

UNICAMP



MARIA AUGUSTA BESSA REBELO

**AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA E CARIOGENICIDADE DA PLACA DENTAL FORMADA NA PRESENÇA DE SACAROSE OU GLICOSE + FRUTOSE. ESTUDO *in situ*.**

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

PIRACICABA – SP  
1998

R241a

34635/BC

MARIA AUGUSTA BESSA REBELO

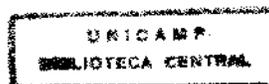
**AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA E CARIOGENICIDADE DA PLACA DENTAL FORMADA NA PRESENÇA DE SACAROSE OU GLICOSE + FRUTOSE. ESTUDO *in situ*.**

Este exemplar foi devidamente corrigido conforme resolução CCPq/634/83  
Jaime  
Dr. Jaime A. Cury  
Prof. Titular de Bioquímica  
FCP/UNICAMP

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

Orientador : Prof. Dr. Jaime Aparecido Cury

PIRACICABA – SP  
1998



21/10/2009

UNIDADE	80
N.º CHAMADA:	Piracicaba
	Rebela
V. Ex.	
TOMBO BC	34635
PROC.	395/98
C <input type="checkbox"/>	D <input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	04/08/98
N.º CPD	

CM-0011417B-1

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

R241 a Rebelo, Maria Augusta Bessa  
Análise bioquímica e cariogenicidade da placa dental formada na presença de sacarose e glicose + frutose. Estudo *in situ*. / Maria Augusta Bessa Rebelo. Piracicaba, SP: [s.n.], 1998.

Orientador: Jaime Aparecido Cury  
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas  
Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Placas dentárias. 2. Flúor. 3. Polissacarídeos.  
4. Sacarose. 5. Proteínas. I. Cury, Jaime Aparecido. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

A **Jesus Cristo**, por tudo.

A meus amados pais, **Carmen e José Jorge Rebelo**, pela criação, educação, exemplo de luta e sobretudo por me amarem como sou;  
a meus irmãos **Eber, Ney, Fernanda, Luíza, Rosana, Elaine, Janete, Paula** e sobrinhos,  
por nossa união;  
Ao **Piccinini** com afeto.

dedico este trabalho



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de **Doutorado**, em sessão Pública realizada em 07/05/98, considerou a candidata **MARIA AUGUSTA BESSA REBELO** aprovada.

1. Jaime Aparecido Cury *Jaime*

2. Maria Fidela de Lima Navarro *Maria Fidela de Lima Navarro*

3. Pedro Luiz Rosalen *Pedro Luiz*

4. Celso Paulino da Costa *Celso Paulino da Costa*

5. Maria Tereza Vitral de Carvalho Derbyshire *Maria Tereza Vitral de Carvalho Derbyshire*

*Para tudo há momento,  
e tempo para cada coisa sob o céu :  
tempo de nascer e tempo de morrer ;  
tempo de plantar e tempo de colher ;  
tempo de chorar e tempo de rir ;  
tempo de procurar e tempo de perder ;  
tempo de calar e tempo de falar ;  
tempo de amar ;  
tempo de guerra e tempo de paz.*

***Eclesiastes 3 : 1-9***

## **Agradecimento Especial**

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

## AGRADECIMENTOS

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

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

À **Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-graduação da Universidade do Amazonas** pelo apoio concedido.

Aos colegas do **Departamento de Estomatologia da Faculdade de Ciências da Saúde – UA**, pelo apoio recebido.

Ao **Prof. Dr. Carlos R. H. Fortinguerra**, coordenador do Curso de Biologia e Patologia Buco-Dental pelo apoio e atenção.

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

A **Dra Maria Tereza Carvalho Derbyshire** do Laboratório de Biologia de Proteínas Vegetais do **CENA-USP**, pela oportunidade de aprendizado, desenvolvimento das análises de proteínas e amizade.

Aos docentes do Curso de **Pós-graduação em Biologia e Patologia Buco-Dental**, pelos ensinamentos recebidos

À **Profª Dra. Rosana Cristina Pereira Parente**, do **Departamento de Estatística da Universidade do Amazonas** pela realização da análise estatística, sobretudo pela amizade, apoio, estímulo e exemplo de dedicação à carreira docente.

Às professoras **Janete Rebelo Vieira** e **Nikeila Chacon de Oliveira** do Curso de Odontologia da Universidade do Amazonas, companheiras de luta por um ideal e pela responsabilidade demonstrada na minha ausência.

Ao **Prof. José Antônio Nunes de Mello** do Curso de Odontologia da Universidade do Amazonas, pela documentação fotográfica, sobretudo pelo apoio e amizade.

Aos técnicos do Laboratório de Bioquímica Oral, **FOP-UNICAMP**, **Mariza de Jesus Carlos Soares**, **Waldomiro Vieira Filho**, **José Alfredo da Silva**, pelo imprescindível apoio no decorrer das análises laboratoriais e pela demonstração de carinho e amizade.

À **Raquel Míriam Orsi**, técnica de nível superior do Laboratório de Biologia de Proteínas Vegetais – **CENA-USP**, pela dedicação e companheirismo no decorrer das análises de proteínas.

Ao **CENA – USP**, na pessoa da técnica de nível superior **Iolanda Aparecida Rufini (Tatinha)** pela realização das análises de cálcio.

À Bibliotecária da FOP-UNICAMP, **Heloísa Ceccotti**, pela correção das referências bibliográficas.

À **Érica Buzzetto de Oliveira e Érica Fernandes** da secretária geral dos cursos de Pós-Graduação da FOP-UNICAMP, pela atenção recebida.

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

Aos voluntários participantes deste estudo, **Adriana, Daniela, Iadaza, Solimar, Alessandra, Adriano, Mello, Alfredo, Débora, Rodrigo, Michel e Silvana**, pelo exemplo de responsabilidade.

À **Profª Dra. Cinthia P. Machado Tabchoury**, FOP-UNICAMP, pela colaboração na língua inglesa e atenção.

Aos colegas de pesquisa do Laboratório de Bioquímica Oral da FOP-UNICAMP e áreas afins, **Adriana Franco, Alessandra Kleine, Cláudia Emy, Eliane Franco, Helena Decico, Kátia Braun, Michel Koo, Otacilio Netto, Paulo Peres, Rita Villena, Silvana Boldrini e Solimar Ganzarolli** pelo companherismo e solidariedade.

À **Dra Eliane de Mello Franco**, pelo grande apoio e amizade.

À **Etelvina Alves, Auxiliadora Brito, Mônica Bandeira e Silmara Pennini** pela atenção e carinho.

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

# SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE ABREVIATURA

RESUMO

1- INTRODUÇÃO .....	01
2- OBJETIVO .....	03
3- REVISÃO DA LITERATURA	
3.1 – Placa Dental – Considerações Gerais .....	04
3.1.1 – Componentes Inorgânicos (Ca, P e F), Orgânicos (carboidratos e proteínas) e Cárie Dental .....	04
3.1.2 – Formação da Placa dental .....	40
3.2 – Modelos Experimentais para Avaliar a Relação Dieta - Placa – Cárie Dental .....	47
4- MATERIAL E MÉTODO	
4.1 – Delineamento Experimental .....	62
4.2 – Fase Preparatória /Laboratorial 1	
4.2.1 – Preparo dos Blocos Dentais .....	64
4.2.2 – Seleção dos Blocos Dentais e Análise da Microdureza Superficial do Esmalte .....	66
4.2.3 – Confecção dos Dispositivos Intra-orais Palatinos .....	67
4.3 – Fase Clínica .....	68
4.4 – Fase Laboratorial 2	
4.4.1. – Determinação do Peso Úmido da Placa Dental .....	69
4.4.2 – Análise da Placa Dental	
4.4.2.1 – Análise de Componentes Inorgânicos .....	70
4.4.2.1.1 – Determinação da Concentração de Flúor .....	71
4.4.2.1.2 – Determinação da Concentração de Fósforo .....	71
4.4.2.1.3 - Determinação da Concentração de Cálcio .....	72
4.4.2.1.4 - Determinação da Concentração de Carboidrato Solúvel em Ácido .....	72

4.4.2.1.5 - Determinação da Concentração de Carboidrato Solúvel em Álcali .....	72
4.4.2.2 – Análise de Proteínas da Placa Dental e Saliva .....	73
4.4.2.2.1 – Análise da Concentração de Proteínas da Placa Dental .....	74
4.4.2.2.2 – Eletroforese de Proteínas da Placa Dental .....	74
4.4.2.2.3 – Análise da Concentração de Proteínas da Saliva.....	76
4.4.2.2.4 – Eletroforese de Proteínas da Saliva .....	76
4.4.3 – Avaliação Clínica da Cárie Dental .....	76
4.4.4 – Análise da Microdureza Superficial do Esmalte .....	77
4.4.5 – Análise do Microdureza Interna do Esmalte .....	78
4.4.6 – Análise da Concentração de Flúor no Esmalte .....	80
4.4.7 – Análise Estatística .....	81
5- RESULTADOS .....	82
6- DISCUSSÃO.....	115
7- CONCLUSÕES .....	121
8- ANEXOS .....	122
9- APÊNDICE .....	126
10- ABSTRACT .....	147
11- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	148

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### TABELAS :

Tabela I – Peso Úmido da Placa Dental .....	82
Tabela II – Concentração de Flúor na Placa Dental .....	84
Tabela III - Concentração de Fósforo na Placa Dental .....	86
Tabela IV - Concentração de Cálcio na Placa Dental .....	88
Tabela V - Concentração de Carboidrato Solúvel em Ácido da Placa Dental .....	90
Tabela VI – Concentração de Carboidrato Solúvel em Álcali da Placa Dental .....	92
Tabela VII – Concentração de Proteínas na Placa Dental .....	94
Tabela VIII – Avaliação Clínica dos Blocos de Esmalte após Tratamentos .....	104
Tabela IX – Microdureza da Superfície do Esmalte (% Perda Mineral) .....	105
Tabela X – Microdureza Interna do Esmalte .....	110
Tabela XI – Concentração de Flúor no Esmalte .....	113
Tabela XII - Concentração de Flúor na Água de Abastecimento de Piracicaba.....	127
Tabela XIII - Peso Úmido da Placa Dental.....	128
Tabela XIV– Concentração de Flúor na Placa Dental .....	129
Tabela XV - Concentração de Fósforo na Placa Dental .....	130
Tabela XVI - Concentração de Cálcio na Placa Dental .....	131
Tabela XVII – Concentração de Proteínas na Placa Dental .....	132
Tabela XVIII - Concentração de Carboidrato Solúvel em Ácido da Placa Dental .....	133
Tabela XIX – Concentração de Carboidrato Solúvel em Álcali da Placa Dental .....	134
Tabela XX – Microdureza da Superfície do Esmalte (% Perda Mineral) .....	135
Tabela X – Microdureza Interna do Esmalte .....	136
Tabela XI – Concentração de Flúor no Esmalte .....	139
Tabela XXII – Concentração de Proteínas na Saliva.....	132

## FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática das impressões iniciais realizadas nos blocos de esmalte .....	66
Figura 2: Dispositivo Intra-oral palatino .....	67
Figura 3: Representação esquemática das impressões realizadas nos blocos de esmalte .....	77
Figura 4: Corpo de prova com blocos de esmalte submetidos ao tratamento controle, glicose+frutose e sacarose .....	79
Figura 5: Diagrama representativo dos blocos de esmalte dentário com 15 indentações e respectivas posições e distâncias .....	79
Figura 6: Peso úmido da placa dental .....	83
Figura 7: Concentração de flúor na placa dental .....	85
Figura 8: Concentração de fósforo da placa dental .....	87
Figura 9: Concentração de cálcio da placa dental .....	89
Figura 10: Concentração de carboidrato da placa dental solúvel em ácido .....	91
Figura 11: Concentração de carboidrato da placa dental solúvel em ácido .....	93
Figura 12: Concentração de proteínas na placa dental .....	95
Figura 13: Gel de poliacrilamida referente a eletroforese de proteínas da placa dental ....	96
Figura 14: Gel de poliacrilamida referente a eletroforese de proteínas da saliva .....	98
Figura 15: Diagrama de perfis proteicos dos géis de poliacrilamida.....	99
Figura 16: Diagrama de perfis proteicos dos géis de poliacrilamida.....	100
Figura 17: Diagrama de perfis proteicos dos géis de poliacrilamida.....	101
Figura 18: Aspectos dos blocos de esmalte dental referentes ao grupo controle após 28 dias de acúmulo de placa .....	102
Figura 19: Aspectos dos blocos de esmalte dental referentes ao grupo glicose+frutose após 28 dias de acúmulo de placa .....	103
Figura 20: Aspectos dos blocos de esmalte dental referentes ao grupo sacarose após 28 dias de acúmulo de placa.....	103
Figura 21: Microdureza superficial do esmalte (% de perda mineral) .....	106
Figura 22: Aspecto microscópico do esmalte dental do grupo controle com as impressões realizadas .....	107
Figura 23: Aspecto microscópico do esmalte dental do grupo glicose+frutose com as impressões realizadas .....	108

Figura 24: Aspecto microscópico do esmalte dental do grupo sacarose com as impressões realizadas.....	109
Figura 25: Aspecto microscópico (50x) da secção interna do esmalte do grupo controle com as impressões realizadas .....	111
Figura 26: Aspecto microscópico (50x) da secção interna do esmalte do grupo Glicose+frutose com as impressões realizadas .....	112
Figura 27: Aspecto microscópico (50x) da secção interna do esmalte do grupo sacarose com as impressões realizadas .....	112
Figura 28: Concentração de flúor no esmalte (ppm x $\mu\text{m}$ ) .....	114
Figura 29: Digrama da eletroforese das proteínas da saliva.....	143
Figura 30: Digrama da eletroforese das proteínas da placa dental, grupo controle.....	144
Figura 31: Digrama da eletroforese das proteínas da placa dental, grupo glicose + frutose.....	145
Figura 32: Digrama da eletroforese das proteínas da placa dental, grupo sacarose.....	146

## LISTA DE ABREVIATURAS

ppm	partes por milhão
ppm F	partes por milhão de fluoreto
F	íon flúor, fluoreto
Ca	cálcio
P	fósforo
NaOH	hidróxido de sódio
HCl	ácido clorídrico
EDTA	ácido etileno-diaminotetracético
NaF	fluoreto de sódio
NaCl	cloreto de sódio
Na	sódio
K	potássio
Mg	magnésio
Cl	cloro
NH <sup>+</sup> <sub>4</sub>	íon amônio
PO <sub>4</sub>	fosfato
Pi	fósforo inorgânico
CaCl <sub>2</sub>	cloreto de cálcio
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	fosfato ácido de potássio
LTA	ácido lipotecóico
GTF	glicosiltransferase
Ip	penetrabilidade do iodo
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	ácido sulfúrico
TCA	ácido tricloroacético

M	molar
N	normal
carb.	carboidrato
MP	mistura padrão
SDS	dodecil sulfato de sódio
sob.	sobrenadante
sol.	solúvel
Rm	mobilidade relativa
PM	peso molecular
ppt.	precipitado
P.U.	peso úmido
MSE	microdureza superficial do esmalte
$\Delta$ KMH	variação de dureza Knoop
CPO-S	índice de superfícies dentais cariadas perdidas e obturadas
mV	milivolts
Apud	em
et al.	e outros (abrev. de "et alii")

TISAB II Total Ionic Strength Adjustive Buffer (tampão de ajuste de pH, força iônica e descomplexante) Composição: Tampão acetato 1M pH 5,0, contendo NaCl 1,0 M e ciclohexilenediaminotetracético 0,4%).

TISAB II ( 20,0 g NaOH/L ) mesma composição acima, ao qual se acrescentou 20 g de NaOH por litro de solução.

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi analisar a composição da placa dental formada na presença de sacarose ou glicose+frutose e sua relação com cariogenicidade. Doze voluntários adultos participaram deste estudo cruzado realizado em 03 etapas de 28 dias. Para cada fase do estudo, um dispositivo palatino de acrílico contendo 04 blocos de esmalte dental humano foi confeccionado para os voluntários. Uma solução de sacarose 20% ou glicose 10% + frutose 10% foi gotejada sobre os blocos de esmalte 8 x/dia, enquanto no grupo controle não foi utilizada nenhuma das soluções. Durante o período experimental, todos os voluntários utilizaram dentifrício não fluoretado, não escovaram os blocos dentais e ingeriram água fluoretada a 0,60 ppm F. Concentrações de cálcio, fósforo, flúor, carboidrato total e proteína (assim como eletroforese) foram determinadas na placa dental após cada fase. Nos blocos dentais analisou-se a concentração de flúor e microdureza superficial e interna do esmalte. Os resultados mostraram que a placa dental formada na presença de sacarose foi mais cariogênica que a formada quando da presença de glicose+frutose. Isto foi observado qualitativamente e comprovado quantitativamente ( $p < 0,05$ ) pela análise de microdureza superficial e interna do esmalte dental. Quanto à concentração de flúor no esmalte houve um aumento na superfície (12,9  $\mu\text{m}$ ) quando da placa formada na presença de sacarose ou glicose+frutose em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). Concentrações menores de Ca, P e F foram encontradas na placa formada na presença de sacarose e glicose+frutose em relação ao controle ( $p < 0,05$ ). A concentração de polissacarídeos insolúveis, quando da exposição à sacarose, foi maior em relação aos grupos controle e glicose + frutose ( $p < 0,05$ ). O perfil eletroforético das proteínas da placa dental mostrou padrões distintos quando a placa foi formada na ausência e presença dos diferentes carboidratos. Os resultados sugerem que a maior cariogenicidade da placa dental formada na presença de sacarose não pode ser explicada unicamente pela maior porosidade da sua matriz. Sua menor concentração inorgânica e a sua peculiar composição protéica também devem contribuir para o fenômeno.

## 1- INTRODUÇÃO

A cárie dental é um processo dinâmico que depende das condições prevalentes na interface dente-placa, quando da ingestão de carboidratos fermentáveis (CURY, 1993 ). Entre os carboidratos fermentáveis, a sacarose é considerada como o de maior potencial cariogênico, pois, além de produzir ácido quando metabolizada por microrganismos, é um substrato para síntese de glucanos extracelulares (NEWBRUN, 1967). Esta produção de glucanos decorre do aproveitamento de energia quando da hidrólise da sacarose ( RÖLLA, et al, 1985 ). Os glucanos extracelulares modificam a matriz da placa, aumentando o índice de difusão do açúcar e conseqüente produção de ácido na camada mais profunda da placa ( FU et al., 1991; ZERO et al. 1992 ; ZERO, 1995 ). Assim a placa dental formada na presença de sacarose pode ser mais cariogênica devido a um aumento na porosidade da matriz rica em glucanos ( DIBDIN & SHELLIS, 1988 ; van HOUTE, 1994 ). Entretanto estes não são os únicos fatores a serem considerados. A composição inorgânica da matriz da placa dental, especialmente em termos de cálcio, fósforo e flúor\*, determina o grau de saturação da placa em relação ao produto de solubilidade do esmalte (MARGOLIS et al., 1988 a,b; MORENO & MARGOLIS, 1988 ; TATEVOSSIAN, 1990 a,b; MARGOLIS & MORENO, 1992 ), definindo se haverá ou não desmineralização quando ocorrerem quedas de pH (MORENO & MARGOLIS, 1988 ; MARGOLIS et al., 1988a ; TATEVOSSIAN, 1990; MARGOLIS et al., 1993 ). Em adição, as concentrações de Ca e P na placa dental são relevantes em termos de desenvolvimento de cárie, considerando que há uma relação inversa entre concentração destes ions na placa dental ( ASHLEY,1971 ; 1972; 1975 a,b; ASHLEY & WILSON, 1977b, ; GROBLER et al., 1982 ; SHAW et al., 1983) e no fluido da placa ( TATEVOSSIAN, 1990b ; MARGOLIS, 1990 ; MARGOLIS & MORENO, 1992 ; MARGOLIS et al. 1993 ) e experiência de cárie. Assim, a placa formada sob uma freqüência de sacarose 8x/dia, apresenta 7x menos F , 10x menos P, 3x menos Ca e 3x mais polissacarídeos insolúveis em relação à formada na ausência de sacarose ( CURY et al. 1997 ). Deste modo, matematicamente, em termos de peso, o aumento da massa da placa, em termos de polissacarídeos não explica isoladamente a redução iônica proporcional. A diminuição na composição inorgânica da placa dental com o aumento da freqüência de sacarose, poderia ter três explicações. A primeira seria que o constante baixo pH ambiental pela fermentação da sacarose poderia liberar reservatórios

---

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

de íons minerais da placa, que se difundiriam para a saliva, o que entretanto ocorreria com outros carboidratos fermentáveis ( por exemplo glicose e frutose ). A segunda explicação poderia ser que o esmalte ganharia estes íons da placa dental durante as ciclagens de pH após desafio cariogênico, o que explicaria principalmente a redução de flúor na placa dental considerando o grau de saturação em relação à fluorapatita (LARSEN & BRUNN, 1994 ), entretanto isto ocorreria com outros carboidratos fermentáveis. E a terceira explicação poderia ser o balanço entre polissacarídeos/proteínas na matriz da placa dental durante a formação da placa na presença de sacarose, a qual poderia ser deficiente em proteínas ou peptídeos salivares aos quais poderiam se ligar íons Ca, P e F, o que ocorreria principalmente com sacarose devido a predominância de glucanos extracelulares.

