (1975) examinaram os efeitos da sacarose sobre a quantidade e composição microbiana da placa de quatro e doze dias formada em oito voluntários, não sendo notada relação entre o nível de sacarose e a quantidade de placa acumulada, porém foi observado que a sacarose produziu significantes mudanças na população de microrganismos, com aumento da densidade de organismos viáveis e das populações de *Lactobacillos* e *Streptococcus mutans*.

BIRKHED & ROSELL⁴ (1975) demonstraram que a estrutura dos polissacarídeos sintetizados por enzimas solúveis na placa dentária, quando incubada com sacarose, consistia de glicanas de cadeias lineares de ligação α (1-6) com ramificações α (1-3) e frutanas com ligações β (2-6) com ramificações na posição 1.

DEWAR & WALKER¹⁰ (1975) concluíram que várias espécies de *Streptococcus* são capazes de sintetizar polissacarídeos extracelulares insolúveis e muitas destas

espécies sintetizam a enzima dextranase que hidrolisa as ligações α -(1-6) na dextrana, porém nenhuma foi capaz de hidrolisar as glicanas α -(1-3).

MORHART & FITZGERALD⁵³ (1976) relataram que os carboidratos da dieta são de grande importância ecológica, proporcionando substrato para os microrganismos, que dependem desse nutriente como fonte de energia. O metabolismo da sacarose pelos *Streptococcus mutans* e *sanguis*, com produção de ácidos e polissacarídeos intra e extracelulares, tem influência na quantidade de placa acumulada e na composição microbiana.

PEARCE⁶³ (1976) demonstrou que a quantidade total de polissacarídeos extracelulares adsorvidos na hidroxiapatita estava relacionada com o tamanho da molécula enquanto a intensidade de adsorção se relacionava com a proporção de ligação (1 $\rightarrow$ 3) na molécula; microrganismos capazes de produzir glicanas com maiores proporções deste tipo de ligação, se aderem mais à superfície dentária.

ASHLEY & WILSON¹ (1977) mostraram que a placa dentária de dois dias formada em adultos durante uma dieta rica em açúcar, além de ter peso seco maior, possuía concentração significativamente menor de cálcio e fosfato

inorgânico e concentração maior de carboidratos solúveis e álcali-insolúveis que a placa formada na dieta livre de açúcar.

NEWBRUN⁵⁸ (1980) evidenciou que a concentração de sacarose dos alimentos é importante na determinação de sua cariogenicidade. Quando o alimento contém baixos níveis de sacarose, esta é utilizada pelas bactérias, exclusivamente para propósitos energéticos e formação de ácido; como não ocorre síntese de glicanas, os *Streptococcus* não são capazes de aderir, sendo levados pela saliva. Quando altas concentrações de sacarose estão presentes nos alimentos, as bactérias passam a sintetizar polissacarídeos extracelulares insolúveis, por meio das enzimas glicosiltransferases, que utilizam a alta energia de ligação entre os carbonos anoméricos C₁ da glicose e C₂ da frutose presente na sacarose. Este fenômeno promove aderência de grande número de bactérias, causando além do acúmulo de placa, uma resposta adaptativa da flora normal, dando lugar a uma flora acidogênica com alto percentual de *Streptococcus mutans*.

BREX et al.⁷ (1981) demonstraram através de análise de depósitos dentais formados sobre filmes plásticos fixados aos dentes, que freqüentes bochechos com água, glicose e sacarose não têm influência detectável na

quantidade e morfologia da placa no estágio inicial de aderência bacteriana.

DUBOIS et al¹⁶ (1984) demonstraram que a suplementação da dieta de 118 voluntários com 80g de frutose provocou uma pequena redução mensurável na formação de placa em relação à sacarose usada em igual quantidade.

FIEHN¹⁹ (1984) relatou que existem três importantes grupos de polissacarídeos na placa: as glicanas, que têm grande importância na estrutura e desenvolvimento da placa, sendo encontradas na película adquirida; as frutanas extracelulares e os polissacarídeos intracelulares, que constituem a principal reserva de energia quando ocorre deficiência no suprimento de carboidratos.

ROLLA et al⁷¹ (1985) sugeriram que não seria a síntese de glicanas o motivo principal do acúmulo de placa induzido por sacarose, mas a produção e liberação de glicosiltransferase, que promoveria a adesividade de glicanas a superfícies sólidas, assim como das glicanas entre si; as moléculas de glicosiltransferase livres seriam capazes de aderir fortemente a materiais sólidos aniônicos, hidrofóbicos e polissacarídeos, provavelmente, devido à presença de alta quantidade de resíduos hidrofóbicos carregados negativamente

e produzir glicanas no estado adsorvido. Foi mostrado que glicosiltransferases são capazes de ligar-se firmemente à hidroxiapatita e à película adquirida e produzir glicanas que interagem com glicanas ricas em ligações rígidas α (1-3) da superfície celular das bactérias, promovendo um forte mecanismo de ligação.

PINHEIRO et al.⁶⁸ (1987) avaliaram *in vitro* os efeitos de alguns produtos naturais sobre a fermentação e síntese de polissacarídeos extracelulares insolúveis pela placa dentária, concluindo que o extrato de guaraná estimulou significativamente a fermentação mas não inibiu a síntese de polissacarídeos insolúveis; o extrato de *Stévia rebaudiana Berton* estimulou a fermentação e apresentou um grande efeito inibitório na síntese de polissacarídeos e o esteviosídeo embora tivesse inibido a fermentação de forma não significativa, inibiu significativamente a síntese de polissacarídeos extracelulares insolúveis.

KRISTOFFERSSON & BIRKHED³⁸ (1987), demonstraram que mudanças nos hábitos alimentares, principalmente redução do consumo de açúcar podem resultar em uma mudança de composição da microflora oral, com a redução do número de *S. mutans* e *Lactobacillos*, tanto na saliva como nos espaços interproximais e quando os

voluntários retornaram aos hábitos alimentares normais, o número das bactérias voltou a crescer novamente.

PINHEIRO et al.⁶⁹ (1989) testaram fatores que influenciavam a síntese de polissacarídeos extracelulares *in vitro* e concluíram que tempo de incubação, força iônica e pH são importantes. A maior quantidade produzida foi com doze horas de incubação, o pH ótimo foi por volta de 6,8 e a respeito da força iônica, uma concentração de 0,25M de NaCL promoveu uma inibição de 50%.

GRENBY et al.²⁶ (1989) realizaram um estudo para comparar as propriedades de dois açúcares: glicose e sacarose e quatro polióis: sorbitol, manitol, xilitol e lactitol, concluindo que os açúcares produziam maior crescimento microbiano e maior formação de ácidos e polissacarídeos insolúveis que os polióis; em vinte e quatro horas, mais ácidos e mais polissacarídeos insolúveis foram formados da glicose que da sacarose pela placa dentária.

BIJELLA et al.² (1992) demonstraram que dentifrícios comerciais considerados antiplaca não foram capazes de inibir significativamente a fermentação e a síntese de polissacarídeos extracelulares insolúveis *in vitro* e a substância SDS (dodecil sulfato de sódio) presente na

composição dos dentifrícios selecionados seria o ingrediente de maior efeito antiplaca.

2.2 - Ocorrência do citrato nos tecidos mineralizados e sua relação com a cárie.

MCCLURE & RUZICKA⁴⁹ (1946) verificaram o efeito dos ions citrato e lactato na superfície de dentes de rato e concluíram que sob condições neutras, o ion citrato adicionado à água de beber teve uma ação descalcificante nas superfícies lisas dos dentes e nenhuma ação foi causada pelos ions lactato. A ação destrutiva do citrato na dentina e esmalte sugere uma lesão com aparência de erosão, que pode ser explicada pelo efeito solubilizante do citrato sobre os sais de cálcio insolúveis.

SHULMAN & ROBINSON⁷⁷ (1948) através de análise, confirmaram que o citrato é um constituinte da saliva e não existia diferenças apreciáveis quanto ao conteúdo de citrato da saliva de indivíduos com e sem a presença de erosão.

ZIPKIN et al.⁹² (1957) para verificar a relação do citrato salivar com a incidência de cárie, fizeram um estudo com 144 adolescentes. As crianças foram divididas por sexo e subdivididas segundo o número de CPOD, formando o primeiro grupo com alto índice de CPOD (>14 para meninas e >12 para meninos) e o segundo grupo com baixo índice de CPOD (<4). Um exame clínico para avaliar a quantidade de cáries e análise de saliva para determinar a concentração de citrato foram realizados e repetidos novamente três anos depois. Comparando os resultados chegou-se à conclusão de que houve aumento uniforme da concentração de citrato salivar e que nos dois períodos, a concentração de citrato foi inversamente relacionada com a prevalência de cárie em meninas.

HARTLES & LEAVER³⁰ (1960) observaram que o citrato presente na dentina apresenta uma parte ligada à fase mineral ou à maior porção colágena da matriz proteica e outra parte associada a um peptídeo.

HARTLES²⁹ (1964) afirmou que o citrato faz parte integrante dos tecidos mineralizados atuando como elemento de ligação entre a matriz orgânica e o cristal de hidroxiapatita, conferindo uma maior estabilidade química à estrutura calcificada, o que aumentaria a sua resistência.

Uma parte do citrato depositado nos ossos encontra-se sob a forma de um complexo altamente insolúvel denominado citrato de cálcio enquanto a outra parte do citrato ósseo é permutável. Além de servir como elemento estrutural, o citrato tem grande importância no metabolismo intermediário, sendo que sua concentração no sangue é estável. A manutenção dessa concentração se dá pela remoção do citrato da circulação através de metabolização pelo rim e é possível que a adição seja pela ação do paratormônio que promoveria a transferência do citrato do osso para o sangue.

SRERE⁸³ (1965) considerou o citrato como um componente orgânico multifuncional responsável pelo controle e regulação de muitas reações que são necessárias para uma estabilidade metabólica. Além de seu papel no ciclo de Krebs e produção de ATP, é uma substância controladora (ativando ou inibindo) de um grande número de enzimas e constitui uma fonte de grupos acetil para padrões biossintéticos.

A implicação dos distúrbios no metabolismo de citrato, atuando na patogênese da doença periodontal já foi relatada em muitos estudos. Em alterações sistêmicas, tanto patológicas (leucemia e escorbuto) como hormonais (hiperparatireoidismo e diabetes), onde severa destruição periodontal é observada, foram encontrados níveis de citrato

significativamente aumentados nos tecidos. TANNER⁸⁶ (1967) demonstrou que a hipercitricemia em ratos provocada por administração de citrato por via subcutânea e na ração foi acompanhada de mielofibrose seguida de reabsorção óssea, porosidade e hiperemia do tecido gengival com sangramento ocasional.

O citrato é um constituinte do esmalte, sendo encontrado no percentual de 0,1%. Está disposto ao longo do espaço interprismático em contato com a superfície do cristal de hidroxiapatita, também podendo agir na formação e no crescimento desses cristais. SORTINO et al⁸² (1971), realizando um experimento com ratos, observaram que a administração de ácido cítrico em uma dieta cariogênica teve uma ação cariostática, devido à redução da solubilidade do cristal de hidroxiapatita.

PINHEIRO⁶⁴ (1979) confirmou que o citrato age como inibidor enzimático da via glicolítica, atuando preferencialmente sobre a terceira enzima do ciclo que é a fosfofrutoquinase e esta ação poderia causar um efeito inibitório do metabolismo da placa bacteriana, modulando o processo de cárie.

PAVARINI et al⁶² (1981) compararam a ação cariogênica do citrato de sódio e de cálcio administrado em ratos por via subcutânea e na ração e do flúor por via subcutânea e constataram que os dois tiveram o mesmo índice de redução de cáries, em torno de 50% e que o citrato, além de seu poder anticariogênico, possuía a vantagem de não apresentar nenhum sintoma de toxicidade.

GARROCHO et al²¹ (1985) verificaram a ação do citrato de cálcio a 2%, associado com uma dieta cariogênica em ratos e concluíram que se trata de uma substância anticariogênica, capaz de reduzir 50% a incidência de cáries nos ratos, sendo que na maxila houve maior redução em relação à mandíbula.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Coleta de placa

A placa foi coletada de dez voluntários (quatro do sexo feminino e seis do sexo masculino), entre dez e treze anos de idade, que foram instruídos a não escovar seus dentes durante três dias antes da coleta.

A coleta foi realizada nos laboratórios da FOP Unicamp, com a utilização de espátulas Hollembacks números 3 e 3s, passadas sobre a superfície dentária para remoção da placa, em seguida feito um pool, que foi armazenado posteriormente em frasco esterilizado e imediatamente imerso em gelo picado para, em seguida, serem efetuados os testes e análises químicas referentes à fermentação e à síntese de polissacarídeos insolúveis.

3.2 - Preparo da suspensão de placa dentária

A placa dentária coletada era pesada em uma balança eletrônica digital ACATE, modelo BCM 1100 e homogeneizada em tampão fosfato 0,01M pH 7,0 na concentração de 1ml de tampão para 10mg de placa por meio de um pistilo de teflon, adaptado em um tubo de vidro, com oito a dez movimentos no sentido vaivém, executados manualmente.

Posteriormente, a suspensão obtida era colocada em um béquer e armazenada em gelo picado.

3.3 - Fermentação

O preparo do meio de incubação, para a análise da fermentação, da placa bacteriana usado neste experimento, segue-se abaixo:

-tampão fosfato 0,01M em pH 6,5	1,0 ml
-solução de carboidrato teste	0,5 ml
-suspensão de placa	1,0 ml
-água destilada	2,5 ml

O meio de incubação perfazendo um total de 5,0 ml, foi colocado em frascos Erlenmeyer, previamente esterilizados. Os frascos teste foram levados à estufa a 37°C, por um período de tempo de duas horas. Os frascos tempo zero, após a adição da suspensão de placa, foram imediatamente titulados com uma solução de NaOH 0,05N, até o ponto de viragem, utilizando como indicador uma solução alcoólica de vermelho de cresol a 0,1%. O mesmo procedimento foi realizado com os frascos teste, uma vez decorrido o período de incubação.

Os resultados sobre a quantidade de ácidos formados pela fermentação da placa foram obtidos pela diferença entre a titulação dos frascos tempo zero e o dos frascos testes levados à estufa.

3.4- Síntese de polissacarídeos extracelulares insolúveis

O preparo do meio de incubação para a síntese de polissacarídeos extracelulares insolúveis (PEI), usado neste experimento, segue-se abaixo :

-tampão fosfato 0,1M em pH 7,0	0,2 ml
-solução de carboidrato teste	0,2 ml
-suspensão de placa	0,5 ml
-água destilada	0,1 ml

Este meio de incubação perfazendo um total de 1,0 ml, foi acondicionado em tubos de centrifugação para volume de 1,5 ml.

Os tubos tempo zero foram levados ao congelador, imediatamente após a colocação da suspensão de placa. Os tubos testes foram levados à estufa a 37°C, por um período

de tempo de dezoito horas, tendo sido devidamente fechados para evitar contaminação.

Após o período de incubação, os tubos foram centrifugados em uma centrífuga, marca Incibrás, modelo SPIN I, com potência de 500 W e 60 Hz, a 10.000 rpm, à temperatura ambiente durante dez minutos. O sobrenadante foi coletado em um béquer e posteriormente descartado; o precipitado lavado com 1,0 ml de água destilada e levado para centrifugação, novamente por 10 minutos. Mais uma vez, o sobrenadante foi descartado, o tubo adequadamente seco com papel absorvente e o precipitado suspenso em 0,5 ml de solução de KOH a 1N, homogeneizado por vibração e levado à estufa a 37°C, durante uma hora.

Para dosagem dos carboidratos totais, segundo o método de DUBOIS et al¹⁵ (1956), retirou-se 0,1 ml da suspensão alcalina, transferindo-a para um tubo de ensaio, onde foram adicionados:

-água destilada	0,5 ml
-solução de fenol a 5%	0,5 ml
-ácido sulfúrico	5,0 ml

A leitura espectrofotométrica foi realizada em um espectrofotômetro digital, da marca Beckman, modelo DU-65, em 490 nm, trinta minutos após a adição do ácido sulfúrico.

Os resultados obtidos em absorbância foram convertidos em μg de carboidratos utilizando-se uma curva padrão de glicose.

A avaliação da síntese de PEI, foi realizada pela dosagem dos carboidratos totais, considerando a diferença apresentada entre os tubos tempo zero e os tubos teste.

3.5 - Concentrações dos carboidratos utilizados na análise da fermentação

- glicose 0,12M
- sacarose 0,12M
- frutose 0,12M
- dextrina 0,5%

3.6 - Concentrações dos carboidratos utilizados na análise da síntese de PEI

- glicose 1M
- sacarose 1M
- frutose 1M

-dextrina 5%

O citrato de sódio foi acrescentado aos meios de incubação de fermentação e síntese de PEI, na concentração final de 50 e 100 mM em substituição à água destilada.

Foram preparadas 6 amostras de cada carboidrato na ausência de citrato e na presença de citrato 50 e 100 mM, totalizando 18 amostras.

A análise estatística para os resultados obtidos da fermentação e da síntese de PEI pelos diferentes carboidratos, na ausência e na presença de citrato, foi feita pela análise de variância a dois critérios, expressos nas Tabelas 4 e 15, respectivamente, e pelo teste de Tukey para comparação das médias de fermentação, ao nível de 5% de significância, mostradas nas Tabelas de número 5 a 11 e também para comparação das médias de síntese de PEI, mostrados nas Tabelas de número 16 a 22.

4- RESULTADOS

Os resultados da fermentação dos diferentes carboidratos pela placa dentária *in vitro*, na ausência e na presença do íon citrato, estão expressos nas Tabelas 1, 2 e 3 e Figuras 1, 2 e 3.

Na ausência de citrato, a fermentação dos carboidratos variou, com diferenças significantes entre si, com exceção entre frutose e dextrina (Tabela 5).

Na presença do citrato, nas concentrações de 50 e 100 mM, houve uma redução na fermentação de todos os carboidratos, contudo, não houve diferença significativa entre as duas concentrações de citrato (Tabelas 8, 9, 10 e 11 e Figura 4).

A diferença de fermentação entre os carboidratos, na ausência ou na presença do citrato, permaneceu a mesma (Tabelas 5, 6, e 7 e Figuras 1, 2 e 3).

TABELA 1- Fermentação de carboidratos pela placa dentária
in vitro, na ausência de citrato.

ml de NaOH 0,05 N / 10 mg de placa				
	GLICOSE	SACAROSE	FRUTOSE	DEXTRINA
	0.69	0.70	0.62	0.64
	0.66	0.74	0.67	0.55
	0.76	0.68	0.60	0.51
	0.80	0.76	0.63	0.45
	0.77	0.64	0.53	0.60
	0.72	0.66	0.55	0.62
† MÉDIA	0.73	0.70	0.60	0.56
† E. PADRÃO	0.0215	0.0189	0.0213	0.0296

TABELA 2 - Fermentação de carboidratos pela placa dentária *in vitro*, na presença de 50 mM de citrato.

ml de NaOH 0,05 N / 10 mg de placa				
	GLICOSE	SACAROSE	FRUTOSE	DEXTRINA
	0.57	0.56	0.51	0.43
	0.55	0.61	0.47	0.40
	0.57	0.56	0.49	0.47
	0.59	0.53	0.51	0.48
	0.61	0.52	0.47	0.47
	0.59	0.53	0.44	0.45
† MÉDIA	0.58	0.55	0.48	0.45
† E. PADRÃO	0.0085	0.0135	0.0111	0.0124

TABELA 3- Fermentação de carboidratos pela placa dentária *in vitro*, na presença de 100 mM de citrato.

ml de NaOH 0,05 N / 10 mg de placa				
	GLICOSE	SACAROSE	FRUTOSE	DEXTRINA
	0.57	0.54	0.41	0.38
	0.60	0.51	0.45	0.45
	0.59	0.55	0.45	0.42
	0.59	0.54	0.48	0.48
	0.62	0.50	0.48	0.43
	0.57	0.55	0.46	0.45
† MÉDIA	0.59	0.53	0.45	0.43
† E. PADRÃO	0.0077	0.0087	0.0107	0.0138