Assim, o objetivo deste estudo foi relacionar a composição da placa dental formada na presença de glicose + frutose ou sacarose com cariogenicidade.

## **2- OBJETIVOS**

### **2.1- Objetivo Geral**

Relacionar a composição da placa dental formada na presença de glicose + frutose ou sacarose com a cariogenicidade das mesmas.

### **2.2- Objetivos Específicos**

- Comparar os efeitos da sacarose e glicose + frutose na formação e composição da placa dental através de :
  - Peso úmido da placa dental
  - Componentes inorgânicos ( Ca, P e F )
  - Componentes orgânicos ( Carboidratos e Proteínas )
  
- Analisar o grau de desmineralização e incorporação de flúor no esmalte sob a placa formada na presença de sacarose e glicose + frutose através de :
  - Exame Visual dos Blocos de Esmalte
  - Medidas de Microdureza Superficial e Interna do Esmalte Dental
  - Concentração de Flúor no Esmalte Dental

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Placa Dental - Considerações Gerais

A placa dental consiste de um agregado bacteriano imerso em um material amorfo denominado matriz da placa dental. Contém aproximadamente 80% de água e 20% de sólidos. A matriz da placa dental contém componentes inorgânicos, especialmente cálcio, fósforo e flúor, que contribuem com aproximadamente 5% a 10% do peso seco da placa (NIKIFORUK, 1985). As proteínas salivares e bacterianas compreendem aproximadamente 40% a 50% do peso seco da placa; carboidratos contribuem com 13% a 18% e lipídeos 10% a 14% (NEWBRUN, 1989). A glicose é o principal carboidrato encontrado na placa, entretanto a maioria dos carboidratos na matriz da placa dental apresentam-se como polímeros extracelulares, como glucanos (homopolímeros de glicose), frutanos (homopolímeros de frutose), ou heteropolissacarídeos, sintetizados pelas bactérias (HOTZ et al., 1972). Esses constituintes têm sido amplamente estudados e considerados como fatores determinantes para o desenvolvimento ou não da cárie dental.

##### 3.1.1- COMPONENTES INORGÂNICOS ( Ca, P e F ), ORGÂNICOS (CARBOIDRATOS E PROTEÍNAS) E CÁRIE DENTAL.

O primeiro estudo de composição da placa dental parece ter sido feito por DOBBS em 1932. Este autor sugeriu que a remoção da placa dental por um solvente químico poderia ser útil para o controle da cárie. Portanto, coletou placas e tentou dissolvê-las com uma ampla variedade de solventes. Embora tenha ocorrido solubilidade, nenhum destes produtos mostrou eficácia para a remoção da placa *in vivo*. Continuando seus estudos, este autor coletou placa dental, realizou extração com NaOH 5% e então filtrou, dializou e precipitou com HCl as proteínas. O precipitado de proteínas compreendeu 28-52% do total de proteínas da placa, tendo o autor afirmado que essa proporção representava o teor de mucina na placa.

DAWES (1962), observou que, quando a placa foi homogeneizada em NaOH 0,1N, aproximadamente 33% (variação de 15-51%) do nitrogênio da placa estava presente em solução enquanto somente 5% foi dissolvido em água. Histologicamente as bactérias aparentavam permanecer intactas.

FERGUSON (1964) tentou correlacionar as proteínas da matriz da placa dental com as da saliva por eletroforese em gel de amido. Este autor relatou a separação de 07 proteínas da placa dental, as quais corresponderam em mobilidade às 07 proteínas estudadas na saliva da parótida de um indivíduo. Através da coloração para carboidratos foi demonstrado que as proteínas eram glicoproteínas. Este resultado parece sustentar a visão de que proteínas salivares contribuem para a placa dental, mas não exclui a possibilidade de que proteínas bacterianas por si só também estivessem envolvidas.

CARLSSON & SUNDSTRÖM, em 1968, investigaram a composição química, quantidade, densidade microbiana e aparência histológica da placa dental formada sob dietas com freqüentes bochechos de sacarose ou glicose. O estudo consistiu de dois períodos experimentais, com duração de três dias cada, com amostras de placa coletadas de sete voluntários. A dieta nesses períodos foi leve, isenta de sacarose e cereais. Essa dieta foi suplementada a cada meia hora, durante o dia, com um bochecho de solução de sacarose 25% ou glicose 25% (10 mL) em cada período. Os voluntários foram instruídos a não escovar seus dentes e alimentar-se de tal forma a evitar a fricção do alimento com a superfície vestibular. As amostras de placa foram coletadas pela manhã no final de cada período, pesadas e homogeneizadas em 2 mL de "tampão salina" (0,05 M, pH 7,3) 4° C. Após 0,1 mL do homogenado ter sido selecionado para cultura, o restante foi imediatamente liofilizado e então estocado sob vácuo em ampola selada. O ensaio químico do material da placa foi realizado quando todas as amostras tinham sido coletadas. As amostras foram reidratadas em 1,9 mL de água destilada e então estocadas a -20° C. Carboidrato total foi estimado de acordo com DUBOIS et al. (1956). O teor de nitrogênio foi analisado pelo método Kjeldahl. A quantidade de placa formada em volume (média e variação) no período sacarose foi 156 µl (44 - 425) e 35 µl (8 - 97) no período glicose. A densidade de microrganismos viáveis e concentração de nitrogênio- Kjeldahl foi significativamente maior na placa coletada após o período

glicose. Por outro lado, a relação carboidrato por unidade de nitrogênio na placa do período sacarose foi cinco vezes maior em relação ao período glicose. Esses resultados, juntamente com o que é conhecido sobre microbiota da placa, indicam que, após ingestão de sacarose uma considerável quantidade de espaços na placa poderia ser ocupado por dextranos intermicrobianos. Esta interpretação foi sustentada pelo aspecto histológico da placa.

KREMBEL et al., em 1969, com o objetivo de obter frações celulares e acelulares da placa dental, testaram diferentes procedimentos químicos e verificaram a pureza das frações obtidas através de observações em microscópio eletrônico. Após, o uso de um spray com água, placa dental foi coletada com uma espátula de aço, pela manhã, de pacientes em jejum e sem escovação dos dentes. As placas foram primeiro tratadas com soluções de EDTA 0,1, 0,5 e 1% (por 10, 30 e 45 minutos, 1 h e 3 h), NaOH 0,01N e HCl 0,1N, ou solução de tampão fosfato (pH 7,4), sendo então centrifugadas em sacarose com gradiente 0-50%. Em outros experimentos, as placas foram fervidas em água destilada, ou submetidas alternadamente a congelamento e aquecimento em temperatura ambiente. Também foi utilizada agitação ultrasônica ou tratamento com lisozima. Todos esses procedimentos foram seguidos por centrifugação em gradiente de sacarose. Entretanto, sob microscopia eletrônica, nenhum destes métodos foi apropriado para obtenção de uma fração celular e clara, livre de bactérias, ou uma fração celular livre de matriz aderente. Uma separação satisfatória foi alcançada com o seguinte método. Aproximadamente 20 mg de placa dental humana, coletada com um espátula de aço, em 2-3 ml de água bi-distilada (pH 6,5), foi dispersada por ativação mecânica com um bastão de vidro, por 10 minutos. Após 5 minutos de centrifugação a 3000 rpm, o sobrenadante foi filtrado em Millipore (0,45  $\mu$ ). Observações em microscopia eletrônica mostraram que essa fração, livre de bactérias, tinha uma ultra-estrutura de granulação fina, e foi considerada como acelular. Ao contrário, os sedimentos obtidos foram compostos de um grande número de microrganismos. Análises bioquímicas preliminares foram realizadas no material da placa total, assim como nas frações celulares e acelulares obtidas com este último método. Extração com clorofórmio-metanol (2:1 v/v), mostrou um teor relativamente alto de lípideo (26-30%) na fração acelular. O teor de proteínas dessa fração, estimada pelo método de Folin, foi baixo, portanto as proteínas

da placa estão principalmente associadas com a fração celular (40-70%). Análises preliminares mostraram que a fração acelular contém 3 x mais cálcio do que a fração celular e 2 x mais fósforo.

GUGGENHEIN, em 1970, descreveu uma abrangente revisão considerando diferentes aspectos da formação de polissacarídeos extracelulares em relação à placa dental, conforme exposição a seguir. A primeira evidência direta da ocorrência de polissacarídeos na placa dental foi fornecida por McDOUGALL em 1964. Extratos de amostra de placa precipitados em etanol 70% foram hidrolisados e análises revelaram que frutose era o único componente. O autor concluiu sobre essa base que o polissacarídeo era um levano que correspondia de 0,3 – 2,9% do total do peso seco de 25 amostras individuais. Uma investigação similar foi realizada por CRITCHLEY et al. (1967), que fizeram extratos de amostras de placas com água fria e subseqüentemente com hidróxido de sódio 0,5 N. A hidrólise ácida seguida de cromatografia em papel do extrato dialisado com água fria, mostrou glicose e frutose como principais componentes, ao passo que glucose foi o principal constituinte no material hidrolisado extraído com álcali. O procedimento de extração foi repetido após uma incubação *in vitro* das amostras de placas em sacarose; o material solúvel em água encontrado foi uma mistura de frutano e glucano, enquanto na fração solúvel em álcali se encontrou um glucano que foi precipitado em etanol a 45%. Uma degradação Smith modificada foi realizada para estabelecer os tipos de ligações desses polissacarídeos, e os principais tipos de ligações glicosídicas encontradas foram hexopiranosídeo 1-6 e/ou 1-2 e cetofuranosídeo 2-6. Concluiu-se, portanto, que os polissacarídeos na placa eram dextransos e levanos. Entretanto, os produtos da reação foram somente identificados qualitativamente por cromatografia de papel. O dextrano foi o principal polissacarídeo encontrado na matriz da placa, enquanto que o levano correspondeu apenas 1 a 2% do total do peso seco. A pequena quantidade de polissacarídeos extracelulares extraíveis da placa dental não foi suficiente para extensivas análises químicas, além do mais, essas substâncias não eram homogêneas. Para superar essas dificuldades, polissacarídeos extracelulares sintetizados *in vitro* por culturas puras de estreptococos orais têm sido estudados. Duas frações de polissacarídeos extracelulares foram isoladas a partir de estreptococos do grupo mutans, e ambas evidenciaram serem glucanos, mas somente uma fração foi solúvel

em água (DONOHUE et al., 1966 ). Portanto, a partir desta revisão pode-se concluir que uma das características da placa dental é a habilidade para sintetizar substâncias extracelulares. Polissacarídeos extracelulares e glicoproteínas salivares parecem ser os principais constituintes da matriz da placa sendo os polissacarídeos produzidos por determinadas bactérias orais a partir da sacarose. Os polissacarídeos isolados da placa dental têm demonstrado ser glucanos e frutanos. Entretanto esses componentes não são homogêneos do ponto de vista químico ou morfológico, apresentando diferenças na solubilidade. Análises químicas, incluindo alguns trabalhos estruturais, têm sido feitas principalmente sobre frações que eram solúveis em água e sobre o material que foi extraído com soluções alcalinas fracas. A fração de polissacarídeos insolúveis somente foi extraída com álcali forte. Devido a suas propriedades químicas e físicas os glucanos insolúveis têm sido considerados como a “peça de resistência” da matriz da placa dental.

FOX & DAWES, em 1970b , realizaram um estudo no qual as proteínas da placa dental extraídas com vários solventes foram comparadas com amostras de misturas de culturas puras de alguns tipos de microrganismos predominantes na placa dental. Isso permitiu uma estimativa da proporção de proteínas na matriz da placa e do provável grau de contaminação pelos produtos liberados e das proteínas bacterianas da matriz extraída da placa por vários solventes. Participaram deste experimento, estudantes que foram instruídos a não escovarem os dentes por 2 dias. Na manhã do 3<sup>o</sup> dia, em jejum, a placa foi removida com uma cureta de todas as áreas dos dentes exceto a superfície lingual dos dentes anteriores. A placa foi pesada, imediatamente em uma balança de torção para 0,1 mg e colocado em 3 ml de salina 0,4% a 0° C para permitir a mistura de várias amostras de placa. A placa e salina foram agitadas para facilitar a remoção de amostras representativas. Um total de 10-80 mg de placa por indivíduo foi usualmente obtida. Para a extração de proteínas da mistura de microrganismos ou da placa dental alíquotas da mistura de microrganismos ou da placa dental foram adicionados a 8 diferentes tampões de força iônica 0,05 em uma faixa de pH variando de 1,3 – 12,7. O volume foi feito para 1 ml com teor de proteína total de aproximadamente 2 mg e a temperatura foi mantida a 0°, 23 ° ou 37° C. No tempo zero, as amostras foram submetidas a análises e, após 30 minutos, os tubos foram centrifugados e o sobrenadante coletado. As análises de proteínas foram realizadas pelo método de LOWRY et al. (1956) e porcentagem de

proteína total no sobrenadante foi calculada. Para determinar o grau de variabilidade individual na porcentagem de proteínas extraíveis da placa dental, 16 amostras de placa de 03 dias foram colocadas em NaOH 0,05N a 0 ° C . No tempo zero, amostras foram tomadas para determinação de proteína total e, 1 hora após centrifugação, alíquotas do sobrenadante foram removidas para análise de proteína, e a porcentagem de proteína total da placa extraída em NaOH foi calculada. Para facilitar a comparação com o trabalho de SILVERMAN & KLEINBERG (1967) experimentos foram conduzidos nos quais alíquotas de mistura de microrganismos combinados e placa dental foram submetidos à extração com NaOH 0,1 N a 0° C e 23 ° C por 5 horas. Amostras foram obtidas em intervalos durante o período de 5 horas para seguir o grau de extração de proteínas. Com relação aos efeitos da temperatura e pH na extração de proteínas da placa dental e da mistura de microrganismos, os resultados foram submetidos a uma análise de variância, e os principais efeitos (por exemplo, temperatura, pH, placa dental x microrganismos combinados) foram significantes a nível de 1%. A quantidade de proteínas extraídas a 37 ° C foi levemente mas significativamente ( $p < 0,01$ ) maior que a 0 ° C ou 23 ° C. A variabilidade mínima tanto para a placa dental como para a mistura de microrganismos foi em pH 4,0 e 5,0 e a máxima em pH 12,7. Significativamente mais proteína ( $p < 0,001$ ) foi extraída da placa dental do que da mistura de microrganismos. Quanto à variação de pH, a proporção de porcentagem de proteína extraída da placa dental para a extraída da mistura de microrganismos, foi relativamente constante a aproximadamente 4:1. A porcentagem média de proteínas extraídas, de 16 amostras de placa dental, após exposição a NaOH 0,05N por 1 hora foi  $37,1 \pm 8,1\%$  (SD) com uma variação de 28,9 – 45,3%. Com relação à solubilização com NaOH 0,1 N das proteínas da placa dental e associação de microrganismos os resultados mostraram que a porcentagem de proteínas na placa neste experimento foi relativamente maior do que os valores obtidos quando a placa foi extraída com NaOH 0,05 N. Com um aumento no tempo de exposição ao NaOH 0,1N, houve um aumento na porcentagem de proteínas extraída da placa dental e da mistura de microrganismos . Entretanto, com o tempo de extração maior que 1 hora, o aumento absoluto na proteína extraída da placa dental foi aproximadamente igual ao aumento na proteína extraída da mistura de microrganismos. Portanto NaOH 0,1 N a 0° C durante 1 hora extrai basicamente proteínas da matriz da placa e não das bactérias.

KLEINBERG, em 1970, atribuíram à presença de cálcio e fósforo na placa dental com a formação de um complexo proteína-carboidrato-cálcio-fosfato sobre a superfície o qual levaria a precipitação de glicoproteínas salivares quando ocorresse aumento de pH.

SCHEININ & MÄKINEN, em 1971, avaliaram o efeito de vários açúcares na formação e composição da placa dental. O estudo consistiu de 02 períodos com duração de quatro dias cada, com participação de 46 estudantes sob um regime dietético. Durante esses períodos os estudantes deixaram de escovar os dentes e foram divididos em quatro grupos experimentais. Durante o primeiro período do experimento, os participantes estiveram sob uma dieta normal, portanto a ingestão de açúcar não foi excluída. No segundo período, cada um dos grupos esteve sob uma dieta estrita com relação a açúcar. Em adição à dieta regular cada grupo recebeu exclusivamente frutose, glicose, sacarose ou xilitol. A quantidade total individual dessas substâncias variou de 40 a 50 gramas, e a ingestão consistiu de 15 balas tipo toffes com intervalos de 1 hora. Essas balas continham frutose, glicose, sacarose ou xilitol. Ao final de cada período os estudantes foram avaliados quanto ao índice de placa (SILNEES & LÖE, 1964). Em seguida, a placa foi coletada, pesada e suspensa em salina fisiológica (4°C). A relação entre a quantidade de salina e placa foi 0,2 mL / 10 mg de placa. Com relação aos resultados, observou-se uma correlação positiva entre o índice de placa e o peso úmido da placa. A menor quantidade de placa e índice de placa foi encontrada no grupo xilitol, seguido pelos grupos frutose e glicose, enquanto a maior quantidade de placa e índice de placa foi observada no grupo sacarose. As diferenças entre os valores nos grupos xilitol e sacarose e entre os grupos frutose e sacarose foram estatisticamente significantes. As placas formadas com diferentes açúcares com relação ao cálcio, fósforo, proteína, ácido láctico, polissacarídeo tipo dextrano, não foram estatisticamente significantes. Por outro lado, a quantidade de hexosaminas e açúcar total ( fração de polissacarídeo parcialmente purificada ) da placa foi reduzida significativamente quando se comparou uma dieta normal com dietas contendo xilitol, glicose ou frutose, mas não sacarose.

ASHLEY, em 1971, realizou um estudo cujo objetivo foi relacionar a prevalência de cárie nos dentes superiores posteriores em estudantes com as concentrações de cálcio e fósforo na placa dental coletada desta região, e avaliar os efeitos do nível de cálcio e fósforo na saliva parotídeana e a ingestão do açúcar na dieta. Após a profilaxia e polimento, os estudantes abstiveram-se da escovação dental por 48 horas. Eles foram indagados sobre sua dieta, em particular atenção à ingestão de açúcar. Após 48 horas, eles mastigaram um doce por 5 minutos, e a placa foi coletada após 30 minutos; isto foi feito para padronizar a última exposição ao açúcar. A divisão de grupos de baixa e alta incidência de cáries foi de acordo com suas superfícies lisas dos dentes posteriores. Os resultados mostraram que indivíduos com baixo índice de cárie tinham significativamente maior nível de cálcio na placa ( $p < 0,05$ ), fósforo inorgânico ( $p < 0,001$ ) e fósforo total ( $p < 0,01$ ) e uma significativamente menor ingestão de açúcar no período de 48 horas ( $p < 0,05$ ).