Fermentação na ausência de citrato

1 ml de NaOH 0,05 N

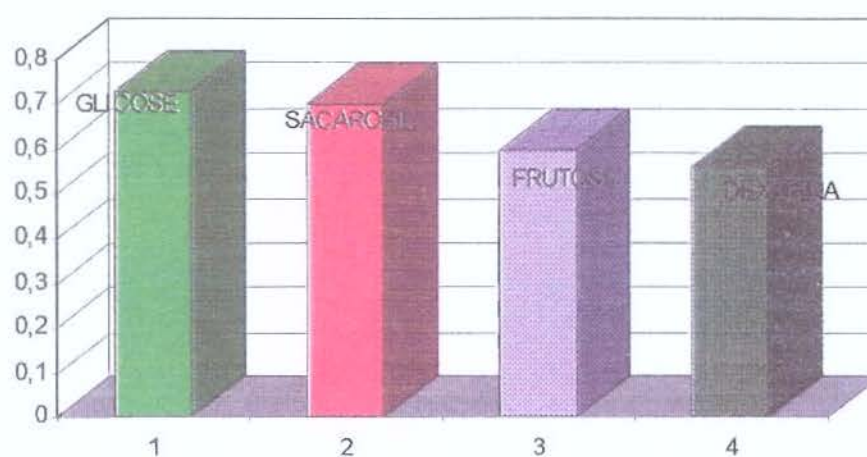


FIGURA 1- Valores médios da fermentação (ml de NaOH 0,05N) da glicose, sacarose, frutose e dextrina pela placa dentária *in vitro*, na ausência de citrato.

Fermentação na presença de citrato 50 mM

ml de NaOH 0,05 N

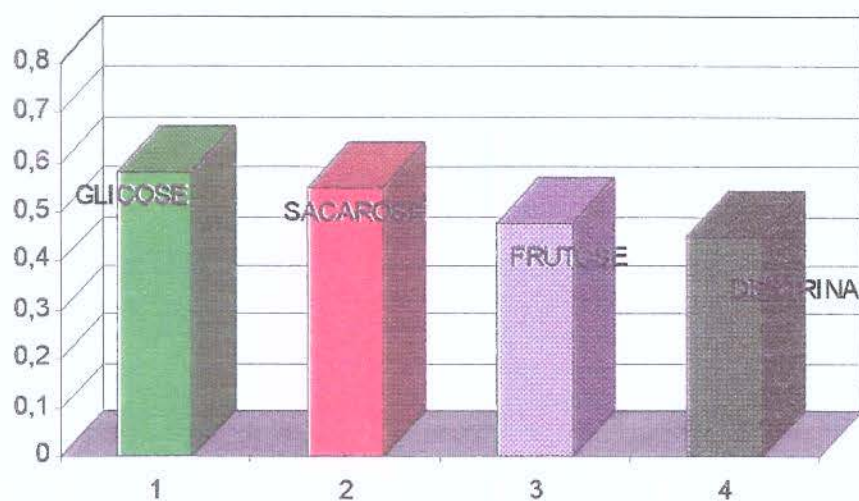


FIGURA 2- Valores médios da fermentação (ml de NaOH 0,05N) da glicose, sacarose, frutose e dextrina pela placa dentária *in vitro*, na presença de 50 mM de citrato.

Fermentação na presença de citrato 100 mM

ml de NaOH 0,05 N

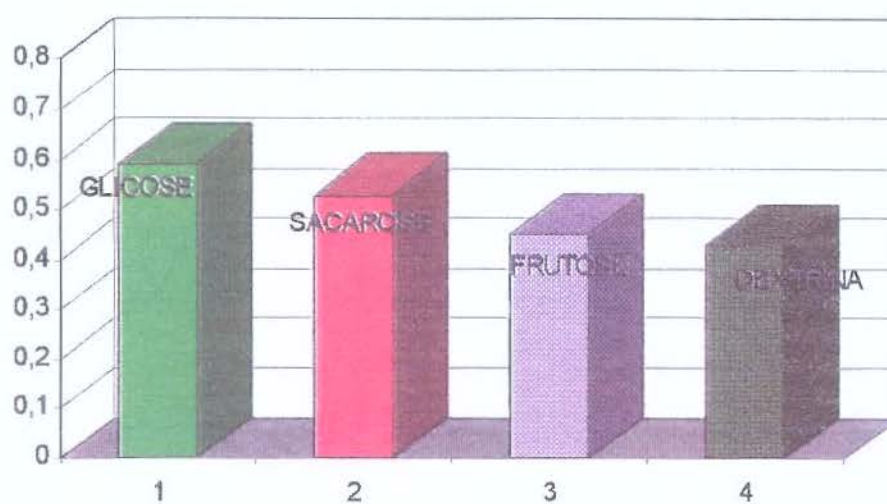


FIGURA 3- Valores médios da fermentação (ml de NaOH 0,05N) da glicose, sacarose, frutose e dextrina pela placa dentária *in vitro*, na presença de 100 mM de citrato.

TABELA 4- Análise de variância dos resultados de fermentação na ausência e na presença do ion citrato.

Causas variação	GL	SQ	QM	F
Açúcares	3	0.268311	0.089437	57,27**
Citrato	2	0.301903	0.154551	98,97**
Açu×Cit	6	0.005464	0.000911	0.58
Resíduo	60	0.093700	0.001562	
Total	71	0.676578		

TABELA 5- Comparação dos valores médios de fermentação de carboidratos na ausência de citrato.

Açúcar	Média	Comparação
Glicose	0.733	a
Sacarose	0.697	b
Frutose	0.600	c
Dextrina	0.562	c

Nota: Letras diferentes indicam diferença significativa entre médias ao nível de 5%

TABELA 6- Comparação dos valores médios de fermentação de carboidratos na presença de 50mM de citrato.

Açúcar	Média	Comparação
Glicose	0.580	a
Sacarose	0.552	b
Frutose	0.482	c
Dextrina	0.450	c

Nota: Letras diferentes indicam diferença significativa entre médias ao nível de 5%

TABELA 7- Comparação dos valores médios de fermentação de carboidratos na presença de 100mM de citrato.

Açúcar	Média	Comparação
Glicose	0.590	a
Sacarose	0.532	b
Frutose	0.455	c
Dextrina	0.435	c

Nota: Letras diferentes indicam diferença significativa entre médias ao nível de 5%

TABELA 8- Comparação dos valores médios de fermentação de glicose em diferentes concentrações de citrato.

Citrato	Média	Comparação
0	0.733	a
50mM	0.580	b
100mM	0.590	b

Nota: Letras diferentes indicam diferença significativa entre médias ao nível de 5%

TABELA 9 - Comparação dos valores médios de fermentação da sacarose em diferentes concentrações de citrato.

Citrato	Média	Comparação
0	0,697	a
50mM	0,552	b
100mM	0,532	b

Nota: Letras diferentes indicam diferença significativa entre médias ao nível de 5%

TABELA 10 - Comparação dos valores médios de fermentação da frutose em diferentes concentrações de citrato.

Citrato	Médias	Comparação
0	0,600	a
50mM	0,482	b
100mM	0,455	b

Nota: Letras diferentes indicam diferença significativa entre médias ao nível de 5%

TABELA 11 - Comparação dos valores médios de fermentação da dextrina em diferentes concentrações de citrato.

Citrato	Médias	Comparação
0	0.565	a
50mM	0.450	b
100mM	0.435	b

Nota: Letras diferentes indicam diferença significativa entre médias ao nível de 5%

Fermentação em função da concentração de citrato

1 ml de NaOH 0,05 N

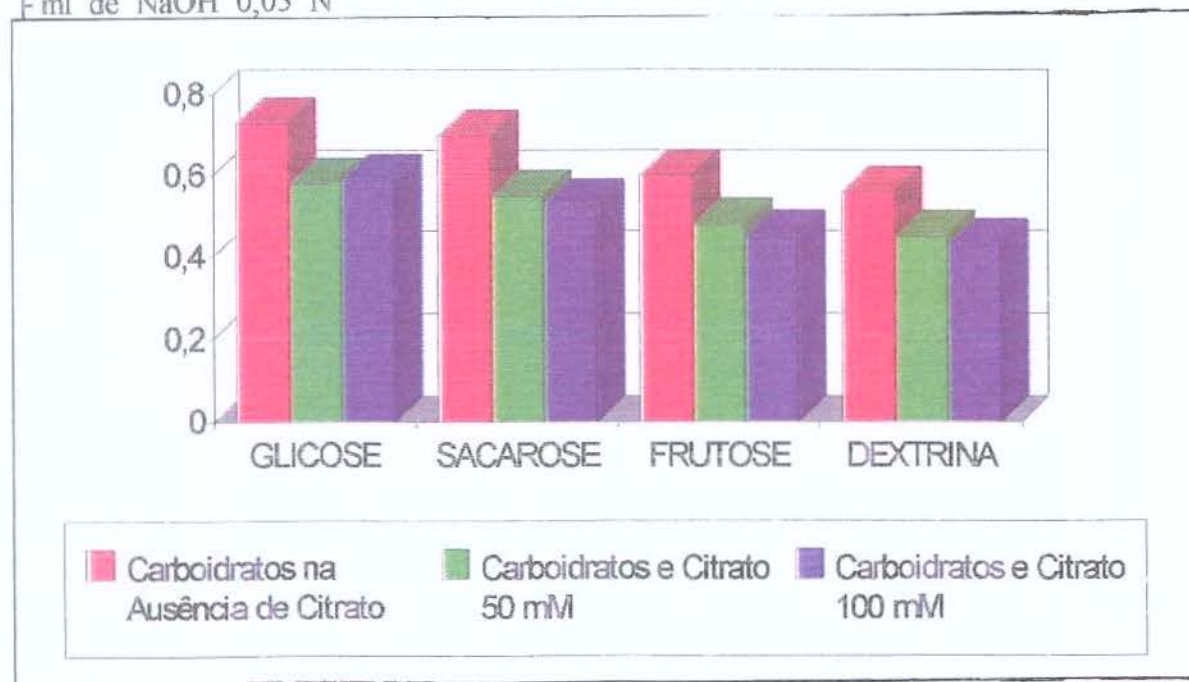


FIGURA 4 - Valores médios de fermentação (ml de NaOH 0,05 N) pela placa dentária *in vitro*, segundo a concentração de citrato para cada carboidrato.