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

FRY & GRENBY, 1972, com a finalidade de estudar os efeitos da redução da ingestão de sacarose sobre a formação e composição da placa dental, efetuaram um estudo no qual a sacarose foi omitida da dieta de um grupo de 19 homens por um período de 14 semanas, e substituído por xarope de glicose e ciclamato de cálcio. Observações foram feitas em dois períodos de 14 semanas, sendo o primeiro com uma dieta pobre em sacarose no qual os alimentos que continham sacarose foram substituídos por xarope de glicose e ciclamto de cálcio, e o segundo com uma dieta normal. O índice de placa dental foi avaliada quinzenalmente, e amostras foram coletadas para análise. Os voluntários abstiveram-se de qualquer procedimento de higiene oral por 3 dias antes de cada avaliação. As amostras de placa de cada indivíduo foram coletadas com escavadores, pesadas e secas para peso constante sob pressão reduzida, e estocadas a  $-20^{\circ}$  C até serem analisadas. Cada amostra de placa seca foi misturada com 4,0 mL de água em um tubo de centrífuga e homogeneizada com um bastão de vidro com tampa revestida de borracha. Após centrifugação a 3500 rpm por 15 minutos, o sobrenadante foi transferido. A extração foi repetida duas vezes mais, e os extratos foram combinados, dando um volume total de 12,0 mL. Aliquotas foram tomadas para a determinação de carboidrato solúvel total, levano solúvel, cálcio e fósforo. O resíduo após extração foi preservado para determinação de carboidrato total insolúvel. Os resultados obtidos mostraram que a extensão da placa atingiu um período crítico entre 6 – 10 semanas, então decaiu, até 14 semanas, declinou a um nível significativamente menor em relação à dieta normal contendo sacarose. Comparado com a dieta normal, a dieta com substituição de sacarose por xarope de glicose e ciclamato de cálcio produziu uma placa contendo significativamente mais carboidrato solúvel, mas não houve diferença nos carboidratos totais insolúveis, ou em “levanos” solúveis. Níveis de cálcio solúvel na placa foram similares nos dois períodos, mas a placa com substituição de sacarose por glicose conteve mais fósforo do que a placa normal.

GIBBONS & van HOUTE, 1973, em seus relatos sobre a formação de placa dental citam que possivelmente o melhor exemplo de adesão interbacteriana mediada por polímeros bacterianos diz respeito aos *Streptococcus mutans*. Existem dados que indicam que o único potencial do *S. mutans* está associado com sua habilidade para formar placa dental em superfície lisa, e que isto é dependente da síntese de polissacarídeo extracelular a partir da sacarose. O *S. mutans* forma

depósitos microbianos aderentes na presença de sacarose, e isto forma uma extensa placa bacteriana em animais alimentados com uma dieta contendo esse substrato.

MANDEL, 1974, em uma revisão, estudou a relação da saliva e placa com cárie dental, e descreveu que a quantidade de matriz intercelular na placa é extremamente variável e amplamente dependente da dieta. A placa é formada mesmo em indivíduos alimentados por sonda, mas é fina e produz relativamente pouco ácido. Quando a ingestão de sacarose é alta, a placa cresce rapidamente devido à formação de uma quantidade substancial de dextrano. Quando a ingestão é um pouco mais moderada, 115 g / dia, a quantidade de placa não é significativamente elevada, embora dextrano e levano estejam aumentados. Quando a glicose é o principal açúcar da dieta, a matriz intercelular consiste em um heteropolissacarídeo composto de glucose, galactose, hexosamina, e pequenas quantidades de outros açúcares.

HOLT, em 1975a, em seus estudos sobre placa dental humana avaliou as características físicas e químicas e atividade enzimática de extratos de placa dental. Foi coletada placa dental humana supragengival de pacientes com vários graus de cárie e doença periodontal. Os extratos de placa, preparados em cinco diferentes soluções ( quatro com pH variando de 1,8-12,7; e um contendo uréia ), foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida e testados para atividade enzimática da amilase e lisozima. Considerando que não foram observadas vantagens qualitativas ou quantitativas na utilização de extremos de pH ou uréia, todos os extratos subsequentes foram preparados em tampão fosfato salina pH 7,3. Os extratos concentrados foram fracionados por filtração em gel e caracterizados por eletroforese em gel de poliacrilamida, mapeamento de peptídeos, estimação do peso molecular, determinação de atividade enzimática e análises de aminoácidos e carboidratos. Regiões de similaridade entre os géis foram reveladas pela comparação de perfis eletroforéticos do extrato da placa, soro normal e saliva total. O perfil de eluição do extrato da placa a partir de uma coluna padronizada Sephadex G-200 indicou a presença de proteínas de alto e baixo peso molecular que podem estar correlacionadas com os componentes do soro normal e da saliva. Uma terceira fração predominante não apresentou correlação com o soro e saliva. Os pequenos peptídeos nessa fração foram submetidos a análises de aminoácidos, carboidratos e mapas peptídicos. Os

aminoácidos mais abundantes foram alanina, ácido glutâmico, glicina, valina, leucina, lisina e serina. Estes pequenos componentes não continham açúcares aaminados ou neutros. O extrato da placa e os pequenos peptídeos exibiram semelhantes perfis.

Continuando o estudo descrito anteriormente, HOLT & MESTECKY, em 1975, avaliaram as características imunoquímicas da placa dental de humanos. Assim, foram preparados extratos de placa supragengival para análises imunoquímicas. Os sedimentos extraídos foram examinados por anticorpos fluorescentes para a presença de imunoglobulinas. Precipitação com antisoros mono-específicos e polivalentes revelaram IgA, IgG, componente secretor, C3,  $\alpha_2$ macroglobulina, lactoferrina, e albumina nos extratos. Filtração em gel do extrato da placa revelou duas frações que continham as proteínas acima mencionadas e uma proeminente, terceira fração dialisável que foi imunoquimicamente não reativa. IgA, IgG, componente secretor, e cadeias leves foram observadas, pela imunofluorescência, nos sedimentos da placa lavada. A liberação dessas imunoglobulinas pelo tratamento com uréia indicou sua provável participação dos complexos imunes.

Ainda em 1975b, HOLT avaliou a variação de proteínas na placa dental de humanos. Para tal, amostras de placa (coletada de 13 pacientes com experiência passada de cárie e vários graus de doença periodontal) foram dispersadas em 1 mL de água destilada, homogeneizada e liofilizada. Cada amostra liofilizada foi extraída em 1 mL de tampão salina, concentrada para 0,1 mL por diálise sob pressão negativa e analisada. Os estudos de atividade enzimática revelaram amilase em todas as amostras de placa. Lisozima estava presente ocasionalmente. A imunofluorescência dos sedimentos de placa individual revelou que IgA e IgG ocorreram freqüentemente. Eletroforese não dissociante em gel de poli-acrilamida dos extratos da placa de diferentes indivíduos, mostrou grande variabilidade, apesar de algumas zonas de similaridade. Os peptídeos mostraram similaridade.

De acordo com ASHLEY, 1975b, os resultados de 3 estudos sobre a placa de crianças e adultos indicaram que a resposta da placa a uma única exposição de 5 minutos a cubos de açúcar ou doces depende da condição inicial da placa. A placa foi coletada 15 minutos após exposição ao açúcar e homogeneizada com água

deionizada a 4° C. Assim, significativa diminuição no nível de cálcio e fósforo foi observada nas placas dos indivíduos que fizeram restrição previa a açúcar, mas não na placa sem esta condição.

Prosseguindo seus estudos, ASHLEY, em 1975a, realizou uma pesquisa sobre a relação entre os níveis de cálcio e fósforo na placa dental e o CPOS em meninos de 11 a 14 anos que, durante esse estudo fizeram uso de dentifrício sem flúor. A coleta da placa foi feita aos 6, 12 e 24 meses, após o exame odontológico inicial, e foi referida como visitas A, B, C respectivamente. As amostras de placa após a coleta foram estocadas à -17°C até a análise, sendo então homogeneizadas à 4°C em água deionizada. Os resultados dessa pesquisa mostraram que todos os coeficientes de correlação entre as concentrações de Ca e P e o CPOS total e o CPOS para superfícies lisas foram negativas nas visitas A, B, C, sendo que foram alcançadas diferenças estatísticas em 10 das 12 combinações nas visitas B e C, mas não na visita A. Foi observado também, ao final de um período de dois anos, que todos os coeficientes de correlação entre os níveis de cálcio e fósforo e a experiência de cárie foram negativos e seguiram um padrão semelhante àqueles já encontrados.

AGUS et al., 1976, realizaram uma pesquisa sobre a associação do conteúdo de flúor total da placa com a experiência individual de cárie de 72 escolares com idade de 9 a 13 anos, residentes em Katoomba, Sydney e Yass, que continham, na água de consumo, menos de 0,1 ppm F, 1,0 ppm F 4 anos antes da amostragem e 1,0 ppm F 16 anos antes da amostragem, respectivamente. As amostras de placa foram coletadas em frascos de polipropileno e homogeneizadas com bastão de vidro. Um volume mínimo de água destilada, para atingir uma consistência cremosa uniforme, foi adicionada às amostras, quando necessário. As amostras foram divididas em porções de aproximadamente 1 mg de peso seco para análise de íon flúor total e o restante para determinação de outros minerais : Ca, P, K, Mg, Sr, Zn, Pb, Cu, e Li. As amostras foram secas em estufas a 80° C. A média das concentrações de flúor na placa dental dos escolares de Katoomba foi de 13,5 ppm enquanto em Sidney foi obtida uma média de 22,6 ppm e em Yass 25,6 ppm (peso seco). Foi observada uma associação inversa significativa da concentração de flúor total na placa com a experiência de cárie para os escolares da cidade de Sydney e também quando analisada toda a amostra.

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

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

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

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

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

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

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

De acordo com os resultados obtidos, a correlação da composição da placa com a dieta não mostrou relação entre o tempo após a ingestão de açúcar e a composição da placa, exceto uma correlação negativa com carboidratos insolúveis em

álcali. Entretanto, foi observada uma correlação positiva entre a concentração de carboidrato da placa, com a exceção dos carboidratos solúveis em álcali, e a quantidade de açúcar na dieta, e em particular ao açúcar na forma líquida ( $p < 0,01$ ). Uma correlação negativa significativa entre açúcar solúvel no alimento e concentração de cálcio foi observada. A metodologia de extração dos componentes da placa dental foi descrita por ASHLEY, 1975b.

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

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

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

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

SCHAMSCHULA et al., em 1977, estudaram as concentrações de cálcio e fósforo em amostras de placas de 72 escolares residentes em Kattomba, Sydeny e Yass, selecionados de acordo com o nível de flúor na água de consumo. Pelos resultados obtidos, os autores não observaram diferenças significativas entre as 3 áreas para as concentrações de Ca e P.

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

JENKINS, 1978, descrevendo a síntese de polissacarídeos pela placa bacteriana, citou que, quando certas bactérias, incluindo várias espécies da placa, recebem sacarose, elas podem sintetizar vários tipos de polissacarídeos ou convertê-la em ácido. Durante a década de 60 aumentaram as evidências de que estes polissacarídeos eram importantes constituintes da placa e que influenciavam o processo da cárie. Isto levou a uma grande atividade de pesquisa em relação a métodos de prevenir sua acumulação na expectativa de que isto poderia reduzir cáries. Este autor diz ainda que são três os principais grupos de polissacarídeos que podem ser formados: (1) polímeros da glicose ( com o nome de glucanos) formados como uma massa gelatinosa extracelular, principalmente a partir da sacarose, por uma enzima conhecida como dextranosucrase (glicosiltransferase) da superfície da bactéria. As enzimas utilizam a energia da ligação entre frutose e glicose para sintetizar uma mistura de polímeros (glucanos, com a maioria das ligações na posição 1→6 de alto peso molecular, e simultaneamente liberar frutose). A formação de dextrano pode ser prontamente vista pela comparação da composição química da placa e sua aparência em microscopia eletrônica na condição de jejum e 6 a 9 minutos após bochecho com uma solução de sacarose a 10%. A formação de glucanos evidentemente aumenta o volume da placa e análises mostram que a fração insolúvel de alto peso molecular pode ocupar acima de 10% de peso seco da placa (o carboidrato total é aproximadamente 15%); (2) outra enzima (levanosucrase) converte em levanos – polímeros extracelulares da frutose razoavelmente solúveis, com ligação na posição 2→6, mas são formados em uma extensão menor do que os glucanos. Quando o suprimento de sacarose é esgotado, levanos são rapidamente metabolizados pelas enzimas da placa; (3) muitas bactérias orais estocam carboidratos como polissacarídeos intracelulares tipo glicogênio. Ao contrário dos polissacarídeos extracelulares, que são formados essencialmente a partir da sacarose, os polissacarídeos intracelulares podem ser formados a partir de açúcares ( incluindo

glucose, maltose e sacarose) e são metabolizados quando outras fontes de carboidratos estão ausentes, como entre as refeições.

GEDDES et al., 1978, observaram que mudanças visuais semelhantes a cáries iniciais ocorreram quando 10 voluntários não escovaram seus dentes por 14 dias e bochecharam uma solução de sacarose 9 x dia, enquanto que o grupo controle que não bochechou com sacarose mostrou uma mudança no esmalte significativamente menor. Amostras de placa foram coletadas 12 horas após o último bochecho e duas horas após as refeições. A concentração de cálcio e fósforo e peso úmido da placa acumulada durante o período sem higiene oral pelos 2 grupos não mostrou diferenças significantes, embora a concentração de carboidratos no grupo sacarose tenha sido significativamente maior.

Com o objetivo de avaliar a cinética do fosfato inorgânico ( $P_i$ ), Na e K no fluido da placa TATEVOSSIAN & GOULD, 1979, desenvolveram um experimento no qual a placa dental formada em 24 horas foi estudada após bochecho com água, sacarose a 20%, e fosfato 0,12 e 0,5 M. A placa dental foi coletada nos tempos 0, 5, 10 e 15 minutos após cada bochecho. Seus resultados mostraram que o efeito local do aumento de fósforo inorgânico não contribuiu significativamente para a inibição da produção de ácido e que, quando o fósforo inorgânico foi introduzido na placa separadamente e após o bochecho com sacarose houve um aumento na sua concentração no fluido da placa, o que poderia exercer um efeito local de curta duração, por ação de massa, sobre a dissolução e remineralização do esmalte.

WYCOFF et al., 1980, realizaram um estudo no qual crianças bochecharam duas vezes ao dia com uma solução concentrada de glicerolfosfato de cálcio ou uma solução placebo. A placa foi coletada a cada duas semanas durante oito semanas, sendo determinado anteriormente o índice de Silness e Løe, 1964. Os resultados indicaram um menor índice de placa e uma maior concentração de fósforo para o grupo experimental em relação ao grupo controle nas 4 semanas de exame

HOOVER et al., em 1980, compararam a composição química e microbiológica da placa dental de indivíduos com intolerância hereditária à frutose com restrita ingestão de açúcar na dieta com indivíduos com dieta normal. Os dois grupos não mostraram diferenças significantes na composição química da placa: a concentração média de proteínas, carboidrato, cálcio, magnésio e fósforo foram similares. A placa dental de ambos os grupos continham similar número de unidades formadoras de colônias por micrograma de proteína na placa, e *Streptococcus sanguis*, foi isolado com igual freqüência das amostras de placa dos dois grupos. Entretanto, *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus* potencialmente cariogênicos foram isolados 3 a 4 x mais freqüentemente nas placas dos indivíduos controle do que nos indivíduos com intolerância hereditária à frutose. Os autores concluem que a dieta (sacarose em particular) influencia a colonização e multiplicação de organismos cariogênicos na placa dental.

TATEVOSSIAN & NEWBRUN, em 1981, investigaram a presença e quantidade de algumas proteínas aniônicas no fluido da placa dental humana por eletroforese não dissociante em gel de poliacrilamida e imunoeletroforese quantitativa. Ambos os métodos mostraram albumina como principal proteína componente. Entre as 8-17 bandas de proteínas detectadas pela eletroforese em gel, albumina, amilase, IgG, lactoferrina e IgA estavam uniformemente presentes. Os estudos imunoeletroforéticos quantitativos detectaram IgA em uma concentração similar àquela encontrada na saliva submandibular não estimulada; IgG, albumina e lactoferrina estavam presentes em altas concentrações. IgA foi detectada em maior concentração pelo antisoro com especificidade para o componente secretor em relação ao antisoro com especificidade somente para cadeia pesada. A proporção média de alguns constituintes do fluido da placa foram: IgA:albumina ( 1:25); IgG:IgA ( 3,8:1); IgG:albumina ( 1:7); lactoferrina:IgA (3,6:1); lactoferrina:albumina ( 1:7 ). As concentrações de proteína do fluido da placa sugerem que o fluido crevicular tem importante influência na sua composição.

BREX et al., 1981, afirmaram que estudos dos efeitos da composição da dieta sobre a formação da placa humana dental têm principalmente sido relacionados a carboidratos. Grande variação individual tem sido observada na formação e volume da placa como consequência de diferentes regimes com carboidratos. Este autor cita FOLKE et al. (1972) que encontraram que a quantidade de sacarose na dieta não influencia a quantidade de placa formada durante um período de 4 dias. Cita ainda que CARLSSON & EGELBERG, 1965, demonstraram que indivíduos, recebendo uma dieta básica livre de carboidratos ou suplementada com glucose e frutose a cada 10 minutos diariamente por 4 dias, desenvolveram uma quantidade similar de placa. Quando a mesma dieta básica foi suplementada com sacarose a cada 30 minutos, houve um aumento no volume da placa. Afirmam ainda que, em estudos recentes com culturas, foi observado que bochechos frequentes com soluções concentradas de glucose ou sacarose aumentaram o número de bactérias desenvolvidas sobre filmes plásticos aplicados às superfícies dentais durante períodos de alta concentração de carboidratos na cavidade oral. Polissacarídeos extracelulares sintetizados pelos microrganismos da placa a partir da sacarose podem ser importantes em 2 aspectos, a saber: como reserva de energia e como constituintes da matriz da placa. Esses polissacarídeos extracelulares compreendem dextranos, mutanos e levanos, os quais são sintetizados pelas bactérias a partir da sacarose. Polissacarídeos intracelulares são produzidos como grânulos de reserva por muitas espécies bacterianas a partir de vários carboidratos, tais como: glucose, frutose e sacarose. Assim, estes autores, com o objetivo de estimar a influência de carboidratos na formação da placa inicial, avaliaram a morfologia da placa inicial, em microscopia eletrônica, quando desenvolvida em condições de suplementação experimental de carboidratos. Este estudo foi realizado em cinco estudantes. Uma solução plástica foi aplicada na superfície bucal de todos os pré-molares e caninos que solidificaram formando filmes transparentes. Essa investigação compreendeu 4 períodos experimentais de 4 horas, que foram separados por 1 semana de ótima higiene bucal. Durante os períodos experimentais os voluntários não comiam nem bebiam. O primeiro experimento foi conduzido sem bochechos. Durante os 03 outros experimentos utilizaram-se bochechos com 10 ml de água, glicose a 50% ou sacarose a 50% durante um minuto, nos tempos 30, 60, 90, 120, 150, 210 e 235 minutos. Ao final de cada período experimental os filmes foram cuidadosamente removidos e preparados para análise por microscopia eletrônica. Os resultados desta pesquisa

indicam que freqüentes bochechos com água, glucose ou sacarose não têm influência detectável sobre a morfologia ou quantidade de placa no estágio inicial de aderência bacteriana. Porém citam que pesquisas com relação aos possíveis efeitos dos carboidratos sobre os estágios avançados da formação da placa parecem fundamentadas.