Os resultados da síntese de PEI pela placa dentária *in vitro*, na ausência e na presença do ion citrato estão expressos nas Tabelas 12, 13 e 14 e Figuras 5, 6 e 7.

Na ausência de citrato houve uma diferença significativa entre a síntese de PEI da glicose, sacarose e dextrina e não significativa entre frutose e dextrina e também entre frutose e glicose (Tabela 16).

Na presença de citrato, os resultados da síntese de PEI, diferentes dos observados na fermentação, apresentaram diferenças significativas entre as duas concentrações do inibidor, isto é, a redução da síntese de PEI foi proporcional à concentração do inibidor (Tabelas 19, 20, 21 e 22 e Figura 5).

Houve uma mudança de comportamento na síntese de PEI entre os carboidratos na ausência e na presença de citrato (Tabelas 16, 17 e 18).

A síntese de PEI pela glicose e sacarose apresentou diferença significativa entre si, na ausência e na concentração de 100mM de citrato e nenhuma diferença na concentração de 50mM. Isto significa que a redução da síntese de PEI pela sacarose foi mais sensível à ação do citrato do que a da glicose. A síntese de PEI pela frutose

variou de forma diferente com relação aos outros carboidratos, apresentando uma grande redução nestes valores, na concentração de citrato a 50mM (Tabelas 16, 17 e 18). Isto indica que a frutose foi mais sensível à ação do citrato na síntese de PEI.

A síntese de PEI pela glicose e dextrina apresentou sempre diferenças significativas tanto na ausência como na presença de citrato.

A síntese de PEI para cada carboidrato mostrou-se dependente da concentração do inibidor, com exceção de frutose, quando o citrato foi utilizado na concentração de 50mM, embora tenha havido uma redução de 50% (Tabelas 19, 20, 21 e 22 e Figura 5).

TABELA 12 - Síntese de PEI pela placa dentária *in vitro*,
na presença de carboidratos e ausência de
citrato.

µg de carboidrato / 10 mg de placa				
	GLICOSE	SACAROSE	FRUTOSE	DEXTRINA
	219,68	269,46	193,13	195,12
	236,27	275,43	163,27	201,76
	240,25	259,50	210,39	184,50
	189,81	290,03	251,54	177,20
	217,69	256,85	215,03	167,91
	230,30	248,22	238,26	173,88
└ MÉDIA	222,33	266,58	211,94	183,40
└ E. PADRÃO	7,45	6,10	12,90	5,31

TABELA 13 - Síntese de PEI pela placa dentária *in vitro*,
na presença de carboidratos e citrato 50 mM.

=====				
µg de carboidrato / 10 mg de placa				
=====				
	GLICOSE	SACAROSE	FRUTOSE	DEXTRINA
	177,87	151,32	47,78	160,61
	153,97	168,57	35,17	155,30
	205,08	161,27	59,06	149,33
	167,91	216,36	43,14	114,15
	188,49	223,66	37,83	163,93
	183,84	199,77	53,75	130,08
└ MÉDIA	179,53	186,82	46,12	145,57
└ E. PADRÃO	7,17	12,44	3,77	7,9
=====				

TABELA 14 - Síntese de PEI pela placa dentária *in vitro*,
na presença de carboidratos e citrato 100 mM.

=====				
µg de carboidrato / 10 mg de placa				
=====				
	GLICOSE	SACAROSE	FRUTOSE	DEXTRINA
	104,20	58,40	27,21	45,79
	135,39	74,99	10,61	54,42
	74,33	28,53	20,57	49,11
	122,12	63,05	35,17	36,50
	83,62	82,29	17,91	71,01
	93,58	41,14	23,89	41,81
† MÉDIA	102,21	58,07	22,56	49,77
† E. PADRÃO	9,48	8,28	3,42	4,93
=====				

Síntese de PEI na ausência de citrato

† μg de carboidrato / 10 mg de placa

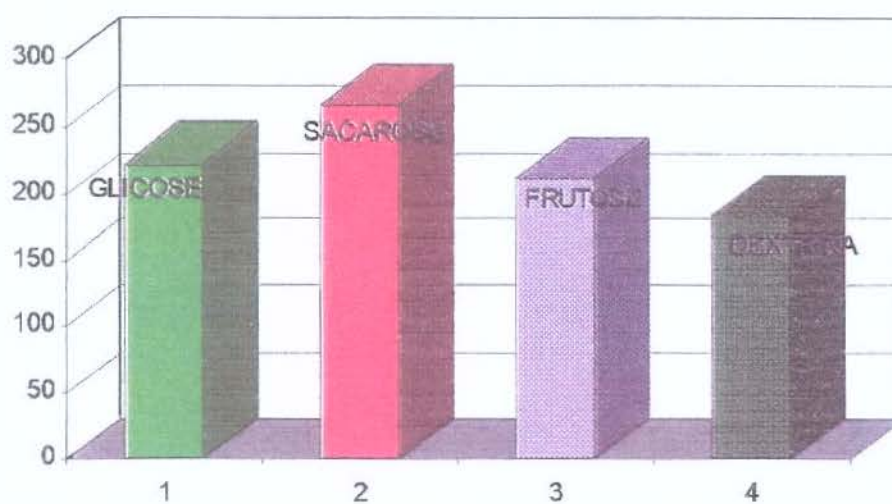


FIGURA 5 - Valores médios de síntese de PEI (μg de carboidrato) pela placa dentária *in vitro*, na presença de glicose, sacarose, frutose e dextrina e ausência de citrato.

Síntese de PEI na presença de citrato 50 mM

1 μ g de carboidrato / 10 mg de placa

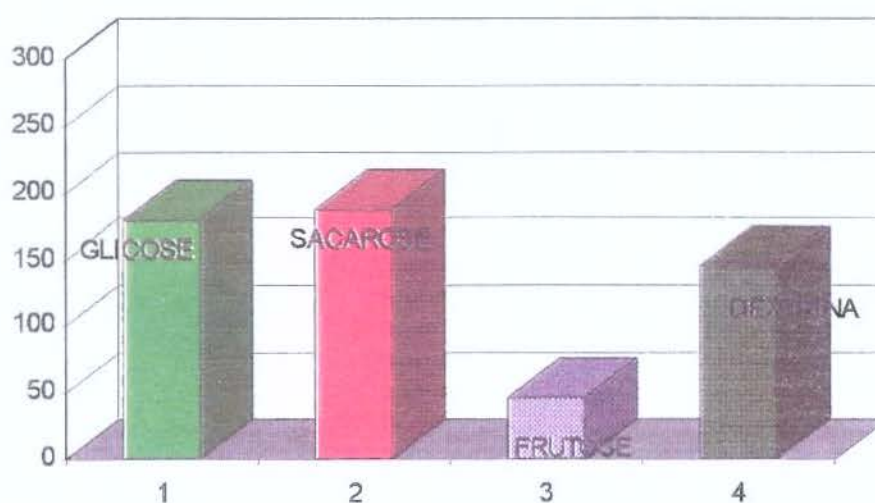


FIGURA 6 - Valores médios de síntese de PEI (μ g de carboidrato) pela placa dentária *in vitro*, na presença de glicose, sacarose, frutose e dextrina e citrato 50 mM.

Síntese de PEI na presença de citrato 100 mM

† μg de carboidrato / 10 mg de placa

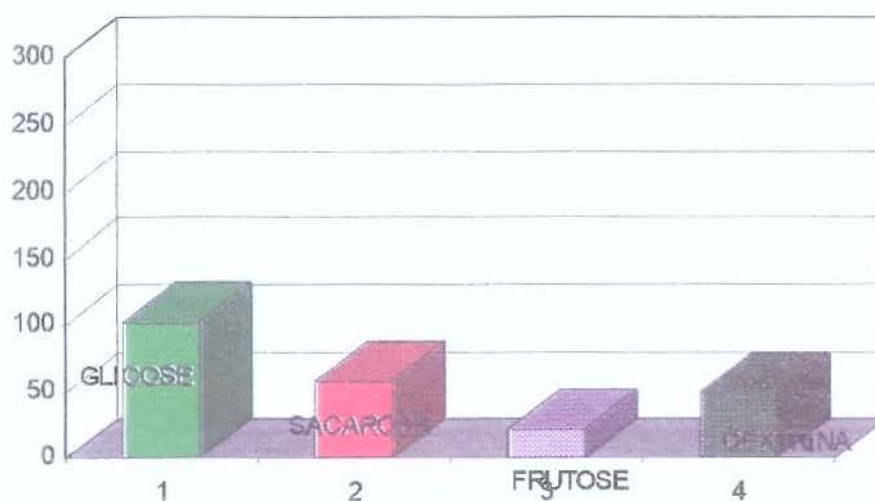


FIGURA 7 - Valores médios de síntese de PEI (μg de carboidrato) pela placa dentária *in vitro*, na presença de glicose, sacarose, frutose e dextrina e citrato 100 mM.

TABELA 15 - Análise de variância dos resultados de síntese de PEI na presença de carboidratos e na ausência e presença do íon citrato.

Causas variação	GL	SQ	QM	F
Açúcar	3	73116,21	24372,07	63,66**
Citrato	2	318476,17	159238,08	415,94**
Açu × Cit	6	43593,70	7265,62	18,98**
Resíduo	60	22970,10	382,83	
Total	71	458156,17		

TABELA 16 - Comparação dos valores médios de síntese de PEI na presença de carboidratos e ausência de citrato.

Açúcar	Média	Comparação
Glicose	222,33	b
Sacarose	266,58	a
Frutose	211,94	bc
Dextrina	183,40	c

Nota: Letras diferentes indicam diferença entre médias ao nível de significância de 5%

TABELA 17 - Comparação dos valores médios de síntese de PEI na presença de carboidratos e citrato 50mM.