EDGAR et al., em 1982, compararam a composição orgânica de amostras individuais do fluido da placa e saliva de macacos irradiados e não irradiados ( controle ) recebendo a mesma dieta cariogênica. Saliva e placa foram coletadas de quatro animais irradiados e quatro não irradiados, sob ação de tranquilizantes e em jejum. Proteína total, albumina, IgA, IgG, IgM, e o terceiro componente do complemento ( C'3 ) foram quantificados no fluido da placa e saliva total. Atividade de amilase salivar e peroxidase foram também determinadas. As amostras do fluido da placa e saliva foram ainda submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida. Não foram encontradas diferenças significantes nos grupos controle e irradiados quanto à concentração de proteína total. Entretanto, maiores níveis de albumina IgG e C'3 foram detectados na saliva, e de albumina e IgG no fluido da placa, de animais irradiados comparados com o grupo controle. Maior nível de IgA foi detectado no fluido da placa de animais irradiados em relação aos controles; o oposto foi encontrado na saliva. O aumento nos níveis de albumina na saliva e fluido da placa dos animais irradiados pode ser observado na eletroforese em gel de poliacrilamida. No perfil eletroforético do fluido da placa dos animais irradiados e controles não foram observadas diferenças. A atividade da amilase foi aumentada levemente na saliva e fluido da placa dos animais irradiados comparados ao grupo controle, mas as diferenças não foram significantes. Entretanto, a atividade da peroxidase da saliva e fluido da placa do grupo irradiado foi muito maior em relação ao grupo controle, e foi muito variável.

GAUGLER & BRUTON (1982) estudaram aspectos específicos da placa dental, com o objetivo de avaliar a relação existente entre a prevalência de cárie e a quantidade e natureza de flúor na placa, de pessoas com ou sem cárie. Foi

observado que a placa dos indivíduos livres de cárie continha uma concentração média de flúor total 40% maior do que aquela dos indivíduos com cárie.

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

SKINNER et al. (1982) realizaram um estudo cruzado duplamente cego envolvendo dietas ricas em sacarose e maltose, na qual amostras de 2 dias de placa de 24 indivíduos foram coletadas antes e durante 2 períodos de 25 dias. A placa coletada foi dispersada em 0,2 ml de tampão maleato 0,1M pH 6,0 estocada a  $-20^{\circ}$  C. As amostras foram secas em dissecador a  $4^{\circ}$  C usando pentóxido de fósforo. A placa seca foi transferida para um homogeneizador a  $4^{\circ}$  C contendo 1,0 mL de água deionizada. O homogenato foi transferido para tubos e diluído com água deionizada para uma concentração final de aproximadamente 1mg/mL. Esta suspensão (0,1 mL) foi aquecida a  $95^{\circ}$  C por 15 minutos com 0,2 mL de hidróxido de sódio 0,75M. Após esfriamento as amostras foram diluídas em 0,4 mL de água deionizada. Para análise de proteína (LOWRY et al., 1951) utilizou-se 0,2 mL do homogenato, enquanto que 0,5 mL deste último foi misturado com 0,1 mL de NaOH 3 M a  $10^{\circ}$  C por 30 minutos para extração dos polissacarídeos solúveis em álcali. O precipitado foi lavado para determinação de polissacarídeo insolúvel em álcali. Essas duas frações de placa foram analisadas pelo método de DUBOIS et al., 1956. Os resultados mostraram que a concentração de polissacarídeos extracelulares na placa foi menor no grupo maltose em relação ao grupo sacarose ( $p=0,052$ ). Em adição a concentração de proteínas encontrada na placa dental formada na presença de sacarose e maltose não foram estatisticamente diferentes.

McNEE et al. (1982) realizaram um estudo *in vitro* avaliando os efeitos dos polissacarídeos extracelulares sobre a difusão de NaF e  $^{14}\text{C}$  – sacarose na placa dental; seus resultados mostraram que a presença de polissacarídeo extracelular na placa influencia levemente o índice de difusão. Entretanto, o tempo total para difusão através da placa pode ser aumentado se a presença de polissacarídeo extracelular resulta em uma espessa camada de placa.

KLIMEK et al., em 1983, avaliaram a retenção e comportamento do flúor contido na placa e esmalte subjacente em “boca artificial”. Para isso, placa artificial foi cultivada sobre esmalte bovino e sobre lâmina de platina. Foi aplicado um bochecho com sacarose 0,1 M 3x/dia. Em intervalos de 6, 18 e 48 horas, após uma aplicação de solução de NaF ( 200 ppm F, 2x/dia, por dez minutos, durante três dias ), a placa e cinco camadas da superfície do esmalte foram analisadas para flúor. Após 6, 12 e 48 horas, a placa cultivada sobre o esmalte continha 226, 158, e 70 ppm, respectivamente. Os dados respectivos para a placa sobre a lâmina de platina foram 212, 90 e 36 ppm. No esmalte sob a placa a concentração de flúor diminuiu nas camadas externas com o tempo, mas não no esmalte sem tratamento. O autor concluiu que sob condições cariogênicas uma considerável quantidade de flúor na placa foi derivada do esmalte subjacente

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

para fósforo a diferença alcançou significância estatística ( $p < 0,05$ ). O presente estudo, entretanto, mostrou que níveis de cálcio e fósforo são significativamente maiores na placa coletada de crianças sem experiência de cárie do que em crianças suscetíveis à cáries.

Os efeitos do uso de sacarose e frutose na formação da placa dental foram comparados por DuBOIS et al., em 1984. Uma população voluntária de 118 estudantes, em um período de 24 horas, suplementaram suas dietas com 80 g de sacarose ou frutose dissolvidas em meia xícara de água. Os voluntários no início de cada fase experimental foram submetidos à escovação dental, sendo toda a placa removida. Após 24 horas do período sacarose ou frutose, avaliou-se o índice de higiene oral ( PHP ). Os resultados indicaram que os indivíduos com ingestão suplementar de sacarose demonstraram significante maior formação de placa do que o grupo que utilizou frutose.

DiPAOLA et al., em 1984a, desenvolveram um estudo no qual a contribuição de proteínas da saliva e fluido crevicular gengival ( FCG) para a placa dental foi determinada pela comparação de extratos da placa supragengival formada sobre dentes naturais e dentes artificiais ( próteses ). As amostras de placa de cada paciente foram coletadas em uma pequena cápsula pré-pesada e estocada a  $-10^{\circ}$  C de 1 a 4 dias até serem analisadas. A coleta individual variou entre 14- 50 mg de peso úmido. As amostras foram descongeladas e dispersadas na proporção 10 mg/ 0,05 ml em tampão fosfato-salina , pH 7, contendo 1 mM de EDTA para enfraquecer as interações eletrostáticas e extrair os componentes solúveis (IACONO et al, 1982). Após 1 hora as amostras foram centrifugadas por 30 minutos a 5000 rpm para obter-se o sobrenadante A. As amostras foram então extraídas da mesma forma com o tampão fosfato para obter-se o sobrenadante B. E para obtenção do sobrenadante C utilizou-se tampão glicina pH 2,3 o qual contém o material mais fortemente ligado (TAUBMAN, 1974). Os três sobrenadantes foram imediatamente congelados a  $-10^{\circ}$  C até serem examinados. A quantificação de lactoferrina, proteínas ricas em prolina, amilase, proteínas ricas em cisteína, albumina e lisozima foram realizadas por

eletroforese vertical. Ig A, IgG, IgM foram medidas por imunofluorescência. Os resultados obtidos mostraram que houve uma ausência total e virtual de albumina e IgG, respectivamente, nas amostras de placas das próteses, confirmando sua origem crevicular. A concentração de lactoferrina foi maior em relação à lisozima em todas as amostras supregengivais, porém o mesmo não ocorreu nas amostras de placas das próteses, sugerindo que o FCG forneceu mais lactoferrina do que lisozima à placa. Amilase estava presente em ambas as placas e em similar quantidade. Fosfoproteínas contendo cisteínas apresentaram-se em baixa concentração, porém presente em todas as amostras; proteínas ricas em prolina estavam virtualmente ausentes, refletindo a alta vulnerabilidade à proteólise dessas proteínas. As proteínas salivares, quando presentes, nos extratos da placa não correspondiam à sua relativa concentração na saliva.

Continuando seus estudos, DiPAOLA et al. (1984b ) compararam o nível de proteínas do hospedeiro em extratos de placa supragengival de 03 dias , entre adultos resistentes à cárie ( RC ) e susceptíveis à cárie ( SC ) com pouca ou nenhuma inflamação gengival, para minimizar a contribuição do fluido gengival crevicular gengival (FCG ). As amostras foram coletadas e congeladas a  $-10^{\circ}$  C até as análises, sendo então liofilizadas, pesadas e submetidas a sucessivas extrações com tampões, conforme descrito por DiPAOLA et al 1984a. Exceto para IgA, todas as proteínas do hospedeiro estavam presentes em níveis similares em ambos os grupos de voluntários. Apesar da fragmentação apresentada da IgA na eletroforese em gel gradiente de poliacrilamida- dodecilsulfato de sódio ( SDS-PAGE ) e na eletroforese de transferência em ambos grupos, a quantidade de ligação para um padrão anti-soro de IgA anti-secretora foi maior nos indivíduos RC em relação aos indivíduos SC. Isso poderia ser uma repercussão da tendência favorável para uma alta concentração de IgA na saliva de indivíduos RC. Observou-se ainda que mesmo na placa de três dias na ausência de inflamação gengival , o FCG contribui com uma significativa parte das proteínas do hospedeiro nos extratos de placa dental. As proteínas salivares na placa não mostraram semelhança à sua relativa concentração na saliva.

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

MAKINEN et al., 1985, compararam as características clínicas, bioquímicas e microbiológicas entre dois dentifrícios contendo diferentes misturas de açúcar-álcoois. Para as análises bioquímicas da placa dental, o autor utilizou a metodologia descrita a seguir. Inicialmente, o peso úmido da placa foi determinado, e então adicionou-se uma solução de NaCl a 0,9% na proporção de 0,1 mg de placa/0,1 ml. Cada suspensão foi aspirada e expelida 20 vezes com uma pipeta Pasteur. A mistura parcialmente homogeneizada foi então centrifugada por 10 minutos a 23.500 g, e uma alíquota do fluido sobrenadante (extrato da placa) foi estocada em nitrogênio líquido para o ensaio de amônia, ácido acético, e ácido láctico. O restante do extrato da placa foi estocado a  $-20^{\circ}$  C para as análises de proteína solúvel, carboidrato total, cálcio e fósforo inorgânico. O "pellet" da placa que resultou da centrifugação antecedente foi suspenso em água destilada fria (1 mg de peso úmido / 5 ml). A suspensão foi feita a 0,05 M com relação ao ácido láctico, agitada e centrifugada por 10 minutos a 23.500 g, assim como para extrair polissacarídeo do "pellet" o qual foi solúvel em ácido láctico 0,05M. O extrato em ácido láctico também foi analisado para proteína, cálcio e fósforo inorgânico. Como esse procedimento não dissolveu todo o polissacarídeo da placa, o "pellet" que resultou da última centrifugação mencionada foi ressuspenso em NaOH 1 M (1 mg peso fresco por 0,05 ml) utilizando-se um desintegrador ultra sônico por 2 minutos, seguido por tratamento a  $100^{\circ}$  C por 60 minutos. O material tratado com NaOH foi submetido à análises de proteínas, carboidratos total e fosfato inorgânico.

CARLSSON, em 1986, em seus relatos sobre o metabolismo do açúcar e cárie, cita que os microrganismos também necessitam de energia mesmo quando não estão crescendo. Há necessidade de energia, por exemplo, para a regulação osmótica, a manutenção do pH intracelular e para a renovação de proteínas e ácidos nucléicos. Na ausência de fontes exógenas de energia, essas necessidades devem ser satisfeitas a partir de fontes endógenas. Muitas bactérias presentes na microbiota dos dentes têm uma reserva de energia potencial sob a forma de polissacarídeos intracelulares (glicogênio). Esses polissacarídeos são usualmente formados quando os açúcares estão presentes em excesso e alguns nutrientes limitam o crescimento dos organismos. Sob tais condições, o reservatório intracelular de frutose – 1,6 P e de outros intermediários glicolíticos aumenta e tem início a síntese de polissacarídeos através da ativação da ADP – glucose fosforilase. Esses polissacarídeos intracelulares são formados a partir de qualquer tipo de açúcar que possa ser convertido em glicose 1-P. Uma grande atenção tem-se concentrado no possível papel dos polissacarídeos intracelulares na patogenicidade dos microrganismos cariogênicos, pois durante os períodos do dia nos quais nenhum açúcar é suplementado pela dieta para a microbiota dos dentes, eles podem ser usados como fontes de energia e os ácidos são excretados. Cita ainda, que a maioria das bactérias no seu ambiente natural estão cercadas por matrizes altamente hidratadas chamadas de glicocálices, que quase sempre são constituídas de heteropolissacarídeos. Os precursores desses polímeros são formados no citoplasma, transportados através da membrana celular por carregadores lipídicos e polimerizados do lado de fora da membrana. Todos esses polímeros podem ser sintetizados sempre que existam quantidades adequadas de energia, assim como fontes disponíveis de carbono e nitrogênio. Algumas bactérias orais também têm a habilidade de produzir polissacarídeos a partir da sacarose. As glicosiltransferases, que são enzimas extracelulares, clivam a sacarose, liberam a frutose e obtém energia para a conversão extracelular da glicose em glucanos altamente ramificados. Em alguns desses glucanos, as moléculas de glicose apresentam uma ligação predominante do tipo  $\alpha$  (1  $\rightarrow$ 3), e são geralmente altamente insolúveis, rígidos e podem formar agregados fibrosos, chamados atualmente de mutanos. Outros glucanos apresentam predominantemente ligações tipo  $\alpha$  (1  $\rightarrow$ 6), formam cadeias flexíveis e quase sempre são solúveis, sendo chamados de dextranos. Algumas bactérias podem

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

SIMONSSON et al., em 1987, avaliaram as características clínicas e bioquímicas da placa dental de 02 grupos de indivíduos com diferentes índices, denominados "alta" e "baixa" capacidade de formação de placa. A média de índice de placa após três dias de acúmulo de placa, na superfície vestibular de pré-molares e primeiros molares, foi 2,6 para o grupo "alta" e 0,6 para o grupo "baixa". As seguintes variáveis foram determinadas: condição periodontal, CPO-S, hábitos dietéticos, índice de fluxo salivar e capacidade tampão, contagem de *S. mutans* e *Lactobacillus* na saliva, concentração de IgA, lactoferrina, lactoperoxidase, e lisozima, agregação de estreptococos orais induzida pela saliva, eletroforese da saliva, composição de aminoácidos da saliva e película adquirida e profundidade de retenção na área dentogengival. Comparando os dois grupos, houve uma tendência para uma maior pronunciada profundidade de retenção da placa "alta" em relação à "baixa", mas a diferença foi somente estatisticamente significativa para pré-molares. A eletroforese em gel de poliacrilamida (gradiente de concentração 5 a 10%) contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) da saliva mostrou que o perfil proteico dos grupos foi muito semelhante. A densitometria mostrou, entretanto, que os formadores de placa "alta" tinham 30% menos proteínas de alto peso molecular, quando comparados ao grupo "baixa", mas as diferenças não foram estatisticamente significantes.

WILSON & ASHLEY, em 1988, avaliaram os efeitos da variação na ingestão de açúcar da dieta e higiene oral na composição bioquímica e pH de placas de superfície lisa e proximais. Dez estudantes participaram deste estudo. Cada voluntário dedicou um período de 48 horas para um regime controlado de dieta e higiene bucal durante quatro sucessivas semanas. Semanalmente realizou-se uma profilaxia profissional como padronização. Cada indivíduo consumiu uma dieta mínima básica de açúcar nas quarenta e oito horas seguintes. A dieta foi estabelecida em uma discussão preliminar com cada voluntário, e somente incluídas bebidas e alimentos que continham menos que 2% de açúcar. As refeições principais foram

fornecidas e consumidas na instituição, e a dieta permaneceu a mesma para cada indivíduo em todo o estudo. Não se utilizou fio dental durante o período experimental. Os primeiros três períodos foram separados em regimes de dieta e higiene bucal, como descrição a seguir :

- A- Regime de alta ingestão de açúcar / não escovação dental – Durante este período os voluntários deixaram de escovar seus dentes, e a dieta básica foi suplementada com doces contendo 63% de sacarose. Seis doces foram consumidos entre as principais refeições durante cada 48 horas, em intervalos de pelo menos 1 hora.
- B- Regime de alta ingestão de açúcar / escovação dental – A mesma dieta básica com doces foi consumida durante este período, mas os voluntários realizaram escovação dental normal antes do café da manhã e antes de deitar.
- C- Regime de baixa ingestão de açúcar / não escovação dental – Durante este período a dieta básica foi consumida sem os doces , e os indivíduos não escovaram os dentes. Para reduzir o efeito sobre a bioquímica da placa que pode originar-se a partir de menor estimulação salivar, os voluntários sugaram replicas de doces de acrílico.

O quarto período de 48 horas foi reservado para medições de pH , durante o qual os voluntários consumiram uma dieta suplementada com doce e suspenderam a escovação dental como descrito no regime A.

A coleta de placa foi realizada a cada semana no período vespertino, duas horas após a última ingestão de açúcar. As amostras de placa foram analisadas para cálcio, fósforo, magnésio, carboidrato e concentração de proteínas, e peso seco. A análise de carboidratos incluiu estimação de carboidrato solúvel em água, solúvel em alcali e insolúvel em alcali. A média (DP) do peso seco (mg) e das concentrações dos constituintes bioquímicos ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  de peso seco) da placa de superfícies lisas (PSL) e proximais (PSP) após 48 horas nos três regimes ( A,B e C ), respectivamente, serão descritos a seguir : Peso seco (mg) : A : 6,58 (4,82) , 4,73 (1,22) ; B : 3,25 (2,55) , 4,02 (1,10) ; C: 4,27 (3,56) , 3,89 (0,84) ; Cálcio : A : 4,87 (2,72) , 2,72 (0,66) , B : 4,49 (2,36) , 3,06 (0,94) , C : 12,44 (5,49) , 6,15 (2,86) ; Fósforo inorgânico : A : 4,94 (1,95) , 2,59 (0,60) , B : 4,45 (1,53) , 2,81 (0,77) , C : 8,69 (3,48) , 4,40 (1,89) ; Fósforo orgânico : A : 12,39 ( 1,65) , 7,99 (1,08) , B : 12,51 (1,35) , 6,89 (1,47) , C :

12,07 (1,71), 6,87 (1,00); Carboidrato solúvel em água : A : 64,4 (20,9), 48,2 (12,4), B : 74,2 (29,9), 49,2 (13,2), C : 33,1 (13,0), 35,0 (18,0); Carboidrato solúvel em álcali : A : 39,2 (4,5), 26,4 (5,2), B : 33,0 (6,3), 23,4 (4,8), C : 29,1 (8,6), 23,6 (2,7); Carboidrato insolúvel em álcali : A : 85,9 (14,7), 54,4 (12,0), B : 89,8 (16,4), 48,8 (8,0), C : 65,4 (18,9), 45,3 (8,2); Carboidrato total : A : 188,9 (35,7), 129,0 (26,3), B : 197,0 (43,7), 120,6 (41,7), C : 127,6 (37,8), 103,9 (18,3); Proteínas : A : 480,3 (39,1), 438,3 (44,6), B : 494,2 (46,3), 433,1 (53,6), C : 541,7 (55,0), 434,2 (45,5).

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

MARGOLIS et al., 1988a, analisaram a composição do fluido da placa (em pool) de indivíduos agrupados de acordo com a idade (8 a 11, 14, 17, 18 a 25 anos) e índice de cáries (livres de cárie, CF, CPOS=0; suscetíveis a cáries, CS, CPOS > 10). Os voluntários receberam uma profilaxia dental uma semana antes da coleta de placa, abstiveram-se de higiene oral por 48 horas, e não comeram ou beberam pelo menos uma hora anterior à coleta de placa. As amostras de placas de cada grupo foram colocadas sob óleo mineral e centrifugadas (15.000 g) por 45 minutos em temperatura ambiente. Os sobrenadantes foram analisados para ácidos orgânicos, ânions inorgânicos, cátions mono- e divalentes, e valores de pH. Os íons  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Cl}^-$ , e fosfato estavam presentes em todas as amostras. Os ácidos acético e propiônico foram predominantes, compreendendo acima de 75% dos ácidos presentes, enquanto os ácidos succínico, láctico, fórmico e butírico estavam presentes em menor concentração. Dentro de cada grupo de idade, o valor médio para pH, concentração de  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Mg}^{++}$  e ácido butírico foi significativamente maior para o grupo CF. Avaliações indicam que o fluido da placa é supersaturado em relação ao esmalte e ao fosfato dicálcio diidratado ( $\text{Ca.HPO}_4.2\text{H}_2\text{O}$ ), com um significativamente maior grau de saturação em relação ao esmalte no grupo CF. Esses resultados sugerem que o fluido da placa de indivíduos CF tem um maior potencial de remineralização em relação ao indivíduos CS.

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

NEWBRUN, em 1989, descreve que as conclusões prévias concernentes ao desempenho da sacarose na etiologia da cárie são baseadas em razões epidemiológicas, bem como em estudos controlados em humanos e animais. Outros estudos em animais não compararam os itens dietéticos humanos comuns, e sim

compararam a cariogenicidades de diferentes carboidratos – amido, sacarose, maltose, lactose, frutose e glicose – geralmente adicionados à dieta em forma de pó. Sob tais condições, a sacarose, mais do que qualquer outro carboidrato, invariavelmente induz mais a lesão do tipo de superfície lisa. O papel chave da sacarose como substrato dietético no processo de cárie de superfície lisa pode ser explicado no campo da bioquímica. Cárie de superfície lisa depende da aderência da placa dental. Várias investigações independentes demonstraram claramente a presença de polissacarídeos extracelulares, tanto os glucanos quanto os levanos na placa. Os glucanos, particularmente a fração insolúvel em água, podem servir como componentes estruturais da matriz da placa, com efeito “adesivo” de certas bactérias ao dente e entre si. Os levanos solúveis e alguns dos glucanos solúveis são degradáveis pela microbiota da placa e podem funcionar como reservas transitórias de carboidratos fermentáveis, prolongando, dessa forma, a duração da produção de ácidos. Esses polissacarídeos são sintetizados por enzimas, as quais na maior parte são extracelulares ou ligadas à superfície da célula e mostram uma alta especificidade para a sacarose como um substrato. As enzimas envolvidas nessa síntese, glicosil e frutosil transferases, foram isoladas e purificadas de *S. sanguis* e *S. mutans*.

NOBRE dos SANTOS & CURY, em 1989, realizaram um estudo sobre a composição inorgânica da placa dental de escolares durante a fluoretação, paralisação e refluoretação da água de abastecimento público e obtiveram os seguintes resultados: F<sup>-</sup> (ng/mg) 21,7, 1,7 e 17,3; Ca<sup>++</sup> (µg/mg) 7,8, 5,5, 4,2; P (µg/mg) 9,2, 9,2, 6,0 respectivamente, em termos de peso seco. As substâncias analisadas foram extraídas com HClO<sub>4</sub> 0,5M.

WILSON & ASHLEY, em 1990, investigaram a relação entre a composição bioquímica da placa dental de superfícies lisas e proximais e subsequente incremento de cárie em três anos, em adolescentes. A placa foi coletada no exame inicial, e exames clínicos foram realizados em intervalos anuais. As amostras de placas foram analisadas para cálcio, fósforo orgânico e inorgânico, carboidrato e proteína total. As seguintes frações de carboidratos foram isoladas : fração solúvel em

água., solúvel em álcali e insolúvel em álcali. O incremento de cárie de três anos foi expresso como o número de novas superfícies cariadas ou restauradas. As concentrações de todos os constituintes foi menor na placa proximal, com exceção de proteína total. Houve uma correlação positiva entre o peso úmido da placa dental e cárie, porém não foi estatisticamente significativa. A concentração de cálcio na placa de superfície lisa apresentou uma relação inversa, estatisticamente significativa, com o incremento de cárie ( $p < 0,01$ ). Houve evidência para uma direta relação entre incremento de cárie e concentração de fósforo orgânico e inorgânico na placa somente de superfície lisa ( $p < 0,05$ ). Em contraste, uma relação direta entre incremento de cárie total e concentração de carboidrato intracelular alcançou significância estatística somente para placa proximal ( $p < 0,05$ ). A análise de regressão indicou que a combinação da concentração de cálcio e fósforo inorgânico da placa de superfície lisa e concentração de carboidrato intracelular explicou 40% no subsequente incremento de cárie.

TATEVOSSIAN ( 1990a ), em um estudo de revisão, descreveu que a concentração de flúor total na placa varia entre 5 a 10 ppm (peso úmido). A variabilidade de dados na literatura sobre flúor na placa é em parte atribuída à problemas analíticos relacionados ao limite de detecção do eletrodo de flúor. Uma mudança na classificação do flúor da placa é necessária, uma vez que recentes trabalhos indicam que existem 2 pools de flúor na placa: < 5% do flúor total está no fluido da placa como íon livre, e a grande porção restante do flúor total é designado com flúor ligado (>95%) que pode ser extraído por ácido perclórico 0,5 mol/L. Fontes de flúor na placa incluem a dieta, saliva e fluido gengival; o esmalte é improvável ser fonte regular para flúor na placa, a menos que seja revestido diariamente com compostos de flúor lábil, como fluoreto de cálcio, ou liberado pela desmineralização. A localização e natureza do flúor não iônico não está estabelecida, mas a presente evidência é consistente com uma localização intracelular. Flúor iônico pode ser liberado por ácidos produzidos na placa durante a fermentação do açúcar, mas isto provavelmente não alcança uma concentração iônica alta bastante por um período de tempo suficiente para exercer uma significativa inibição da acidogênese da placa. Evidências epidemiológicas, mostrando correlações entre concentrações de F na placa

e prevalência de cáries, não excluem a possibilidade de efeitos coincidentes do F na água.

MARSH & BRADSHAW, em 1990, realizaram um estudo *in vitro* com o objetivo de avaliar o efeito do flúor sobre a estabilidade da comunidade bacteriana oral, e seus resultados mostraram que o flúor pode interferir na ecologia da microbiota da placa e assim ter uma contribuição significativa na prevenção da cárie dental.

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

MARGOLIS, 1990, durante o simpósio sobre “Fluído da placa e propriedades da interface placa/esmalte”, apresentou as seguintes considerações: as mudanças químicas efetuadas pela fermentação dos carboidratos da dieta por

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

Ao avaliarem o teor de proteínas salivares de 216 indivíduos na faixa etária de 18 a 23 anos em dois anos consecutivos, RUDNEY et al., em 1991 observaram ampla variabilidade. A concentração média ( média  $\pm$  DP ) de proteína total, assim como o valor mínimo e máximo obtido, no primeiro e segundo ano do estudo foi  $2,60 \pm 1,19$  ( 0,71-8,78 ) e  $2,49 \pm 0,81$  ( 1,16-5,88 ), respectivamente.

MARGOLIS & MORENO, em 1992, com o objetivo de estudar a composição do fluido da placa de indivíduos livres de cáries e cáries-positivos após exposição à sacarose, realizaram a seguinte pesquisa. A composição de um “pool” de fluido da placa a partir de amostras de 5 populações foi determinada antes e em tempos selecionados (7, 15, 30 e 60 minutos) após bochecho com sacarose a 10%. Os voluntários foram agrupados de acordo com seu índice de cárie (livres de cáries=CF, CPOS=0; cáries positivos=CP, CPOS >10). Também foram estudadas amostras obtidas de superfícies com manchas brancas e de superfícies íntegras da mesma boca de dois grupos adicionais ao grupo CP. O fluido da placa foi isolado por centrifugação e analisados para ácidos orgânicos, íons inorgânicos (cromatografia iônica), e pH (microeletrodos). Antes da exposição à sacarose, o fluido da placa do subgrupo CF e de superfícies íntegras dos voluntários CP apresentaram maior valor de pH do que as amostras do subgrupo CP e de superfícies com manchas brancas, respectivamente; por outro lado, a composição iônica foi similar. Fluidos de placa em jejum foram também constatados serem supersaturados em relação ao esmalte e ter um grau significativamente maior nas amostras CF, sugerindo que o fluido na placa CF tem

um maior potencial de remineralização do que as amostras CP. Após exposição à sacarose, uma rápida diminuição do pH do fluido da placa foi observada, que correspondeu primariamente à produção de ácido láctico. Para todos os tempos examinados, as médias de pH e grau de saturação do esmalte [DS(En)] foram baixas e a concentração de ácido láctico foi maior nas amostras CP do que nas amostras CF; diferenças observadas foram estatisticamente significantes aos 7 minutos para pH e [DS(En)], e aos 7, 15 e 30 minutos para ácido láctico. Valores baixos de DS(En) sugerem que o fluido da placa de indivíduos CP tem um mensurável maior potencial cariogênico. A concentração de cálcio também aumentou no fluido da placa, após exposição à sacarose e a níveis similares nas amostras de indivíduos CF e CP, apesar da significativamente menor produção de ácido nas amostras CF. Estes últimos resultados parecem estar associados com achados adicionais de que a placa total do subgrupo CF contém significativamente mais cálcio do que as amostras dos indivíduos CP. A disponibilidade de íons minerais, como cálcio na placa, pode, portanto, ter um importante papel no controle da desmineralização do esmalte.

MARGOLIS et al., 1993, realizaram um estudo no qual "pool" de amostras de placa foram obtidas de : (1) superfície coronária de 2 grupos de indivíduos livres de cárie (CF); (2) superfície coronária com mancha branca de um grupo de indivíduos cárie-positivos (CP) e (3) superfícies de raiz exposta livre de cárie (RCF) e raízes de indivíduos cárie-positivos (RCP). As amostras da placa foram obtidas antes e 3 minutos após um bochecho de 1 minuto com solução de sacarose a 0,5, 1, 2, 5 e 10%. O fluido da placa foi então isolado de cada amostra de placa por centrifugação e analisada para íons inorgânicos, ácidos orgânicos, e valores de pH. Com aumento da concentração de sacarose observou-se: (1) o pH e grau de saturação (DS) do fluido da placa em relação aos minerais do dente diminuíram; (2) os valores de pH e DS das amostras CP e RCP foram consistentemente menores do que nas amostras CF e RCF, respectivamente; (3) a concentração de ácido láctico no fluido da placa aumentou e foi consistentemente maior nas amostras CP e RCP do que nas amostras CF e RCF, respectivamente. A composição química do fluido da placa, após exposição à sacarose, mostrou correlação com a história da cárie. Esses autores citam DIBDIN & SHELLIS, 1989 e VAN HOUTE et al., 1989, que sugerem que o

potencial acidogênico da placa *in vivo* pode também ser influenciado pelos polímeros que constituem parte da matriz da placa. Citam como exemplo, evidências que sugerem que polímeros tais como o glucano, produzido pelos estreptococos do grupo mutans a partir da sacarose, podem aumentar a porosidade da placa pelo aumento da distância interbacteriana e efetuar um aumento da difusão do substrato (sacarose) na placa.

Em um manuscrito sobre arginina desiminase e geração de álcali na placa MARQUIS et al., 1994, descrevem o que se segue. As curvas de Stephan mostram rápida diminuição no valor do pH da placa após desafio com açúcar e sua elevação mais gradual após a queda de produção de ácido pela via glicolítica. A elevação pode ser atribuída a vários processos. A difusão de produtos ácidos da placa e na saliva, mesmo que seja restringida por camadas estagnantes, é claramente importante e pode envolver ácidos protonados, ácidos não protonados e prótons. A influência do tamponamento da placa e, em menor escala, da saliva, serve para moderar as diminuições do pH glicolítico, mas também reduz os aumentos subsequentes do pH. As bactérias são os agentes tamponantes predominantes na placa e as curvas de titulação ácido-base para a placa são muito similares às das células bacterianas. O fluido da placa também contém substâncias tamponantes (MARGOLIS, 1990), mas sua capacidade de tamponamento é muito menor por unidade de volume que a da massa bacteriana. Outro fator importante na elevação do pH da placa é o metabolismo gerador de base da microbiota. Esse metabolismo é considerado por muitos, como a maior importância na cariogenicidade da placa. A principal base na placa é amônia, mas pode conter também compostos aminobásicos, como ornitina e poliaminas. As fontes identificadas para a amônia incluem a ureólise, as reações de fermentação, e o sistema arginina desiminase.

Em 1994, CAREY et al. avaliaram a concentração de cálcio no fluido da placa dental após desafio cariogênico. Para isso, sete voluntários acumularam placa antes da coleta. Amostras de placa supragengival foram coletadas antes e cinco

minutos após um bochecho de sacarose 10%. Os resultados obtidos mostraram que a concentração de cálcio total e fosfato não alterou significativamente.

SCHWARTZ et al., em 1995, efetuaram um estudo para caracterizar o perfil eletroforético da saliva total estimulada e não estimulada, em humanos. Participaram do estudo 20 indivíduos saudáveis, não utilizando medicamentos. A saliva total não estimulada foi coletada pela manhã após 1 noite ou 2 horas de jejum. A saliva estimulada foi coletada mastigando-se parafina. As amostras, não centrifugadas, foram submetidas a análises de eletroforese dissociante em gel de poliacrilamida. Na saliva total foram observados perfis característicos e similares em todas as amostras, consistindo de mais de 34 bandas coradas em azul e rosa-violeta. Diferenças individuais foram usualmente observadas na intensidade ( ou densidade ) das bandas, mas não em número. Amostras repetidas da saliva total estimulada em um período de semanas, do mesmo indivíduo, revelaram notável consistência de perfil proteico, indicando estabilidade fisiológica da saliva total.

De acordo com PERINPANAYAGAM, et al (1995), os componentes de baixo peso molecular na saliva humana permanecem parcialmente caracterizados. Portanto, peptídeos de baixo peso molecular ( $M_r < 3000$ ) têm sido purificados a partir da saliva parotídeana e caracterizados em relação à sua sequência de aminoácidos. Pelas sequências obtidas, é provável que esses peptídeos sejam derivados da proteólise das proteínas salivares, como as ricas em prolina e estaterina que interagem com a hidroxiapatita. Considerando que a saliva parotídeana humana é um fluido amicrobiano, a maior parte da fração de peptídeos de baixo peso molecular desta secreção parece ser derivada do processamento proteolítico de proteínas maiores. Devido ao seu pequeno tamanho, estes peptídeos provavelmente estão em troca com o fluido da placa dental e podem, portanto, ajudar a modular os fenômenos de desmineralização/remineralização, adesão microbiana e metabolismo da placa dental na interface dente-saliva.

### 3.1.2- FORMAÇÃO DA PLACA DENTAL

HUIS in't VELD em 1979, relata que a formação da placa dental é um processo extremamente complexo e dinâmico envolvendo muitos fatores interrelacionados, nos quais três principais estágios podem ser reconhecidos : 1- adsorção específica de proteína salivares sobre a superfície dental; 2- adesão inicial da bactéria e 3- proliferação e acumulação da bactéria. Durante a formação da placa, reações altamente específicas ocorrem entre glicoproteínas salivares, superfícies dentais, produtos bacterianos e bactérias, resultando em uma progressão regular na composição bacteriana da placa. A síntese de glucanos extracelulares pelos *Streptococcus mutans*, a partir da sacarose, parece ser um dos principais parâmetros que promovem o desenvolvimento da placa. Além disso, interações específicas, entre bactérias ou entre bactéria e saliva, irão determinar a composição e patogenicidade da placa dental

Segundo van HOUTE ( 1979 ), em seus relatos sobre adesão bacteriana na cavidade bucal, evidências indicam que : 1) a adesão da bactéria à superfície oral é um pré-requisito para sua colonização na cavidade bucal, 2) a localização intra-oral de diferentes bactérias é determinada por suas diferentes afinidades aos vários tipos de superfícies orais, 3) a adesão bacteriana, pela influência de adesão e acumulação celular, é um importante fator de virulência, 4) interações adesivas envolvidas na formação da placa dental podem ser mediadas por polímeros extracelulares bacterianos, glicoproteínas salivares, ou ligação direta entre as células, 5) constituintes da saliva, tais como glicoproteínas de alto peso molecular, podem ter um importante papel no "clearance" bacteriano da cavidade bucal pela inibição da adesão bacteriana às superfícies orais, e 6) as interações adesivas entre tecidos orais e bactérias são altamente específicas e podem ser de natureza tipo-lectina.

De acordo com EDGAR, em 1979, o cálcio pode estar envolvido na formação e estabilização da placa pela precipitação de proteínas salivares precedendo a sua incorporação na matriz da placa, pela promoção de coesão da placa e pela adsorção de proteínas salivares ao esmalte. O efeito do cálcio na coesão da placa foi estudado pela

observação do índice de sedimentação, sob gravidade de suspensões de placa em tampão. Adição de cálcio, na suspensão de placa, favoreceu a sedimentação, presumivelmente pela formação de partículas de maiores dimensões enquanto o tamanho da partícula foi reduzido na presença de EDTA. Estes resultados suportam a hipótese de que cátions divalentes, particularmente cálcio, têm uma parcela na manutenção da estrutura da placa por favorecer a coesão entre elementos estruturais adjacentes. Os mecanismos físico-químicos envolvidos neste efeito podem incluir a neutralização de cargas negativas sobre a superfície das partículas adjacentes (macromoléculas aniônicas salivares ou bacterianas), reduzindo assim as forças eletrostáticas repulsivas entre partículas e favorecendo a floculação, a formação de pontes iônicas divalentes entre as macromoléculas carregadas negativamente ou efeitos de solvatação.

CIARDI et al., em 1977, conduziram um experimento para determinar o grau de adsorção do ácido lipotécóico à hidroxiapatita e investigar a influência da saliva, íons flúor e fosfato sobre este fenômeno. Os resultados mostraram que o ácido lipotécóico extraído de células de linhagens de *S. mutans* BHT exibiram uma alta afinidade pela hidroxiapatita. Os íons fosfato e flúor e em menor extensão a saliva, inibiram ou reverteram essa adsorção. Preparações de ácido lipotécóico extracelular obtidas a partir de sobrenadantes de culturas da mesma bactéria exibiram propriedade similar. Isto sugere que o ácido lipotécóico pode ter um papel significativo na colonização do dente por bactérias gram-positivas e, portanto, contribui para a formação e patogenicidade da placa dental.