Açúcar	Média	Comparação
Glicose	179,53	a
Sacarose	186,82	a
Frutose	46,12	c
Dextrina	145,57	b

Nota: Letras diferentes indicam diferença entre médias ao nível de significância de 5%

TABELA 18 - Comparação dos valores médios de síntese de PEI na presença de carboidratos e citrato 100mM.

Açúcar	Média	Comparação
Glicose	102,21	a
Sacarose	58,07	b
Frutose	22,56	bc
Dextrina	49,77	c

Nota: Letras diferentes indicam diferença entre médias ao nível de significância de 5%

TABELA 19 - Comparação dos valores médios de síntese de PEI, na presença de glicose em diferentes concentrações de citrato.

Citrato	Média	Comparação
0	222,33	a
50mM	179,53	b
100mM	102,21	c

Nota: Letras diferentes indicam diferença significativa entre médias ao nível de 5%

TABELA 20 - Comparação dos valores médios de síntese de PEI, na presença de sacarose em diferentes concentrações de citrato.

Citrato	Média	Comparação
0	266,58	a
50mM	186,82	b
100mM	58,07	c

Nota: Letras diferentes indicam diferença significativa entre médias ao nível de 5%

TABELA 21 - Comparação dos valores médios de síntese de PEI, na presença de frutose em diferentes concentrações de citrato.

Citrato	Média	Comparação
0	211,94	a
50mM	46,12	b
100mM	22,56	b

Nota: Letras diferentes indicam diferença significativa entre médias ao nível de 5%

TABELA 22- Comparação dos valores médios de síntese de PEI, na presença de dextrina em diferentes concentrações de citrato.

Citrato	Média	Comparação
0	183,40	a
50mM	145,57	b
100mM	49,77	c

Nota: Letras diferentes indicam diferença significativa entre médias ao nível de 5%

Síntese de PEI em função da concentração de citrato

µg de carboidrato / 10mg de placa

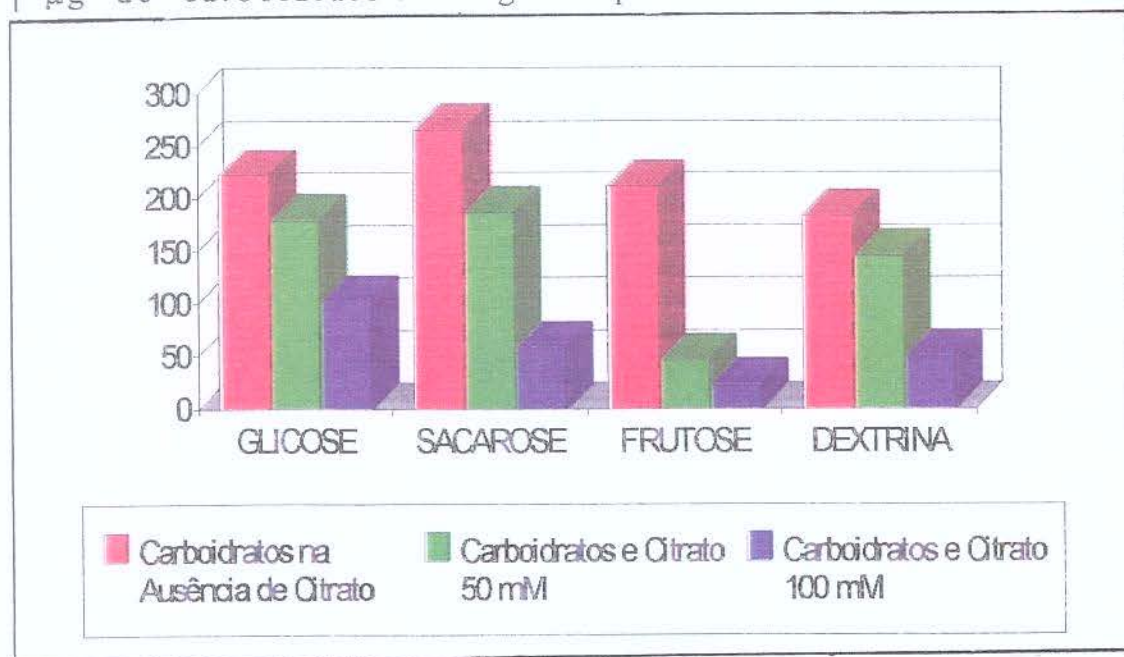


FIGURA 8 - Valores médios de síntese de PEI (µg de carboidrato) pela placa dentária *in vitro*, segundo a concentração de citrato para cada carboidrato.

5- DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Está claro que os componentes da dieta têm a capacidade de influenciar as características qualitativas e quantitativas da placa bacteriana e o seu metabolismo (KLEINBERG³⁷, 1970; MENAKER⁵⁰, 1980; NEWBRUN⁵⁶, 1990).

No que se refere ao metabolismo bacteriano, a síntese de PEI e a fermentação constituem fatores que determinam a virulência da placa, sendo que o primeiro se relaciona ao acúmulo de placa sobre a superfície dos dentes e o segundo à formação de ácidos que causam a redução de pH e conseqüentemente, a desmineralização das estruturas dentais (ROLLA⁷⁰, 1989; KELSTRUP & FUNDER-NIELSEN³⁶, 1972; NEFF⁵⁵, 1967; GEDDES²², 1975).

Portanto, ingredientes da dieta, que tenham a capacidade de estimular ou inibir estas atividades bacterianas podem modular o desenvolvimento das principais doenças da cavidade oral (PINHEIRO⁶⁶, 1983; BOWEN⁶, 1994).

Este trabalho baseou-se na observação *in vitro* da influência de carboidratos, freqüentemente consumidos e do íon citrato sobre a atividade da placa dentária. Os dados sobre açúcares obtidos em nossa amostra permitem-nos relacionar com resultados e observações, obtidos de trabalhos

semelhantes ou relacionados com o assunto. Já a discussão comparativa sobre os dados referentes ao citrato foi dificultada por não termos encontrado trabalhos relacionando citrato com fermentação e síntese de polissacarídeos na literatura.

KLEINBERG³⁷, (1970) verificou que o aumento da disponibilidade de carboidratos no meio ambiente oral, em contato com as bactérias, intensifica as reações metabólicas na placa. Os carboidratos dos alimentos são utilizados pelos microrganismos através da via glicolítica, para produzir ATP, preenchendo as necessidades energéticas, liberando, como produto final desse processo, ácidos orgânicos.

GEDDES²², (1975) observou que vários ácidos estão presentes na placa bacteriana. Na placa em repouso ou 60 minutos após exposição ao açúcar, radicais ácidos voláteis, como acetato, propionato e n-butirato eram dominantes e imediatamente após exposição à sacarose ou glicose, aumentava a concentração de lactato, diminuindo os ácidos voláteis, promovendo uma redução de pH da placa.

Quanto a fermentação, podemos considerar que todos os carboidratos avaliados, apresentaram um potencial

cariogênico, embora se verifique algumas diferenças entre eles no que se refere a produção de ácidos.

Observamos que na ausência de citrato, o grupo glicose produziu significativamente mais ácido que a sacarose, isto é aceito na literatura pelo fato da glicose ser um monossacarídeo, podendo ser prontamente metabolizado, estando de acordo com STEPHAN & HEMMENS⁸⁵ (1947) que trabalharam com culturas puras de microrganismos e GRENBY et al²⁶ (1989) que utilizaram suspensão de placa. Observamos também que a produção de ácido com frutose, foi menor que com glicose e sacarose, estando este resultado de acordo com BIRKHED³ (1978), que justifica este fato por algumas bactérias não fermentarem frutose e o transporte e fosforilação deste carboidrato ser mais lento que da glicose.

Por outro lado, autores como MILLER⁵¹ (1940) e GROBLER²⁷ (1982), que trabalharam *in vitro*, NEFF⁵⁵ (1967) e FROSTELL²⁰ (1973), que trabalharam *in vivo* e DUGUID¹⁷ (1985) que utilizou culturas puras de microrganismos consideraram que estes três carboidratos possuem a capacidade de produzir ácidos em quantidades similares.

Dos carboidratos avaliados, a dextrina foi o que produziu a menor quantidade de ácidos e esta diferença foi estatisticamente significativa em relação à sacarose e glicose, estando em concordância com os resultados apresentados por VOLKER & PINKERTON⁹¹ (1947).

As dextrinas, constituem ao lado da maltotriose e maltose, produtos da degradação enzimática do amido pela α amilase, apresentando, como produto final após uma hidrólise completa, a glicose (MORMANN & MUHLEMANN⁵⁴, 1981).

De acordo com NEFF⁵⁵ (1967) e LINGSTROM et al⁴² (1991) que fizeram estudo *in vivo*, MILLER⁵¹ (1940), que fez estudo *in vitro* e STEPHAN & HEMMENS⁸⁵ (1947), que utilizaram culturas puras de bactérias, foi verificado que o amido causa uma menor redução de pH na placa do que os monossacarídeos.

Este fato pode ser explicado pela necessidade dele ser hidrolisado a carboidratos de baixo peso molecular, antes de ser transportado através da membrana da célula bacteriana e utilizado (BIRKHED & SKUDE⁵, 1978).

É aceito que moléculas de monossacarídeos e dissacarídeos são capazes de se difundir rapidamente e ser metabolizadas na placa bacteriana, causando rápidas mudanças de pH (KLEINBERG³⁷, 1970). Entretanto, o amido, por ser uma macromolécula, tem a difusão mais lenta na placa, de forma que a α amilase salivar é de fundamental importância na sua degradação, promovendo a liberação de oligossacarídeos mais solúveis e difusíveis. Uma vez na placa, sua subsequente hidrólise é garantida pela α amilase, α glicosidase e a amiloglicosidase de origem bacteriana, ocorrendo, lentamente e liberando como produtos finais, glicose e maltose (TATEVOSSIAN⁸⁷, 1982).

Os PEI, sintetizados por bactérias da placa, servem como componentes estruturais da matriz e possuem uma característica adesiva, o que, segundo ROLLA et al⁷¹, 1985 e MENAKER⁵⁰, 1980, favorece a agregação microbiana sobre a superfície do dente.

Notou-se, pela observação dos resultados, que a síntese de PEI, a partir de sacarose, foi significativamente maior que com os outros carboidratos.

Estes dados estão de acordo com trabalhos realizados *in vivo* por ASHLEY & WILSON¹ (1977), que verificaram, que uma dieta rica em sacarose produziu um aumento do peso seco da placa e com o de NEWBRUN⁵⁸ (1980), que os carboidratos da dieta, principalmente a sacarose, tem grande influência na massa de placa coronária.

A explicação para o grande acúmulo de placa observado com sacarose, segundo NEWBRUN⁵⁷ (1972), deve-se ao carboidrato ser utilizado como substrato pela enzima glicosiltransferase, presente nas membranas de *Streptococcus* e *Actinomyces*, para sintetizar PEI. Estas enzimas mostram uma especificidade para sacarose e durante a síntese, as unidades de glicose são transferidas da sacarose para uma área ativa da enzima e posteriormente, para a cadeia de polímero em desenvolvimento, de forma que a enzima consome a alta energia de ligação entre os dois carbonos anoméricos C₁ da glicose e C₂ da frutose, encontrados na sacarose (NEWBRUN⁵⁶, 1990 e ROLLA⁷⁰, 1989).

Os PEI são formados por resíduos de glicose ligados por grande número de ligações α (1-3). O relativo alto número de ligações α (1-3) em relação às ligações α (1-6), confere a estes polímeros uma baixa solubilidade e a

conformação estrutural dessas moléculas permite interações entre os resíduos de glicose adjacentes com amplitude do ângulo rotacional limitada, resultando em uma cadeia rígida que tem tendência a formar agregados fibrosos (ROLLA et al⁷¹, 1985).

O processo de aglutinação seria possível segundo GIBBONS & VAN HOUTE²⁴ (1973) e MENAKER⁵⁰ (1980), porque esses polímeros extracelulares se ligam a sítios receptores na superfície celular de bactérias específicas, formando um aglomerado. Entretanto KELSTRUP & FUNDER-NIELSEN³⁶ (1972) supõem, que esta agregação seria mediada por interações entre os polissacarídeos que recobrem as células bacterianas, de forma que os polissacarídeos se aderem devido a ligações intermoleculares de hidrogênio entre os grupos livres hidroxil.

Além de causar crescimento bacteriano, o consumo de sacarose, segundo KRISTOFFERSON & BIRKED³⁸ (1987), STAAT et al⁸⁴ (1975) e HOUTE³³ (1980) também pode influenciar qualitativamente a composição da placa, favorecendo o crescimento de *Streptococcus* e *Lactobacillos*.

Os dados obtidos em nosso trabalho, demonstrando *in vitro*, a síntese de PEI pela placa dentária na presença de sacarose, como também na presença dos substratos glicose, frutose e dextrina, justificam o acúmulo de placa *in vivo*, promovida pelo consumo desses carboidratos, estando de acordo com os trabalhos realizados por SCHEININ & MAKINEN⁷⁴ (1971), onde foi observado que não havia diferença significativa do peso da placa *in vivo*, quando eram consumidos glicose e sacarose e com um estudo subsequente, o qual comprovou que uma dieta contendo uma mistura de glicose-frutose, quando comparada com sacarose, provocava um aumento do peso da placa fresca, em proporções similares (SCHEININ & MAKINEN,⁷³ 1972). Ainda estão de acordo com VAN DER HOEVEN⁸⁹ (1974), que observou que, tanto em ratos mantidos com uma dieta de sacarose como de glicose, havia formação de grande quantidade de placa e DUBOIS et al¹⁶ (1984), que concluíram que a frutose provocava pequena redução na formação de placa comparada à sacarose.

Por meio desses trabalhos pôde-se notar que, quando as pesquisas são realizadas *in vivo*, não são observadas grandes diferenças no acúmulo de placa com consumo de sacarose, glicose e frutose, levando-nos a

concluir que a sacarose não deve ser o único fator responsável pelo estabelecimento da placa dental.

Não há dúvidas, observando os trabalhos de GIBBONS & NYGAARD²⁵ (1968), NEWBRUN et al⁵⁹ (1971), GIBBONS & VAN HOUTE²⁴ (1973), KELSTRUP & FUNDER-NIELSEN³⁶ (1972), ROLLA et al⁷¹ (1985) e ROLLA⁷⁰ (1989), que a sacarose seja o substrato específico utilizado pela glicosiltransferase na síntese de homopolissacarídeos extracelulares pelos *Streptococcus*, mas devemos considerar que para a realização dessas pesquisas, foram utilizadas culturas puras de microrganismos ou enzimas purificadas.

Em nossa metodologia, foi utilizada uma suspensão de placa que é constituída por uma grande variedade de bactérias, carboidratos e proteínas. Portanto, o que foi observado é que esta mistura heterogênea de microrganismos promoveu um aumento na síntese de PEI, utilizando os diferentes carboidratos como substrato. A capacidade de outro substrato, além da sacarose, ser utilizado na síntese de PEI também foi demonstrada por GRENBY et al.²⁶ (1989), que trabalharam com suspensão de placa e metodologia semelhante.

Esses dados sugerem que poderia existir outro mecanismo de formação de PEI, que não fosse dependente de sacarose e que utilizasse outro carboidrato como substrato. Uma possível evidência disso foi observada por CRITCHELEY⁹ (1969), ao verificar que a placa formada em macacos alimentados através de tubo estomacal e que receberam glicose em pó, como único componente por via oral, continha polissacarídeos extracelulares; estes não eram dextrana e eram formados por outros açúcares, além de glicose. Comprovação feita também por GUGGENHEIM²⁸ (1970) que encontrou através de eletromicrografia, heteropolissacarídeos capsulares de diferentes espécies de *Streptococcus* crescidos em glicose.

Outra possibilidade seria a utilização desses carboidratos acrescentados ao meio de incubação para promover o crescimento das cadeias de polissacarídeos pré-formadas pelas bactérias e que seria justificada pelo estudo de LEACH et al⁴⁰ (1969), que observaram que microrganismos orais, quando submetidos a curtas exposições a açúcares como glicose, frutose e maltose produziam polissacarídeos extracelulares, os quais tinham a característica de cada açúcar individual.

Observando-se os dados de fermentação nos grupos de glicose, sacarose, frutose e dextrina, encontrou-se que o citrato adicionado ao meio de cultura, na concentração de 50 ou 100 mM, foi capaz de reduzir os valores em todos os grupos de açúcares. O resultado obtido foi estatisticamente significativo, permitindo considerar o citrato um inibidor da fermentação bacteriana.

A inibição da fermentação pelo citrato, deve-se provavelmente, segundo SRERE⁸³ (1965) e PINHEIRO⁶⁴ (1979) ao citrato ser um inibidor da via glicolítica, agindo sobre a fosfofrutoquinase, terceira enzima desta via.

Com relação aos dados de síntese de PEI nos grupos de açúcares, podemos observar que a adição de citrato ao meio de cultura, na concentração de 50 mM, reduziu os valores de síntese em torno de 20 a 30% nos grupos sacarose, glicose e dextrina, porém, no grupo frutose, a síntese foi inibida cerca de 80%. Com o aumento da concentração para 100mM, houve uma inibição, em média, de 80% para todos os grupos de açúcares. O resultado foi estatisticamente significativo, demonstrando que o citrato tem também a capacidade de inibir a síntese de PEI pela placa dentária.

Este achado poderia justificar a observação de PAVARINI⁶¹ (1980), de que a incidência de cáries de sulco foi maior que a de cáries de superfícies lisas, quando os ratos eram tratados com citrato e mantidos em dieta cariogênica, embora tenhamos que considerar que a espécie de ratos utilizados apresente lesões de cárie com estas características.

Pode-se observar que os resultados, demonstrando a capacidade do citrato agir a nível do metabolismo bacteriano, se relacionam com aqueles encontrados por MOREIRA⁵² (1982) e PAVARINI et al⁶² (1981), nos quais o citrato demonstrou ter uma ação anticariogênica quando administrado a ratos em associação com uma dieta cariogênica

O fato do citrato inibir dois dos fatores que determinam a virulência da placa bacteriana, sem dúvida, pode colaborar para o seu efeito anticariogênico, sendo considerado vantajoso o consumo de alimentos que apresentem altas concentrações de ácido cítrico, a exemplo das frutas cítricas, especialmente o limão com uma concentração que varia de 5 a 8%, constituindo uma forma natural no controle da placa bacteriana e conseqüentemente, na prevenção da cárie.

6- CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, através da metodologia empregada neste trabalho podemos concluir que:

1- A glicose apresentou significante maior atividade de produção ácida em relação aos outros carboidratos.

2- O íon citrato, independente da concentração, foi capaz de inibir a fermentação desses carboidratos pela placa dentária.

3- A sacarose promoveu significante maior síntese de PEI, quando comparada com os outros carboidratos.

4- A inibição da síntese de polissacarídeos extracelulares insolúveis, independente do substrato usado, foi proporcional a concentração do citrato, exceto no grupo frutose.

SUMMARY

The purpose of this work was to evaluate the influence of carbohydrates often consumed in diet, as glucose, sucrose, fructose and dextrin, on fermentation and synthesis of extracellular insoluble polysaccarides of dental paque, *in vitro* and the inhibition of these metabolic activities produced by citrate.

So, it was used a suspension of dental paque (10 mg/ml of phosphate buffer 0,01M pH 7,0),that was incubated at presence of substrates at 37°C, for 2 hours for fermentation and 18 hours for synthesis of insoluble polysaccarides.

The fermentation was measured by titration with 0.05N NaOH solution. The estimation of the synthesis of insoluble polysaccarides was achieved by dosage of total carbohydrates. The sodium citrate was increased in an incubation medium on 50 and 100 mM of concentration.