RÖLLA et al., em 1980, considerando que o ácido lipotécóico ( LTA ) poderia ter importância no aumento da adesividade observada em *Streptococcus mutans* crescidos em meio contendo sacarose, realizaram um estudo para investigar se a placa dental induzida por sacarose *in vivo* contém mais LTA do que a placa formada na presença de xilitol ou glicose nos mesmos indivíduos. Três estudantes participaram do presente estudo, os quais foram selecionados por terem formado placa abundantemente quando bochecharam sacarose 8x/dia durante 4 dias. Ao início de cada série experimental, os dentes dos participantes foram limpos e polidos. Os indivíduos bochecharam durante três diferentes períodos com 10 mL de uma solução de açúcar 15% (p/v ) a cada hora de 8:00 às 22:00 horas. Os açúcares incluídos no

teste foram : sacarose, glicose, e xilitol. Após quatro dias de bochecho, a placa dental formada sobre os dentes foi coletada. O material da placa foi transferido para tubos de vidro contendo um pequeno volume de água destilada, que foi aumentado posteriormente para 10 mL e as suspensões preparadas. Paralelamente a este estudo, três macacos foram mantidos sob condições previamente descritas , mas beberam água contendo sacrose 15% ou xilitol 15% por dois diferentes períodos de 1 semana. Os dentes dos macacos foram limpos no início de cada experimento e a placa coletada como descrito acima. Os macacos tinham sido infectados com *S. mutans* há aproximadamente três anos. Para análise de proteínas, foi adicionada à amostra de placa NaOH para uma concentração final de 1M e a amostra foi levada ao banho-maria fervente por 1 hora. A análise de proteínas foi realizada pelo método de LOWRY et al. ( 1951 ) usando soro albumina bovina como padrão. A concentração de carboidrato total foi determinada pelo método de DUBOIS et al. (1956 ). Para extração de LTA da placa por fenol ( WICKEN et al., 1973 ), alíquotas da suspensão de placa foram misturadas com volume igual de fenol 90% e incubadas por 30 minutos a 70° C em banho-maria. A mistura foi esfriada em um banho de gelo por 5 minutos, centrifugada a 1.500 g por 20 minutos a 4° C, e a fase aquosa com o ácido teicóico extraído foi pipetada e dialisada contra água destilada a 4° C por 6 horas e finalmente contra salina por 24 horas. Foi ainda realizada uma análise de LTA por titulação por hemaglutinação. Os experimentos mostraram que bochechos com diferentes açúcares produziram comparáveis quantidades de placa em todos indivíduos. A quantidade de carboidrato no grupo sacarose mostrou um valor relativo mais alto, e a proporção de LTA medida por hemaglutinação foi também significativamente maior nos extratos da placa com sacarose. O grupo xilitol apresentou maior concentração de proteínas. As análises das amostras de placa dos três macacos também mostrou uma alta proporção de LTA em relação ao grupo xilitol. Os resultados dos experimentos mostraram que a placa formada na presença de sacarose *in vivo*, em três selecionados formadores de placa volumosa, contém significativamente mais LTA extraível em relação à placa formada na ausência de sacarose. Similar observação feita em macacos sustenta a argumentação de que a placa formada na presença de sacarose contém substancialmente maior quantidade de polímeros tipo LTA. A placa formada na presença de sacrose apresentou alta concentração de carboidratos, ao contrário da placa formada na presença de glicose ou xilitol. Desse modo, parece provável que o complexo glucano/LTA que formar-se

*in vitro* também pode ocorrer *in vivo* quando a placa é induzida por sacarose. Além de aumentar a adesividade dos *S. mutans*, as moléculas de LTA polianiónicas formadas no interior da malha dos glucanos insolúveis podem originar uma alta pressão osmótica interna. Isto pode explicar a placa tipo gel, altamente hidratada observada em pacientes com alto consumo de sacarose.

NIKIFORUK, em 1985, descreve que a formação da placa dental requer dois tipos de específicas interações de aderência bacteriana. Primeiro, a bactéria adere seletivamente à película adquirida e, em uma segunda fase, acumula-se via específicas interações envolvendo componentes da matriz da placa e contato direto entre as células bacterianas. A alta especificidade desse processo de aderência contribui substancialmente para as diferenças na composição bacteriana que existem entre placa dental e outros sítios dentro da cavidade bucal. Em acréscimo, estudos com bactérias marinhas têm sugerido que duas fases podem estar envolvidas. Quase todas as bactérias e todas as superfícies naturais, incluindo dente, têm uma carga negativa. Na primeira fase de frouxa associação, os organismos parecem ser atraídos à superfície pelas forças de van der Waals, mas não ocorre contato firme devido aos efeitos repulsivos das cargas eletrostáticas negativas. A segunda fase de adesão resulta em uma ligação mais firme e parece envolver substâncias poliméricas sobre a superfície da bactéria que liga o organismo à superfície alvo. O material polimérico pode ligar-se à superfície pela formação de ligações de hidrogênio, hidrofóbicas, iônicas, ou outros tipos, e frequentemente íons cálcio estão envolvidos. Em adição, as bactérias parecem possuir componentes em sua superfície que têm potencial de identificação e ligam-se a receptores específicos na película e outros tecidos do hospedeiro. Esses componentes são denominados adesinas; e proteínas adesinas que ligam açúcares específicos são chamadas lectinas. Outras adesinas que contêm moléculas hidrofóbicas podem interagir com resíduos hidrofóbicos em receptores específicos. Adesinas, portanto, atuam como códigos pré-formados, os quais permitem que as células bacterianas reconheçam e tenham aderência às macromoléculas.

RÖLLA et al., em 1985, discutiram resultados que sustentam o conceito de que a enzima bacteriana glicosiltransferase ( GTF ) tem um papel crucial na formação da placa induzida por sacarose. A sacarose possui um alto potencial de induzir cárie dental ( GUSTAFSSON et al. 1954 ) maior que a glicose e frutose, apesar do fato destes monossacarídeos originarem tanto quanto ou maior produção de ácido pelos microrganismos na placa dental. Admite-se que a cariogenicidade particular da sacarose é principalmente associada com a alta energia da hidrólise, que pode ser utilizada pela bactéria para a síntese de glucanos. Em acréscimo, a GTF envolvida na síntese de glucanos a partir da sacarose é responsável pela adesividade dos glucanos às superfícies sólidas, mais do que os glucanos por si só ( RÖLLA et al, 1983 ). A molécula de GTF livre liga-se rapidamente às superfícies sólidas e pode então estar hábil a ligar-se à bactéria diretamente ou através de interações entre as cadeias dos glucanos com ligações  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 3) pela enzima adsorvida ou pelas enzimas na superfície da célula. Tais interações estabelecem fortes ligações sacarose-dependente. Em adição, é conhecido que os glucanos insolúveis produzidos pelos estreptococos do grupo mutans , na presença de sacarose, são ricos em ligações tipo  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 3). A solubilidade dos glucanos depende da proporção dos resíduos de glicose com ligações  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 3) em relação àqueles com ligações  $\alpha$  1 $\rightarrow$ 6; um relativo alto número de unidades de glicose com ligações  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 3) proporcionam ao glucano baixa solubilidade em água e uma conformidade estrutural que resulta em cadeias rígidas. Polissacarídeos com ligações  $\alpha$  (1 $\rightarrow$ 6) contêm uma ligação extra entre os resíduos , o que permite uma flexibilidade de rotação às moléculas de glicose. Portanto existem razões para se acreditar na formação de placa mediada por sacarose.

van LOOSDRECHT et al. (1990 ) citados por SCHEIE, em 1994, descreveram uma revisão na qual ilustraram esquematicamente a adesão microbiana às superfícies em ambientes aquáticos como uma seqüência de quatro estágios. Isto também pode servir como uma representação esquemática da dinâmica do processo de formação da placa. O primeiro estágio envolve o transporte inicial de uma bactéria à superfície dental. Contato ao acaso pode ocorrer, por exemplo, através de movimentos Brownianos, sedimentação de microrganismos, fluxo líquido, ou movimentos ativos dos microrganismos. O segundo estágio é a adsorção inicial reversível , que é

vulnerável para promover adesão firme e resulta da interação entre as forças atrativas de van der Waals e interações eletrostáticas repulsivas. Essas interações são influenciadas pela força iônica e pH do meio. Uma vez que estas forças tenham sido dominadas, acredita-se que as características biológicas da película adquirida e superfícies microbianas se tornem determinantes para a firme adesão subsequente, a qual constitui o terceiro estágio. A firme adesão é seguida pela colonização superficial e formação do biofilme, que eventualmente alcança o ponto culminante da colonização da placa dental.

De acordo com MARSH, em 1994, em um manuscrito sobre ecologia microbiana da placa dental e seu significado na saúde e doença, a placa dental se forma naturalmente sobre os dentes e isto é benéfico para o hospedeiro por ajudar a prevenir colonização por espécies exógenas. A composição bacteriana da placa permanece relativamente estável apesar da regular exposição às perturbações ambientais. Esta estabilidade (homeostasia microbiana) é devido, em parte, a um equilíbrio dinâmico de interações microbianas antagônicas e sinérgicas. Entretanto, a homeostasia pode ser quebrada, levando a mudanças no equilíbrio da microbiota, portanto predispondo sítios para a doença. Por exemplo, em termos de cariogenicidade, a freqüente exposição da placa a pH baixos induz a inibição de espécies ácido-sensíveis e a seleção de organismos acidúricos, tais como estreptococos do grupo mutans e lactobacilos. De uma forma similar, acúmulo de placa em torno da margem gengival induz uma resposta inflamatória do hospedeiro e um aumento do fluido crevicular gengival. A microbiota subgengival é substituída por gram-negativos e anaeróbios. Este ponto de vista tem sido incorporado como uma hipótese modificada (Hipótese da Placa Ecológica) para explicar a relação entre a microbiota da placa e o hospedeiro na saúde e na doença.

BURNE, em 1998, em uma revisão, descreve que o aspecto principal para a iniciação e progressão das doenças bucais é a formação de biofilmes sobre as superfícies da cavidade bucal (MARSH & BRADSHAW, 1995). Evidências atuais sustentam a idéia de que a placa dental patogênica não se forma espontaneamente. Tem sido reconhecido que a formação da placa é um processo heterogêneo, no qual

placas cariogênicas crescem e mudam em resposta às pressões ambientais. Embora os eventos principais na formação da placa tenham sido referidos ( formação da película, colonização e maturação ), a atribuição destas discretas fases, que na realidade são um processo que se desenvolve continuamente, parece artificial. Macromoléculas estão sendo continuamente depositadas nos biofilmes, e os filmes produzem suas próprias macromoléculas. Atividades metabólicas, especialmente proteases e glicosidasas, certamente ditam a disponibilidade dos receptores e assim, podem influenciar o recrutamento de bactérias planctônicas para a placa, ou mediar a liberação de organismos a partir dos biofilmes. Atividades metabólicas antagônicas e sinérgicas das bactérias da placa influenciam o desenvolvimento da placa e fomentam gradientes químicos e nutricionais no interior dos biofilmes. Outras causas podem influenciar as atividades biológicas e composição dos filmes em desenvolvimento, incluindo acesso à saliva, disponibilidade de oxigênio e forças mecânicas. Até o momento, tem-se um entendimento superficial dos eventos fisiológicos e moleculares que determinam se a placa vai permanecer inócua ou patogênica. Nesta área é que a integração da genética molecular, bioquímica e fisiologia microbiana e técnicas fisico-químicas irá esclarecer os eventos nos biofilmes necessários para o desenvolvimento da cárie.

### 3.2- MODELOS EXPERIMENTAIS PARA AVALIAR A RELAÇÃO DIETA- PLACA DENTAL- CÁRIE DENTAL

EDWARDSSON & KRASSE, em 1967, realizaram um estudo no qual hamsters alimentados com uma dieta contendo 56% de sacarose ou 56% de glicose, foram infectados com estreptococos de humanos. Após 70 dias sob as dietas testes, os animais foram sacrificados e avaliados quanto ao índice de cárie. Colônias facilmente identificadas dos estreptococos implantados foram observadas em grande número nas placas de ágar mitis salivarius em amostras da cavidade bucal de animais sob dieta com sacarose. Nos animais sob dieta com glicose poucas colônias puderam ser encontradas. Na dieta com sacarose, o índice médio de cárie foi de  $166 \pm 3$ , e as lesões foram frequentemente observadas nas superfícies lisas vestibular e lingual sem relação com os sulcos. Na dieta com glicose os animais apresentaram um índice médio de  $4,6 \pm 0,5$  dentes cariados, e as lesões ocorreram principalmente no sulco oclusal. Os autores concluíram que estreptococos pouco induzem cárie em animais alimentados com uma dieta contendo glicose. Para essas bactérias, a sacarose parece ser um fator que determina sua importância no desenvolvimento de cárie.

CHARLTON et al., em 1971, avaliaram a atividade do íon hidrogênio na placa dental de hamsters durante o metabolismo da sacarose, glicose ou frutose, utilizando microeletrodo de vidro. Para tal, hamsters foram separados em grupos de 03, sob condições descritas por KEYES & JORDAN (1964). Todos os animais tinham aproximadamente a mesma idade e peso. Antes do início do estudo eles foram infectados oralmente com tipos específicos de bactérias e foram mantidos sob Dieta 2000 (KEYES & JORDAN, 1964), que contém 56% de sacarose. O grupo 1 foi infectado com linhagens de *Streptococcus mutans* SI-1 obtidas de humanos e conhecidas como cariogênicas em hamsters; grupos 2 e 3 com linhagens de *S. mutans* E-49, obtidas de hamsters e conhecidas como cariogênicas em hamsters. O grupo 4 foi infectado com *Odontomyces viscosus*, linhagem T-6, um organismo filamentoso que produz alto índice de placa na área gengival, mas não induz cárie coronária em hamsters (KEYES & JORDAN, 1964). O grupo 5 permaneceu como controle não infectado. Após moderadas quantidades de placa terem se desenvolvido sobre o dente,

os índices de mudança na atividade do íon hidrogênio foram avaliados na placa durante a fermentação de soluções de vários açúcares. Um microeletrodo de vidro foi localizado na placa na superfície palatina do segundo molar superior. Após uma leitura regular ter sido obtida, uma gota (aproximadamente 0,02 ml) de uma solução de sacarose a 50% a 37° C foi aplicada na superfície da placa dos animais do grupo 1, 4 e 5. O valor de pH foi mantido continuamente por um período de 20-30 minutos ou até o valor de pH ter estabilizado por um período de 5 minutos. As leituras de pH foram convertidas para atividade de íon hidrogênio e traçadas contra o tempo. As curvas mostraram uma relação linear obtida nos períodos de 2 e 4 minutos. Esse procedimento foi repetido com uma gota de solução de glicose a 50% no molar do lado oposto, utilizou-se ainda uma gota de açúcares diluídos de frutose a 2,5% e sacarose 2,5% aplicados conforme descrito acima nos grupos 3 e 4. Os resultados mostraram que placa induzida por infecção com *S. mutans* SI-1 fermentou soluções de glicose a 50% ou sacarose a 50% mais rapidamente e produziram um pH final mais baixo do que o encontrado na placa induzida por *O. viscosus* T-6 e nos animais não infectados. Embora tenha havido considerável variação entre os animais no índice máximo de produção de ácido, as leituras foram geralmente similares para glicose ou sacarose. A comparação de produção de ácido, utilizando soluções de frutose 2,5% ou sacarose 2,5% em hamsters infectados com *S. mutans* E-49, indicou que a frutose foi convertida para ácido um pouco mais lentamente do que a sacarose. Similares observações têm sido relatadas em estudos com macacos (BOWEN, EASTOE e COCK, 1966). Entretanto, a relativa habilidade desses carboidratos para servir como substratos para produção de ácido não está em correlação com sua eficácia relativa como substratos cariogênicos da dieta, indicando que fatores adicionais estão envolvidos no desenvolvimento de cáries em hamsters.

KOLOURIDES et al., em 1976, estudaram nove açúcares e açúcar-álcoois quanto a seus efeitos em cárie experimental com um teste intraoral de cariogenicidade ( ICT ), utilizando blocos de esmalte bovino. Foram selecionados voluntários usuários de próteses parciais removíveis, com espaços edentulos posteriores bilaterais, oferecendo assim condições de comparar dois substratos ao mesmo tempo. Os nove substratos testados ( frutose, glicose, lactose, manitol, melibiose, rafinose, sorbitol, xilitol, xilose ) foram preparados em concentrações de

3%. As soluções foram aplicadas nove vezes ao dia, usualmente 9:00, 11:00, 14:00, e 16:00 horas sendo nesses tempos as próteses removidas da cavidade bucal e colocadas em um recipiente contendo dois compartimentos, um contendo solução controle (sacarose 3%) e outro o substrato a ser testado, por um período de dez minutos. Após uma semana de exposição a cada experimento, os blocos foram removidos e avaliados quanto à extensão de desmineralização com testes de dureza superficial e subsequente microrradiografia. Os resultados obtidos não mostraram diferenças detectáveis no efeito da glicose, frutose, e rafinose no teste intraoral de cariogenicidade; lactose, manitol, melibiose e sorbitol foram significativamente menos cariogênicos em relação à sacarose ( $p < 0,05$ ), enquanto xilose e xilitol foram não cariogênicos.

OSTROM & KOLOURIDES, em 1976, investigaram a aplicabilidade do teste intraoral de cariogenicidade ( ICT ) em indivíduos jovens com dentição completa, utilizando um dispositivo ortodôntico para incluir os blocos de esmalte. Os blocos foram revestidos com gaze Dacron para aumentar o acúmulo de placa, assim como permitir a retenção da placa. Dependendo das condições de cada delineamento experimental, os voluntários foram instruídos a utilizar substratos, por imersão (extraoralmente) dos blocos de esmalte de cada flange em soluções experimentais. O período de imersão foi dez minutos, quatro vezes ao dia. Para compensar o potencial das variáveis entre os lados direito e esquerdo da boca, cada lado foi utilizado alternadamente como controle ou experimental, nas sucessivas semanas, em cada série do experimento. O teste de dureza Kentron, com carga de 500g, foi utilizado para medir a severidade das lesões de esmalte pela variação de penetração, em  $\mu\text{m}$ . O experimento foi dividido em três estudos, a saber: Estudo I- Variabilidade individual – o ICT de sete dias ( com suplementação de sacarose extra-oral ) foi realizado em períodos de seis meses, até mais de um ano; Estudo II- Influência das práticas preventivas – para esta avaliação uma série de testes foi conduzida em dois indivíduos, em períodos de 14 dias, a saber: a) em cada voluntário, dois testes foram conduzidos para obter uma medida de atividade individual no ICT, para subsequente comparação com o que foi induzido pelas mudanças nos hábitos; b) dois testes foram conduzidos para avaliar se o controle de placa afetou os resultados no ICT; c) dois testes foram conduzidos para avaliar o efeito dos açúcares da dieta, sendo os voluntários orientados a abster-se do consumo de lanches, com açúcar, entre as

refeições, e a continuar a imersão extra-oral em sacarose e água dos blocos do dispositivo. Estudo III – efeitos comparativos dos substratos suplementares – comparou-se a cariogenicidade da sacarose e sorbitol por suplementação extra-oral. Os resultados mostraram que o grau de cárie experimental desenvolvida sobre os blocos de esmalte demonstraram ser característico de cada indivíduo. Os fatores testados neste estudo mostraram que a higiene oral pessoal, ou restrição de açúcares da dieta, reduziram a severidade das lesões no esmalte.

TURTOLA, em 1977, investigou, *in vitro*, o efeito de uma placa artificial sobre a dureza superficial do esmalte e penetração do flúor. Células lavadas de *Streptococcus sanguis* foram utilizadas para formar placa artificial sobre a superfície do esmalte bovino e incubadas em soluções tampões, pH inicial 6,0, por 36 horas a 37 ° C. A diminuição da microdureza superficial do esmalte sob placa fermentante poderia ser prevenida com flúor. O esmalte sob uma placa fermentante adquiriu significativamente mais flúor em relação ao esmalte sob uma placa não fermentante. Na placa fermentante, o pH diminuiu significativamente mais na ausência do flúor ( $p < 0,01$ ) do que na sua presença. O flúor combinado com a sacarose aumentou a dureza em relação ao valor original. A difusão de flúor através de uma placa artificial fermentante foi mais rápida do que através de uma placa não fermentante. Estes achados sugerem que as circunstâncias que contribuem para o desenvolvimento da cárie podem promover absorção de flúor pelo esmalte.

COLMAN et al., em 1977, estudaram os efeitos da sacarose, frutose, e uma mistura de glicose + frutose sobre a incidência de cárie dental em macacos (*M. Fascicularis*). Os animais tinham menos de dois anos de idade, com todos os dentes decíduos erupcionados, mas nenhum dos permanentes tinha erupcionado, e estes dentes estavam então livres de cáries. Durante um período de 40 dias a dieta foi composta de água, ovo cozido, uma fatia de pão branco e uma banana. Por todo o período experimental os animais foram alimentados seis vezes em cada dia da semana. Em um desses dias a dieta dos animais consistiu de um biscoito doce, um sanduíche de pão branco contendo Complian (Glaxo), confeitos e uma pequena quantidade de geléia ou pasta de amendoim, uma banana coberta com açúcar, um ovo

ou cenoura cozida, e quatro suplementos de 25 g de açúcar. Água *ad libitum* contendo 2,5 % de sacarose foi fornecida diariamente. Nos finais de semana foi dado aos animais, diariamente, um sanduíche como descrito acima, uma porção de açúcar confeitado, 20 g de queijo, 15 g de tâmaras sem caroço e de água não adoçada. Os animais testes receberam, dependendo do experimento, frutose ou uma mistura equimolar de glicose e frutose em substituição ao açúcar confeitado, e o sanduíche continha complementos sem sacarose. Em todos os grupos, o açúcar em maior quantidade na dieta foi aquele dado nos quatro suplementos diários, mas todos os animais assimilaram em seus alimentos vários outros açúcares além do açúcar teste. Assim, os animais que não recebiam suplementos com sacarose tinham alguma ingestão de sacarose em bananas, biscoitos, geléia, tâmaras, cenoura e manteiga de amendoim, enquanto os controles suplementados com sacarose poderiam ter recebido frutose em bananas e tâmaras. Os resultados mostraram que as lesões desenvolvidas não foram marcadamente diferentes entre os grupos teste e controle. A frutose foi um pouco menos cariogênica que a sacarose, mas a mistura de glicose+frutose não foi. A explicação para este achado foi que a placa formada na presença de sacarose tem poucas bactérias / volume (CARLSSON & SUNDSTRÖM, 1968) ou que a bactéria pode metabolizar mais facilmente monossacarídeos do que dissacarídeos.