The results indicated that the glucose showed the largest acid production activity and sucrose promoted the greatest synthesis of insoluble polysaccarides, when compared

with the other carbohydrates . The citrate was able to inhibit the carbohydrate fermentation and showed itself a great inhibitor of synthesis of extracellular insoluble polysaccarides.

KEY-WORDS:

Dental plaque - Fermentation - Insoluble polysaccharides synthesis - Sugars

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. ASHLEY, F.P., WILSON, R.F. The relationship between dietary sugar experience and the quantity and biochemical composition of dental plaque in man. *Archs oral Biol.*, Oxford, v.22, n.7, p.409-414, 1977.
2. BIJELLA, M.F.T.B. et al. Avaliação do efeito inibidor de dentifrícios antiplaca disponíveis no mercado sobre o metabolismo da placa dentária humana (Estudo "in vitro"). *Rev. bras. Odont.*, Rio de Janeiro, v.49, n.1, p.29-34, jan./fev. 1992.
3. BIRKHED, D. Automatic titration method for determination of acid production from sugars and sugar alcohols in small samples of dental plaque material. *Caries Res.*, Basel, v.12, n.3, p.128-136, 1978.
4. _____, ROSELL, K.G. Structural studies on polysaccharides synthesized from sucrose by soluble enzymes in human dental plaque material. *Odont. Revy*, Malmo, v.26, n.4, p.281-290, 1975.
5. _____, SKUDE, G. Relation of amylase to starch and lyccasin® metabolism in human dental plaque *in vitro*. *Scand. J. dent. Res.*, Copenhagen, v.86, n.4, p.248-258, July, 1978.

* De acordo com a NBR-6023, de agosto de 1989, da Associação Brasileira de Norma Técnicas (ABNT).
Abreviatura dos periódicos de conformidade com o "World List of Scientific Periodicals".

6. BOWEN, W.H. Food components and caries. *Adv. dent. Res.*, Washington, v.8, n.2, p.215-220, July 1994.
7. BRECX, M., THEILADE, J., ATTSTROM, R. Ultrastructural estimation of effects of sucrose and glucose rinses on early dental plaque formed on plastic films. *Scand. J. dent. Res.*, Copenhagen, v.89, n.2, p.157-164, Apr. 1981.
8. CARLSSON, J., GRIFFITH, C. Fermentation products and bacterial yields in glucose-limited and nitrogen-limited cultures of *streptococci*. *Archs oral Biol.*, Oxford, v.19, n.12, p.1105-1109, Dec. 1974.
9. CRITCHLEY, P. The formation of extracellular polysaccharides from glucose in monkey plaque *in vivo*. *Caries Res.*, Middlesex, v.3, p.205-206, 1969.
10. DEWAR, M.D., WALKER, G.J. Metabolism of the polysaccharides of human dental plaque. I. Dextranase activity of *streptococci* and extracellular polysaccharides synthesized from sucrose. *Caries Res.*, Basel, v.9, n.1, p.21-35, 1975.
11. DISTLER, W., KRONCKE, A. The acid pattern in human dental plaque. *J. dent. Res.*, Washington, v.62, n.2, p.87-91, Feb. 1983.
12. DODDS, M.W.J., EDGAR, W.M. Effects of dietary sucrose levels on pH fall and acid-anion profile in human dental plaque after a starch mouth rinse. *Archs oral Biol.*, Oxford, v.31, n.8, p.509-512, 1986.

13. DODDS, M.W.J., EDGAR, W.M. The relationship between plaque pH, plaque acid-anion profiles and oral carbohydrate retention after ingestion of several "reference foods" by human subjects. *J. dent. Res.*, Washington, v.67, n.5, p.861-865, May 1988.
14. DRUCKER, D.B., VERRAN J. Comparative effects of the substance-sweeteners glucose, sorbitol, sucrose, xylitol and trichlorosucrose on lowering of pH by two oral *Streptococcus mutans* strains *in vitro*. *Archs oral Biol.*, Manchester, v. 24, p. 965-970, 1980.
15. DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K. et al Colorimetric method for the determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, v.28, p.350-356, 1956
16. DUBOIS, L.M. et al. A comparison between the effects of sucrose and fructose intake on early plaque formation. *Clin. prev. Dent.*, Philadelphia, v.6, n.6, p.6-8, Nov./Dec. 1984.
17. DUGUID, R. In vitro acid production by the oral bacterium *Streptococcus mutans* 10449 in various concentrations of glucose, fructose and sucrose. *Archs oral Biol.*, Oxford, v.30, n.4, p.319-324, 1985.
18. FEATHERSTONE, J.D.B., RODGERS, B.E. Effect of acetic, lactic and other organic acids on the formation of artificial carious lesion. *Caries Res.*, Basel, v.15, n.5, p.377-385, 1981

19. FIEHN, N.E. The metabolism of polysaccharide in dental plaque: a review. *Tandlaegebladet*, Denmark, v.88, n.6, p.222-234, Mar. 1984.
20. FROSTELL, G. Effects of mouth rinses with sucrose, glucose, fructose, lactose, sorbitol and lycasin® on the pH of dental plaque. *Odont. Revy*, Malmo, v.24, n.3, p.217-226, 1973.
21. GARROCHO, A. A. Efeito do citrato de cálcio a 2% na incidência de cárie em ratos. *Archos Cent. Estud. Curs. Odont.*, Belo Horizonte, v.22, n.2, p.65-75, jul./dez. 1985.
22. GEDDES, D.A.M. Acids produced by human dental plaque metabolism *in situ*. *Caries Res.*, Basel, v.9, n.2, p.98-109, 1975.
23. _____ Diet patterns and caries. *Adv. dent. Res.*, Washington, v.8, n.2, p.221-224, July 1994.
24. GIBBONS, R.J., HOUTE, J. van. On the formation of dental plaques. *J. periodont.*, Copenhagen, v.44, n.6, p.347-360, June, 1973.
25. _____, NYGAARD, M. Synthesis of insoluble dextran and its significance in the formation of gelatinous deposits by plaque-forming *Streptococci*. *Archs oral Biol.*, Massachusetts, v.13, p.1249-1262, 1968.
26. GRENBY, T.H., PHILLIPS, A., MISTRY, M. Studies of the dental properties of lactitol compared with five other bulk sweeteners *in vitro*. *Caries Res.*, London, v.23, p.315-319, 1989.

27. GROBLER, S.R. Carbohydrate fermentation by human dental plaque. *J. dent. Ass. S. Africa*, South Africa, v.37, n.1, p.13-18, Jan. 1982.
28. GUGGENHEIM, B. Extracellular polysaccharides and microbial plaque. *Int. dent. J.*, Guildford, v.20, n.4, p.657-678, Dec. 1970.
29. HARTLES, R.L. Citrate in mineralized tissues. *Adv. oral Biol.*, New York, v.61, n.1, p.225-253, 1964.
30. _____, LEAVER, A.G. Citrate in mineralized tissues. I. Citrate in human dentine. *Archs oral Biol.*, Oxford, v.1, p.297-303, 1960.
31. HAYES, M. L., CARTER, E. C., GRIFFITHS, S.J. The acidogenic microbial composition of dental plaque from caries-free and caries-prone people. *Archs oral Biol.*, v. 28, n. 5, p. 381-386, 1983.
32. HOTZ, P., GUGGENHEIM, B., SCHMID, R. Carbohydrates in pooled dental plaque. *Caries Res.*, Washington, Basel, v.6, n.2, p.103-121, 1972.
33. HOUTE, J. van. Bacterial specificity in the etiology of dental caries. *Int. dent. J.*, Guildford, v.30, n.4, p.305-326, Dec. 1980.
34. _____ Role of micro-organisms in caries etiology. *J. dent. Res.*, Washington, v.73, n.3, p.672-681, Mar. 1994.
35. HUANG, C.T., LITTLE, M.F., JOHNSON, R. Influence of carbohydrates on *in vitro* lesion production. *Caries Res.*, Basel, v.15, n.1, p.54-59, 1981.

36. KELSTRUP, J., FUNDER-NIELSEN, T.D. Molecular interactions between the extracellular polysaccharides of *Streptococcus mutans*. *Archs oral Biol.*, Oxford, v.17, n.12, p.1659-1670, Dec. 1972.
37. KLEINBERG, I. Formation and accumulation of acid on the tooth surface. *J. dent. Res.*, Washington, v.49, n.6, p.1300-1316, Nov./Dec. 1970.
38. KRISTOFFERSSON, K., BIRKHED, D. Effects of partial sugar restriction for 6 weeks on numbers of *Streptococcus mutans* in saliva and inter-dental plaque in man. *Caries Res.*, Basel, v.21, n.1, p.79-86, Jan./Feb. 1987.
39. LAGERLÖF, F., DAWES, R., DAWES, C. The effects of different concentrations of sucrose, fructose, and, glucose on pH changes by *Streptococcus mitior* in an artificial mouth. *J. dent. Res.*, Washington, v.64, n.3, p.405-410, Mar. 1985.
40. LEACH, S. A. et al. Studies on the polysaccharides of the matrix of dental plaque. *Caries Res.*, Middlesex, v.3, p.206, 1969.
41. LIE, T. Early dental plaque morphogenesis: a scanning electron microscope study using the hydroxyapatite splint model and low-sucrose diet. *J. periodont.*, Copenhagen, v.12, n.2, p.73-89, Mar. 1977.
42. LINGSTRÖM, P. et al. Effects of chemically modified starches in suspensions and lozenges on pH of human dental plaque. *Scand. J. dent. Res.*, Copenhagen, v.99, n.1, p.30-39, Feb. 1991.