Em 1981, MINAH, et al., examinaram a sucessão microbiana, cariogenicidade experimental, e metabolismo da sacarose em placas dentais desenvolvidas sobre esmalte bovino em dispositivos palatinos de acrílico. Os dispositivos foram usados por um período de 14 dias por 20 voluntários humanos, sendo 10 livres de cárie e 10 susceptíveis à cárie. Dos seis blocos inseridos nos dispositivos de acrílico, três foram expostos extraoralmente à sacarose 10% em salina 0,85% 6X/dia, e três foram expostos simultaneamente à salina 0,85% como controle. As respostas das placas ao ambiente com alta concentração de sacarose em ambas situações de cárie foram comparadas. As placas expostas à sacarose de indivíduos livres de cáries induziram menores mudanças na microdureza do esmalte, e formaram menos ácido láctico a partir da sacarose [14C] durante uma incubação de 60 minutos a 37°C, quando comparadas às placas dos indivíduos susceptíveis a cáries. O experimento revelou consistentes diferenças na resposta ecológica à um substrato cariogênico no ambiente das placas das duas populações, com placas dos indivíduos

livres de cáries exibindo menor potencial cariogênico em relação aos indivíduos suscetíveis à cárie.

LUOMA et al., em 1983, desenvolveram um experimento avaliando a dureza do esmalte bovino e sua concentração de Ca, P, Mg e F modificada por placa dental artificial (*Streptococcus mutans*) e flúor. Para isso, uma camada de células a partir de uma suspensão de *Streptococcus mutans* (pH 5,8), com ou sem sacarose, foi centrifugada sobre a superfície de blocos de esmalte bovino. Foi adicionado flúor a uma parte das amostras (F final 25 ppm). Amostras para testes e controles foram incubadas a 37<sup>o</sup> C por 18 horas. O pH da placa fermentante caiu para 4,15. Quando o flúor estava presente, o pH final foi 4,45. A microdureza da superfície do esmalte foi reduzida pela presença de sacarose, mas menos na presença de flúor. Durante a fermentação, cálcio foi liberado pelo esmalte, mas somente para o fluido e uma menor liberação ocorreu na presença de flúor. A relação por peso de Ca e P liberados pela fermentação do açúcar foi 3,14 e 1,91 quando o flúor estava presente. A concentração de flúor na superfície do esmalte foi somente levemente aumentada (130 ppm) pelo flúor na água destilada sozinha sendo que a subsuperfície do esmalte ganhou mais flúor (280 ppm). Quando a placa artificial estava presente, a adição de flúor aumentou a concentração de flúor na superfície do esmalte para 450 ppm e na subsuperfície para 210 ppm. A adição de F aumentou a concentração de flúor em uma maior extensão sob placa fermentante, 680 ppm na superfície e 400 ppm na subsuperfície do esmalte, comparados aos valores do esmalte sob a placa não fermentante.

Em 1983, BRUDEVOLD et al. avaliaram o potencial de desmineralização do esmalte por carboidratos da dieta. O teste envolveu cinco voluntários utilizando dispositivos palatinos contendo oito blocos de esmalte bovino. Os blocos foram cobertos com uma camada de células de *Streptococcus mutans*, e a desmineralização foi avaliada por mudanças na permeabilidade do iodo (Ip) ao esmalte. Os açúcares testados incluíram sacarose, frutose, glicose, lactose, maltose e galactose. Foram realizados bochechos com 15 mL de uma das soluções de açúcar por um minuto, nos tempos zero e quarenta e cinco minutos durante 1 hora e meia de

experimento. Os valores de  $I_p$  dos blocos de esmalte foram obtidos antes e após o término do teste, e as diferenças entre estes ( $\Delta I_p$ ), expressas como  $\times 10^{-10}$  mol de iodo, foram calculadas para cada bloco. A extensão de desmineralização foi similar para frutose, glicose e sacarose, menos para maltose, e mínima para galactose.

GRAF, em 1983, realizou um experimento *in vivo* no qual combinou medidas do pH da placa com mudanças na microdureza do esmalte e análise da composição microbiana da placa. Fizeram parte do estudo 02 voluntários, usuários de prótese parcial removível. Foram fixadas na superfície vestibular das próteses um microeletrodo de vidro e seis blocos de esmalte. Os eletrodos e os blocos foram subsequentemente revestidos com gaze Dracon. Os blocos de esmalte foram obtidos de pré-molares extraídos por razões ortodônticas, que foram cortados (2 x 2 mm), polidos e montados em uma peça de acrílico de tal forma que pudessem ser removidos das próteses para testes de microdureza. A dureza Knoop foi calculada a partir de impressões com diamante, com carga de 100 g por 30 segundos. A dureza inicial foi avaliada antes do início do experimento. O experimento consistiu de 02 períodos de 02 semanas. No início de cada período do experimento, a superfície do eletrodo de vidro e os blocos de esmalte estavam livres de cárie. Os voluntários submeteram-se a uma dieta balanceada e fornecida pelo hospital universitário. A dieta do primeiro experimento (2 semanas) apresentava quantidades mínimas de sacarose (2-6 g/dia). No segundo experimento utilizou-se uma alta ingestão de sacarose (50-80g/dia). Os voluntários escovaram seus dentes 1x/dia com dentifrício não fluoretado, enquanto a prótese era removida e mantida em ambiente úmido a 35° C. O pH da placa foi monitorado a cada dia, por pelo menos 11 horas. Nos dias 3,5,7,9,11 e 13 de cada experimento, 1 bloco de esmalte, que tinha sido exposto ao desenvolvimento da placa, foi submetido a teste de microdureza. Ao mesmo tempo a placa formada sobre o bloco foi coletada e analisada para *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis* e *Lactobacillus*. Para avaliar a influência quantitativa do ataque ácido, 05 valores de pH foram convertidos para concentração de íon hidrogênio. Os resultados obtidos mostraram que, durante as 2 semanas de dieta rica em sacarose, um alto ataque ácido cariogênico calculado pela concentração de íons hidrogênio foi associado com uma marcante diminuição progressiva da microdureza

do esmalte. A dieta pobre em sacarose mostrou baixa concentração de íon hidrogênio, entretanto a diminuição da microdureza do esmalte foi baixa somente durante a primeira semana.

Em 1985, HORTON et al. realizaram um estudo no qual ratos gnotobióticos foram mono infectados com *Streptococcus mutans* NCTC 10832, *Streptococcus salivarius* JMB ou *Streptococcus milleri* NCTC 111169, e mantidos sob uma dieta rica em carboidratos contendo sacarose, glicose ou amido de milho, por 21 dias. Os animais desenvolveram cárie de fissuras em todas as combinações de linhagens de estreptococcus e carboidratos, exceto com amido de milho e *Streptococcus salivarius* JMB. A incidência de cárie foi maior com *Streptococcus mutans* NCTC 10832. Para todas as espécies, o grau de potencial cariogênico por carboidrato foi sacarose > glicose > amido de milho.

ESSIG et al., em 1985, avaliaram as mudanças no pH da placa dental e microdureza de blocos de esmalte bovino utilizando o teste intra-oral de cariogenicidade ( ICT ). Os blocos de esmalte foram montados em próteses, os quais foram revestidos com uma gaze Dacron para favorecer a colonização bacteriana. Soluções de sacarose, sorbitol, e xilitol 3% foram utilizadas para imersão dos dispositivos 4X/dia, durante 10 minutos cada durante sete dias, e os resultados foram comparados com experimentos iniciais ( não imersão diária ). O pH das amostras de placa do primeiro e sétimo dia do ICT foi medido com eletrodo de antimônio. A desmineralização do esmalte foi avaliada com medidas de microdureza. O desafio cariogênico causou diminuição do pH tanto na placa-inicial como na placa imersa em sacarose. O desafio com sorbitol e xilitol não diminuiu o pH da placa. Comparado com as medidas iniciais, a imersão em sacarose causou desmineralização do esmalte; o mesmo não ocorrendo com sorbitol e xilitol.

O papel do material da matriz extracelular ( MME ) sintetizado a partir da sacarose ( S ) por *Streptococcus mutans* IB-1600 na alteração do potencial de desmineralização de placa artificial foi avaliado com um teste intraoral de desmineralização do esmalte ( TIDE ) por ZERO et al. em 1986b. As amostras de placa artificial foram preparadas a partir de células cultivadas em meio Todd-Hewitt ( THB ) suplementado com várias concentrações de sacarose e pela mistura de células crescidas em THB com proporções crescentes de MME ( THB aquecido + S + células cultivadas ). As amostras foram ainda avaliadas para densidade celular ( conteúdo de DNA ) e acidogenicidade in vitro (pH) , assim como para alterações no pH *in situ* durante um teste intra-oral após um bochecho de glucose 10%. Um aumento na proporção de MME relativo à densidade da célula foi associado com um aumento na desmineralização do esmalte. Isso tendeu a modificar quando o índice de células foi menor do que 1:19. Os dados do pH intra-oral sugerem que a presença de MME pode aumentar a desmineralização do esmalte pela alteração das propriedades de difusão pela placa.

ZERO et al em 1986a , desenvolveram um experimento no qual blocos de esmalte bovino foram cobertos por uma camada de placa bacteriana (crescida em meio de cultura) e montados em dispositivos palatinos de voluntários humanos, para estudar os efeitos da produção de ácido a partir de substratos bacterianos endógenos sobre o pH da placa e desmineralização do esmalte. As variáveis foram células com e sem substrato endógeno, bochechos com solução de glicose 10% ou sacarose 10%, ou não uso de bochechos e o tipo de microrganismo. A produção de ácido a partir de substrato endógeno por *Streptococcus mutans* IB-1600, devido, pelo menos em parte, à degradação intracelular do glicogênio, causou uma marcada e prolongada queda de pH e significativa desmineralização do esmalte. Um similar ,mas menos pronunciado efeito foi obtido com espécies de *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguis* e *Actinomyces viscosus*. Assim, a produção de ácido por fontes endógenas pelas bactérias da placa pode ser importante na etiologia da cárie dental.

KASHKET & AHERN, em 1989, investigaram a correlação entre alterações físicas no esmalte dental e mudanças na penetrabilidade ao iodo seguinte à desmineralização intra-oral ou *in vitro*. Para a desmineralização *in vitro*, blocos de esmalte bovino foram colocados individualmente em tampão lactato ( pH 4,3 ) contendo 25 mM CaCl<sub>2</sub> e 10 mM KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> por até quatro dias. A penetrabilidade aos íons iodo ( delta Ip ) aumentou em grande extensão com o tempo. Graficamente, a microdureza exibiu uma pronunciada curvatura , com delta Ip elevando rapidamente em profundidade de indentação maior que 2,5 µm. Microrradiografia e microscopia de luz polarizada demonstraram lesões subsuperficiais coincidentes somente com o maior valor de delta Ip. A desmineralização limitada durante os períodos iniciais, portanto, foi associada com mudanças mínimas próximas ou na superfície dental. A desmineralização produzida intraoralmente nos indivíduos que bochecharam sacarose 5% foi acompanhada pelo aumento no delta Ip, mas não por mudanças na microdureza superficial ou aspecto microscópico do esmalte. Isso mostrou que, nessas condições, a desmineralização foi limitada à superfície e correspondeu a fases bem iniciais de formação da lesão.

ZERO et al., em 1990, realizaram um estudo no qual a relação entre o teste de permeabilidade do iodo ( IP ), teste de microdureza superficial do esmalte (MSE ), e desmineralização do esmalte analisada quimicamente como perda mineral foi investigada utilizando blocos de esmalte bovino. Períodos de desmineralização de 0 ( controle ) e 5,15, 30,e 45 minutos usando lactato 0,05 mol/L ( pH 4,75 ) foram selecionados para assemelhar o desafio ácido que ocorre durante o teste intraoral de desmineralização do esmalte. A perda mineral encontrada ( Ca e PO<sub>4</sub> ) foi diretamente proporcional ao tempo de dissolução (  $r=0,95$  ). Variação (  $\Delta$  ) na IP e MSE aumentaram linearmente com o passar do tempo (  $r= 0,58$  e  $0,64$  ), respectivamente e foram similarmente relacionadas à perda mineral (  $r= 0,60$  e  $0,65$ , respectivamente ). A correlação entre delta IP e delta MSE foi 0,55. Quando maiores períodos de desmineralização ( 60,120,e 240 minutos) foram incluídos, a correlação entre delta IP e delta MSE foi 0,68. Concluiu-se que tanto o teste IP como o teste MSE podem ser usados como medidas do estágio inicial de dissolução do esmalte.

MELLBERG et al., 1990 , estudaram o efeito da espessura da placa sobre a progressão de lesões artificiais de cáries *in situ*. Para isso, oitenta cortes finos de esmalte com lesões de cáries artificiais foram implantados na superfície vestibular dos molares ( em próteses parciais removíveis de dez voluntários ) e recobertos com uma tela de aço para permitir acúmulo de placa. A tela foi colocada em contato direto com a superfície de esmalte em metade das lesões e 0,5 mm acima das lesões em outra metade, facilitando assim formação de amostras de placas finas e espessas. Seguindo duas semanas de uso de dentifício não fluoretado, as lesões foram analisadas para alteração mineral por microrradiografia quantitativa. Significante perda mineral foi observada nas lesões de ambos os grupos, mas a perda foi duas vezes maior no grupo com placa espessa.

KASHKET & YASKELL, em 1990, desenvolveram estudo com um sistema de desmineralização intra-oral para determinar se cálcio e fosfato inorgânico (Pi) acumulam na placa durante a desmineralização ativa do esmalte. Blocos de esmalte bovino foram cobertos com *S. mutans* e fixados em dispositivos palatinos usados pelos voluntários humanos. A desmineralização foi determinada como mudança na penetrabilidade do iodo ( $\Delta I_p$ ) no esmalte. Cálcio e fósforo foram determinados nos espaços extracelulares da placa sintética. O  $\Delta I_p$  aumentou com o tempo após administração de bochechos contendo sacarose 5% ( p/v ), enquanto o pH da placa caiu e então retornou à neutralidade. O cálcio aumentou para  $10,9 \pm 2,8$  mmol/L aos 30 minutos, enquanto o cálcio iônico e fosfato inorgânico aumentaram  $3,0 \pm 2,1$  e  $9,5 \pm 3,1$  mmol/L, respectivamente. A proporção Ca:P foi de 1.15. Bochechos com sacarose a 10% ( p/v ) deram resultados similares. As concentrações de Ca e Pi foram consideravelmente maiores do que na saliva. Acúmulos de constituintes minerais mostraram ser dependentes da atividade metabólica do *S. mutans* na placa, e em experimentos nos quais blocos de esmalte foram substituídos por blocos de acrílico, a concentração de Ca e Pi foi  $2,5 \pm 0,6$  e  $6,6 \pm 2,4$  mmol/l, respectivamente demonstrando que a maioria do cálcio e aproximadamente um terço do Pi foram derivados do esmalte. Os dados sugerem, além disso, que Ca e Pi estavam parcialmente ligados a macromoléculas complexas, e eventualmente recristalizam minerais na placa.

FU et al., 1991, compararam o efeito da espessura da placa na retenção de glicose e ácidos orgânicos produzidos por uma placa contendo glucano ( PG ) e uma placa não contendo glucano ( PNG ) utilizando um modelo intra-oral de desmineralização do esmalte ( ZERO et al. 1986 ). As placas testes foram preparadas através de culturas cultivadas de *S. mutans* IB-1600 em meio Todd Hewitt ( THB ) para PNG ou THB suplementado com sacarose 2% para PG. Por conseguinte, cinco voluntários usaram dispositivos palatinos contendo oito blocos de esmalte bovino recobertos pelas placas testes. Os testes foram iniciados com um bochecho de glicose 50% por um minuto. Medida inicial, e imediatamente após o bochecho, 1, 5, 10, 15, 30, e 45 minutos foram avaliadas separadamente. Imediatamente após cada período teste, as amostras de placa foram divididas em porções superficial ( S ) e profunda ( P ) e analisadas quanto ao peso, pH, glicose e ácidos orgânicos. Para PG após cinco minutos a média ( DP ) da concentração ( nmol/mg peso úmido ) de glicose e lactato foi 105 (18,5) e 333 (129), respectivamente para a placa S e 34,7 (43) e 243 (93,7), respectivamente, para a placa D. Para a PNG, foi 12,7 (11,3) e 259 (18,8), respectivamente, para a placa S e 0,3 (0,5) e 98,8 (31,2), respectivamente para a placa D. Esses resultados sugeriram que a presença de glucano aumenta o índice de difusão do substrato na camada profunda da placa adjacente à superfície do dente.

ZERO et al. , 1992, abordaram a questão da espessura da placa e difusão do açúcar utilizando um modelo intra-oral de desmineralização. O modelo consiste em um dispositivo contendo oito blocos de esmalte recobertos por placa teste, preparada através de culturas de *S. mutans*. O tempo do teste foi de 45 minutos e iniciado após um bochecho de sacarose 10%. A mudança na microdureza superficial do esmalte bovino foi usada como uma medida indireta da extensão da desmineralização do esmalte correspondendo às placas de diferentes espessuras ( 0,5 mm, 1,5 mm e 2,5 mm ). Para a placa sem glucanos, formada basicamente de células de *S. mutans* compactadas, desmineralização foi detectada somente na espessura de 0,5 mm, enquanto a placa com glucanos resultou em desmineralização em todas as espessuras de placa. Os resultados mostraram que a presença de glucanos aumenta o índice de difusão do açúcar e produção de ácido na camada mais profunda da placa adjacente à superfície dental, levando à desmineralização do esmalte dental.

ARENDS et al., em 1992, desenvolveram um estudo no qual apresentam dados sobre a desmineralização do esmalte humano, *in situ*, em função do período de desmineralização. Assim, lesões incipientes no esmalte foram desenvolvidas experimentalmente através do crescimento de placa sobre esmalte humano íntegro como descrito previamente (DIJKMAN et al., 1986) por períodos de quatro e oito semanas. O procedimento experimental contou com onze participantes utilizando próteses inferiores com quatro blocos posicionados 1,5 mm abaixo da superfície de resina. Durante o experimento, os voluntários não escovaram os dentes e utilizaram dentifrício não fluoretado. Determinação microrradiográfica foi realizada no esmalte íntegro e após o estudo *in situ*. Dois parâmetros microrradiográficos, profundidade da lesão ( $\mu\text{m}$ ) e perda mineral ( $\Delta Z$ ,  $\mu\text{m}/\text{vol.}\%$ ), foram determinados. Além disso, foram realizadas micrografias por microscopia eletrônica das lesões, após os cortes microrradiográficos. Os resultados mostraram que para desmineralização do esmalte *in situ*, os parâmetros profundidade da lesão assim como perda mineral variam linearmente com o tempo de desmineralização. Isto é ao contrário da formação de lesão *in vitro*, onde a terceira potência, ou potência ao quadrado da profundidade da lesão é linearmente relacionada ao tempo de desmineralização. Concluindo, este autor indica que : a) a desmineralização *in situ* é completamente diferente da desmineralização *in vitro* utilizando soluções artificiais; b) o passo determinante para o processo de desmineralização *in situ* é o processo de dissolução influenciado por inibidores na superfície dos cristalitos do esmalte; c) a concentração de inibidores *in situ* ( flúor, proteínas etc. ) originários do fluido da placa, saliva e esmalte deve ser alta, e d) a desmineralização *in situ* provavelmente ocorre nas áreas interprismáticas.