43. LINGSTRÖM, P. et al. Effect of frequent consumption of starchy food itens on enamel and dentin demineralization and on plaque pH in situ. *J. dent. Res.*, Washington, v.73, n.3, p. 652-660, Mar. 1994.
44. LISTGARTEN, M.A. Structure of the microbial flora associated with periodontal health and disease in man: a light and electron microscopic study. *J. periodont.*, Copenhagen, v.47, n.1, p.1-18, Jan. 1976.
45. ———. The role of dental plaque in gingivitis and periodontitis. *J. clin. Periodont.*, Copenhagen., v.15, n.8, p.485-487, Sept. 1988.
46. LÖE, H., THEILADE, E., JANSEN, S.B. Experimental gingivitis in man. *J. periodont.*, Copenhagen, v.36, p.177-187, 1965.
47. MÄKINEN, K.K., SCHEININ, A. The effect of various sugars and sugar mixtures on the activity and formation of enzymes of dental plaque and oral fluid. *Acta odont. scand.*, Oslo, v.30, n.2, p. 259-275, May, 1972.
48. MATEE, M.I.N. et al. Fermentation of carbohydrates in different flours by *Streptococcus mutans*. *Archs oral Biol.*, Oxford, v.38, n.7, p.627-629, July 1993.
49. McCLURE, F.J., RUZICKA, S.J. The destructive effect of citrate vx. lactase ions on rats' molar tooth surfaces, *in vivo*. *J. dent. Res.*, Washington, v.25, n.1, p.1-12, Feb. 1946.
50. MENAKER, L. *Cáries dentárias : bases biológicas*. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 1980.

51. MILLER, B.F. et al. Decomposition of carbohydrates substrates by dental plaque material. *J. dent. Res.*, Washington, v.19, n.5, p.473-478, Oct. 1940.
52. MOREIRA, M.C.F. *Contribuição ao estudo do citrato e sua associação com o flúor sobre a incidência de cárie em ratos*. Tese (Mestrado em Odontopediatria) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, 1982. 74p.
53. MORHART, R.E., FITZGERALD, R.J. Nutritional determinants of the ecology of the oral flora. *Dent. Clin. N. Am.*, Philadelphia, v.20, n.3, p.473-489, July, 1976.
54. MÖRMÄNN, J.E., MÜHLEMANN, N. Oral starch degradation and its influence on acid production in human dental plaque. *Caries Res.*, Basel, v.15, n.2, p.166-175, 1981.
55. NEFF, D. Acid production from different carbohydrate sources in human plaque in situ. *Caries Res.*, Basel, v.1, n.1, p.78-87, 1967.
56. NEWBRUN, E. *Cariologia*. 2.ed. São Paulo : Editora Santos, 1990.
57. _____. Extracellular polysaccharides synthesized by glucosyl transferases of oral streptococci: composition and susceptibility to hydrolysis. *Caries Res.*, Basel, v.6, n.2, p.132-147, 1972.
58. _____. Sucrose in the dynamics of the carious process. *Int. dent. J.*, Guildford, v.32, n.1, p.13-23, Mar. 1980.

59. NEWBRUN, E. LACY, R., CHRISTIE, T.M. The morphology and size of the extracellular polysaccharides from oral streptococci. *Archs oral Biol.*, Oxford, v.16, n.8, p.863-872, Aug. 1971.
60. PAOLINO, V. J. Anti-caries activity of cocoa. *J. dent. Res.*, v. 61 (Sp. issue), p. 171, 1982.
61. PAVARINI, A. *Contribuição ao estudo do efeito do citrato e do flúor na prevenção da cárie dentária em ratos (Rattus norvegicus albinus Wistar)*. Tese (Livre-Docente em Odontopediatria) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, 1980. 88p.
62. _____, LIMA, J.E. de O., PINHEIRO, C.E. Efeito da administração de citrato na incidência de cáries em ratos. *Revta. Ass. paul. Cirurg. Dent.*, São Paulo, v.35, n.1, p.78-81, jan./fev. 1981.
63. PEARCE, E.I.F. Adsorption of streptococcal extracellular polysaccharides by hydroxyapatite. *Archs oral Biol.*, Oxford, v.21, n.9, p.545-549, 1976.
64. PINHEIRO, C.E. Inibidores enzimáticos e cárie dentária. *Revta. Ass. paul. Cirurg. Dent.*, São Paulo, v.33, n.4, p. 290-292, jul./ago. 1979.
65. _____ Curso de bioquímica da cárie dental. IV- Fatores etiológicos : microorganismos. *Revta. paul. Odont.*, São Paulo, v.5, n.4, p.50-61, jul./ago. 1983.

66. PINHEIRO, C.E. Curso de bioquímica da cárie dental. V-Fatores etiológicos: dieta e nutrição. *Revta. paul. Odont.*, São Paulo, v.5, n.2, p.46-55, mar./abr. 1983.
67. _____. Curso de bioquímica da cárie dental. VI-Fatores etiológicos: suscetibilidade do dente. *Revta. paul. odont.*, São Paulo, v.5, n.5, p.53-62, set./out. 1983
68. _____. et al. Efeito do extrato de guaraná e de stévia rebaudiana bertonii (folhas) e do esteviosídeo, sobre a fermentação e a síntese de polissacarídeos extracelulares insolúveis da placa dentária. *Revta. Odont. Univ. S. Paulo*, São Paulo, v.1, n.4, p.9-13, out./dez. 1987.
69. _____. et al. Fatores que influenciam *in vitro* a síntese de polissacarídeos extracelulares insolúveis da placa dentária humana. *Revta. Odont. Univ. S. Paulo*, São Paulo, v.3, n.1, p.258-261, jan./mar. 1989.
70. RÖLLA, G. Why is sucrose so cariogenic? The role of glicosyltransferase and polysaccharides. *Scand. J. dent. Res.*, Copenhagen, v.97, n.2, p.115-119, Apr. 1989.
71. _____, SCHEIE, A.A., CIARDI, J.E. Role of sucrose in plaque formation. *Scand. J. dent. Res.*, Copenhagen, v.93, n.2, p. 105-111, Apr. 1985.
72. SALAKO, N.O., KLEINBERG, I. Comparison of the effects of galactose and glucose on the pH responses of human dental plaque, salivary sediment and pure cultures of oral bacteria. *Archs oral Biol.*, Oxford, v.37, n.10, p.821-829, Oct. 1992.

73. SCHEININ, A., MÄKINEN, K.K. Effect of sugars and sugar mixtures on dental plaque. *Acta odont. scand.*, Oslo, v.30, n.2, p.235-257, May, 1972.
74. _____, _____. The effect of various sugars on the formation and chemical composition of dental plaque. *Int. dent. J.*, Guildford, v.21, n.3, p.302-321, Sept. 1971.
75. SERPENTINO, A.H. et al. Formação da placa dentária "in vitro" por açúcar mascavo. *Revta. Odont. Univ. S Paulo*, São Paulo, v.2, n.4, p.213-217, out./dez. 1988.
76. SGAN-COHEN, H.D. et al. The effect of previous diet on plaque pH response to different foods. *J. dent. Res.*, Washington, v.67, n.11, p.1434-1437, Nov. 1988.
77. SHULMAN, E.H., ROBINSON, H.B.G. Salivary citrate content and erosion of the teeth. *J. dent. Res.*, Washington, v.27, n.4, p.541-543, Aug. 1948.
78. SILVA, A.M.F. et al. Effects of cheese on experimental caries in human subjects. *Caries Res.*, Basel, v. 20, p. 263-269, 1986.
79. SOCRANSKY, S.S., MANGANIELLO, S.D. The oral microbiota of man from birth to senility. *J. periodont.*, Copenhagen, v.42, n.8, p.485-496, Aug. 1971.
80. SOET, J.J., TOORS, F.A., GRAAFF, J. Acidogenesis by oral streptococci at different pH values. *Caries Res.*, Basel, v.23, n.1, p.14-17, Jan./Feb. 1989.

81. SÖNJU, T., RÖLLA, G. Chemical analysis of the acquired pellicle formed in two hours on cleaned human teeth *in vivo*. *Caries Res.*, Basel, v. 7, p. 30-38, 1973.
82. SORTINO, G., ALAZZO, U., CALABRO, R. Effetti della somministrazione di acido citrico nei ratti tenuti a dieta cariogena. *Riv. Italiana de Stomatol.*, Parmz, v.26, n.11, p.795-799, Nov. 1971.
83. SRERE, P.A. The molecular physiology of citrate. *Nature*, London, v.205, n.4973, p.766-770, Feb. 1965.
84. STAAT, R.H. et al. Effects of dietary sucrose levels on the quantity and microbial composition of human dental plaque. *J. dent. Res.*, Washington, v.54, n.4, p.872-879, July/ Aug. 1975.
85. STEPHAN, R.M., HEMMENS, E.S. Studies of changes in pH produced by pure cultures of oral micro-organisms. I. Effects of varying the microbic cell concentration. II. Comparison of different micro-organisms and different substrates. III. Some effects of mixing certain micro-organisms. *J. dent Res.*, Washington, v.26, n.1, p.15-41, Feb. 1947.
86. TANNER, H.A. The relationship of citrates to periodontal disease. *J. periodont.*, Copenhagen, v.38, n.3, p.242-250, May/Jun. 1967.
87. TATEVOSSIAN, A. Hydrolysis of some carbohydrate substrates by enzymes of pooled human dental plaque fluid. *Archs oral Biol.*, Oxford, v.27, n.1, p.39-43, 1982.

88. THEILADE, J. Development of bacterial plaque in the oral cavity. *J. clin. Periodont.*, Copenhagen, v.4, n.5, p.1-12, Dec. 1977
89. VAN DER HOEVEN, J.S., A slime-producing microorganism in dental plaque of rats, selected by glucose feeding. *Caries Res.*, Nijmegen, v.8, p.193-210, 1974
90. VAN DER HOEVEN, J.S., FRANKEN, H.C.M. Production of acids in rat dental plaque with or without *Streptococcus mutans*. *Caries Res.*, Basel, v. 16, p. 375-383, 1982.
91. VOLKER, J.F., PINKERTON, D.M. Acid production in saliva carbohydrate mixtures. *J. dent. Res.*, Washington, v.26, n.3, p.229-232, June 1947.
92. ZIPKIN, I. et al. The relation of salivary citrate to dental caries experience in children 12 to 14 years old. *J. dent. Res.*, Washington, v.36, n.6, p.823-827, Dec. 1957.
93. ZIPKIN, I. et al. The relation of salivary citrate to dental caries experience in children 12 to 14 years old. *J. dent. Res.*, Washington, v.36, n.6, p.823-827, Dec. 1957.