LINGSTROM et al., em 1994 em um estudo cruzado determinaram o potencial cariogênico de alimentos contendo amido como lanches entre as refeições. Isso foi realizado pela medida de desmineralização do esmalte e dentina de humanos assim como pelo pH da placa dental *in situ*. Oito voluntários usuários de próteses mantiveram 2 blocos de esmalte e 2 de dentina fixados na região de molares de suas próteses inferiores. O estudo consistiu de três períodos teste, de 21 dias cada, em ordem casualizada: 1) consumo de alimentos contendo amido, 12-15 x/dia, em adição

à dieta normal (período amido); 2) consumo de produtos com sacarose, 12 –15 x/dia, em adição à dieta normal (período sacarose); 3) não adição de produtos à dieta normal (controle). O amido e sacarose aumentaram a desmineralização do esmalte e dentina quando comparados com o período controle. O pH da placa, durante 60 minutos após um bochecho de 1 minuto com sacarose a 10%, foi menor em todos os tempos após os períodos amido e sacarose comparado com o período controle.

RANKINE et al., em 1996, realizaram um estudo com o objetivo de determinar a fonte de cálcio e fósforo na placa dental, avaliando a concentração desses íons, assim como medição do pH no fluido da placa formada sobre um dispositivo de acrílico e superfícies dentais supra-gengivais, antes e quinze minutos após bochecho com sacarose 20%. Os resultados mostraram que houve um aumento na concentração de cálcio e fósforo na placa dental após o desafio cariogênico e um significativo aumento desses componentes na placa dental obtida das superfícies dentais comparada com aquelas obtidas da superfície de acrílico. Os dados indicam que o aumento na concentração de cálcio e fósforo na placa, durante um desafio cariogênico, é provavelmente derivado da desmineralização do esmalte ou componentes extracelulares desmineralizados.

KASHKET & YASKELL, em 1997, avaliaram a desmineralização intraoral do esmalte através das mudanças na porosidade, ou penetrabilidade do iodo. Assim, voluntários utilizaram dispositivos contendo oito blocos de esmalte bovinos ( 5x5 mm ) cobertos com uma camada de *Streptococcus mutans* Ib 1600, e cada um consumiu uma porção de 5g de biscoito específico ( contendo diferentes níveis de sacarose, a saber : 4%, 20%, e 33% ; e ainda adicionados com lactato de cálcio ( LC ) na concentração máxima de 3,2 % ) ou bochechou com 15 mL de sacarose 10% por 1 minuto. A desmineralização foi determinada após 45 minutos, através das mudanças na penetrabilidade do íon iodo no esmalte ( BRUDEVOLD et al., 1984 ) ou mudanças na microdureza superficial do esmalte. A penetrabilidade do iodo nos blocos dentais foi determinada antes e após a exposição intraoral, e as diferenças ( $\Delta I_p$ ) foram calculadas. A média para os oito blocos foi calculada e expressa como unidades de  $\Delta$

Ip. A microdureza do esmalte foi determinada com um penetrador de diamante tipo Knoop e as diferenças ( $\Delta$  KMH) foram calculadas a partir de medidas realizadas antes e após exposição intraoral. O pH final das placas estreptocóccicas foi determinado com microeletrodo. O LC 3,2% (p / p) reduziu  $\Delta$  Ip de  $12,9 \pm 1,7$  para  $6,1 \pm 0,9$  unidades, ou seja, 52,7%. A desmineralização foi reduzida progressivamente com o aumento da concentração de LC adicionado, e o LC foi mais efetivo nos biscoitos mais doces. A placa reteve  $32,4 \pm 6,0$  e  $17,1 \pm 4,2$  mM de cálcio após 1 e 5 minutos, respectivamente. Os cálculos mostraram que a placa foi saturada em relação ao esmalte durante os primeiros 5-10 minutos após ingestão do alimento, apesar da progressiva queda no pH da placa. O presente estudo demonstrou a redução do potencial cariogênico do alimento sólido pela concentração de LC. Os autores sugerem que esses efeitos parecem estar relacionados à habilidade do alimento em manter altos níveis de cálcio na placa durante o período de ativa acidogênese.

CURY et al., em 1997, desenvolveram um estudo *in situ* para avaliar a relação entre a frequência de sacarose e composição da placa dental. Doze voluntários fizeram parte deste estudo cruzado, realizado em quatro fases de vinte e oito dias. Para cada fase do estudo, foi confeccionado um dispositivo de resina acrílica contendo quatro blocos de esmalte dental humano para cada voluntário. Uma solução de sacarose foi gotejada sobre cada bloco de esmalte nas frequências 0,2,4 e 8X /dia. Durante todo o período experimental os indivíduos utilizaram dentifício não fluoretado, não escovaram os blocos de esmalte e beberam água fluoretada a 0,7 ppm. Após cada fase, as concentrações de flúor, fósforo, cálcio e carboidrato total foram determinadas na placa dental. Os resultados obtidos (média  $\pm$  erro padrão) em função da frequência do uso de sacarose (0, 2, 4 e 8X/dia) foram, respectivamente: F ( $18,71 \pm 3,31$ ;  $9,64 \pm 2,81$ ;  $2,65 \pm 0,77$ ;  $2,69 \pm 0,44$   $\mu\text{g/g}$ ), P ( $3,74 \pm 1,12$ ;  $0,75 \pm 0,19$ ;  $0,37 \pm 0,06$ ;  $0,37 \pm 0,04$   $\text{mg/g}$ ), Ca ( $12,85 \pm 2,51$ ;  $3,99 \pm 1,02$ ;  $4,01 \pm 1,09$ ;  $4,17 \pm 1,07$   $\text{mg/g}$ ), carboidrato solúvel em ácido ( $5,65 \pm 0,68$ ;  $3,78 \pm 0,63$ ;  $3,56 \pm 0,60$ ;  $4,75 \pm 0,73$   $\mu\text{g/mg}$ ), carboidrato solúvel em álcali ( $12,00 \pm 2,60$ ;  $11,54 \pm 1,81$ ;  $13,95 \pm 3,29$ ;  $35,84 \pm 6,93$   $\mu\text{g/mg}$ ). A análise estatística mostrou que a alta frequência de exposição à sacarose reduziu significativamente as concentrações de F, Ca e P na placa dental, porém aumentou a concentração de carboidrato solúvel em

álcali (  $p < 0,05$  ). Esses resultados sugerem que a cariogenicidade da placa dental formada na presença de sacarose não pode ser atribuída somente à maior porosidade, mas também à menor concentração inorgânica pode ter significância. Por outro lado, a menor concentração inorgânica constatada na placa dental formada pela exposição à alta frequência de exposição à sacarose não pode ser explicada pelo delineamento experimental utilizado.

## 4-MATERIAL E MÉTODO

### 4.1- Delineamento Experimental

O estudo foi do tipo cruzado, consistindo de três (3) grupos de tratamentos, nos quais doze (12) voluntários utilizaram dispositivos intra-orais palatinos contendo quatro (4) blocos de esmalte integros, a saber :

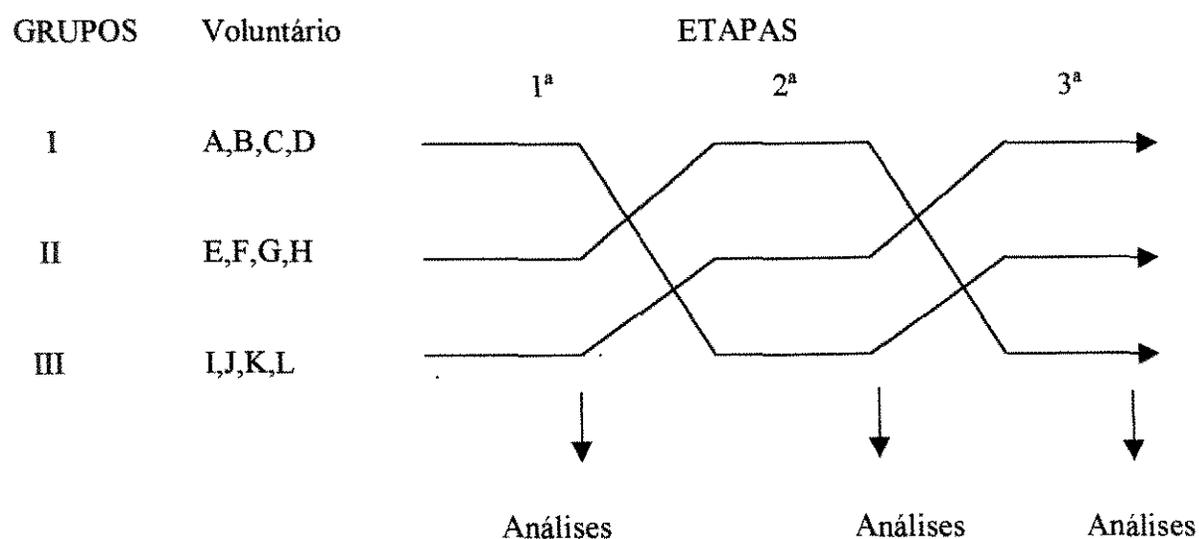
Grupo I : Controle ( não utilizando sacarose ou glicose +frutose)

Grupo II : Utilizando solução contendo glicose 10% + frutose 10% , oito (8) vezes ao dia

Grupo III : Utilizando solução de sacarose 20% , oito (8) vezes ao dia

O período total do estudo compreendeu três etapas de vinte e oito (28) dias com intervalo de sete dias entre cada etapa. Em cada etapa participaram os doze (12) voluntários, sendo quatro (4) em cada tratamento, de tal modo que ao final de todos os cruzamentos, todos os voluntários foram submetidos a todos os tratamentos.

O fluxograma abaixo resume o delineamento :



## 4.2 - FASE PREPARATÓRIA / LABORATORIAL 1

### 4.2.1- Preparo dos Blocos Dentais

Para a realização deste trabalho, foram utilizados dentes humanos, terceiros molares inclusos íntegros extraídos por razões clínicas, mantidos em formol 2% pH 7,0 ( WHITE, 1987) , por pelo menos 30 dias após as extrações. Foram selecionados dentes sem defeito no esmalte e com pelo menos 2/3 de raiz completa. Para obtenção dos blocos de esmalte (3x3x2 mm), os dentes foram seccionados com discos diamantados ( n° 11-4243 série 15-HC-Diamond BUEHLER® ) acoplados em uma cortadeira elétrica ( BUEHLER®-ISOMET ), e a partir do terço médio coronário foram obtidos os blocos dentais. As medidas foram conferidas com paquímetro digital MAUSER Jr (0,01 mm/150 mm) e acertadas com disco diamantado de dupla face acoplado a um micromotor CS-421 DENTEC. Após obtenção do bloco de esmalte, a superfície dentinária foi planificada visando à obtenção de superfícies paralelas. Para isso os blocos foram fixados com a superfície de esmalte voltada para baixo, na porção central de um disco de resina acrílica pré-fabricado (3,0 cm de diâmetro e 8,0 mm de espessura), e então levados a uma politriz APL-4 AROTEC ( modificada e contendo sistema de polimento múltiplo) com lixa de granulação 320 em baixa rotação, sob refrigeração a água, utilizando-se um (1) peso padrão ( 86 g ) durante 10 segundos. Para planificações e polimento da superfície de esmalte, os blocos foram reposicionados no centro do disco de resina acrílica, com a superfície de esmalte voltada para cima (corpos de prova), e levados à politriz com lixa de granulação 600 e dois pesos, durante 10 segundos, com o objetivo de planificá-la e remover uma camada de esmalte de aproximadamente cinquenta (50) µm (FEATHERSTONE & ZERO, 1992). Em seguida, os corpos de prova foram levados ao aparelho de ultra-som (THORNTON T 7 , 50 Watts), imersos em água deionizada (200 ml para 12 corpos de prova), durante dois (2) minutos. Após isso, os corpos de prova foram levados à politriz, em baixa rotação, lixa de granulação 1200 com dois (2) pesos , durante 15 segundos. Novamente os corpos de prova foram submetidos ao ultra-som, conforme descrito anteriormente. Para o acabamento final, utilizou-se a politriz com disco de papel feltro (Polishing Cloth BUEHLER® n° 40-7618) e suspensão de diamante (BUEHLER-METADI® Diamond Suspension 1 micron – Water Base n° 40-6530), baixa velocidade, dois (02) pesos padrão, durante um (1) minuto. Após isso, os corpos de prova

foram lavados em água corrente deionizada, durante três (3) minutos. A seguir os corpos de prova foram submetidos ao ultra-som, durante dois minutos, imersos em solução (ULTRAMET<sup>®</sup> SONIC Cleaning Solution n°75-5000-032 BUEHLER<sup>®</sup>) diluída na proporção 20:1, em água deionizada. Finalmente, os corpos de prova foram lavados em água deionizada corrente, durante três (3) minutos, identificados e conservados em ambiente úmido a 4° C.

#### 4.2.2- Seleção dos Blocos Dentais e Análise da Microdureza Superficial do Esmalte (MSE)

Para análise da microdureza superficial do esmalte utilizou-se o microdurômetro SHIMADZU HMV-2000 e penetrador tipo Knoop com carga estática de 50 gramas e tempo de cinco (5) segundos. No centro do bloco de esmalte, 200  $\mu\text{m}$  abaixo do limite superior e 1.000  $\mu\text{m}$  à direita do limite esquerdo foi realizada uma impressão de referência, utilizando-se carga estática de 100 g durante cinco (5) segundos. Em seqüência foram realizadas cinco (5) impressões, com carga estática de cinquenta (50) g por cinco (5) segundos, separadas entre si por uma distância de cem (100)  $\mu\text{m}$  (Fig.1). Esta análise foi realizada previamente à colocação dos blocos de esmalte no dispositivo intra-oral, sendo selecionados apenas os blocos com dureza superficial média de 340 ( +/- 10%) e descartados os demais, servindo também para conhecer o valor inicial médio da MSE e determinação da sua variação após o experimento.

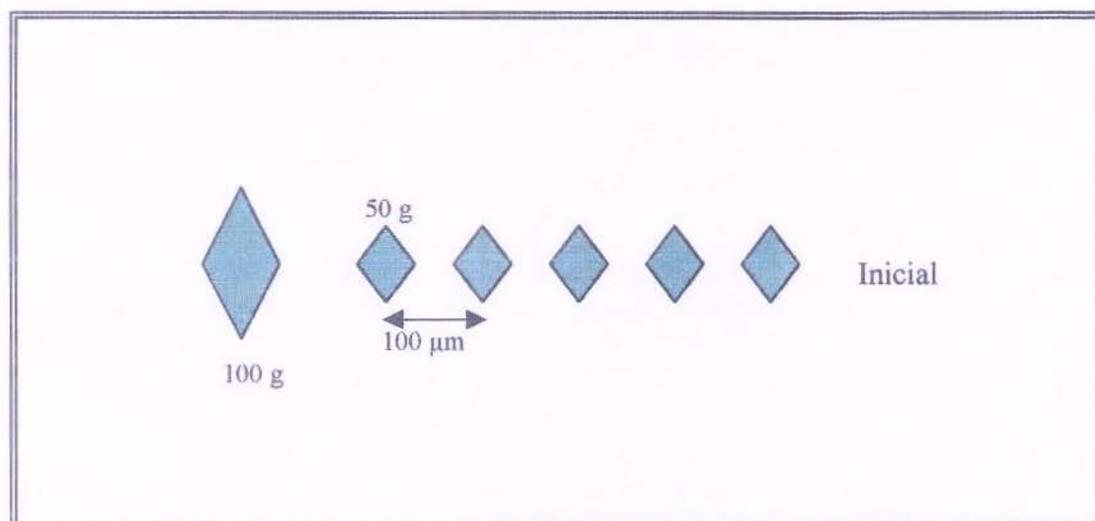


Figura 1 – Representação esquemática das impressões iniciais realizadas nos blocos de esmalte.

#### 4.2.3- Confeção dos Dispositivos Intra-orais Palatinos

Foram confeccionados três (3) dispositivos intra-orais palatinos para cada voluntário (um para cada etapa do experimento), nos quais foram preparadas quatro (4) cavidades de 3x3x3 mm na altura correspondente aos dentes molares, sendo duas (2) de cada lado nas quais foram fixados os blocos dentais. Uma tela plástica foi fixada no acrílico sobre os blocos dentais deixando-se um espaço de um (1) mm entre a superfície do bloco dental e a tela, para permitir acúmulo de placa dental ( BENELLI *et al.* , 1993 ), (Fig. 2).

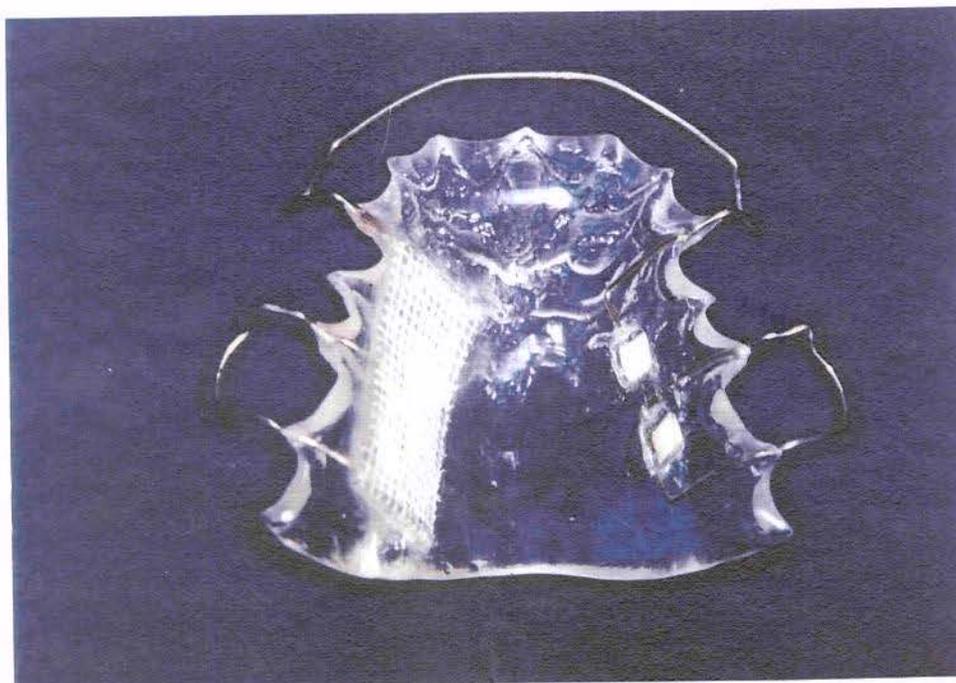


Figura 2 – Dispositivo intra-oral palatino, mostrando do lado esquerdo os blocos em posição sem a proteção da tela plástica e do lado oposto com a mesma.

### 4.3- FASE CLÍNICA

Após informações e assinatura do termo de compromisso e consentimento para pesquisa clínica em seres humanos, atendendo a Resolução nº 196 de dez (10) de março de 1996, do Conselho Nacional de Saúde/ Ministério da Saúde-Brasília,D.F. (Anexo 1) , doze (12) voluntários adultos, residentes em Piracicaba-SP (região com água fluoretada, apêndice 1) com bom estado de saúde oral e geral, participaram deste estudo. Os voluntários utilizaram os dispositivos intra-orais palatinos diariamente, inclusive para dormir, removendo-os, porém mantendo-os em ambiente úmido, durante as refeições. Os voluntários receberam orientações por escrito enfatizando a não utilização de produtos contendo flúor, exceto água. Para escovação habitual dos dentes, assim como da superfície interna do dispositivo intra-oral palatino, utilizou-se uma formulação de dentifício não fluoretado, preparada para a pesquisa ( Kolynos do Brasil ). Para simular desafio cariogênico colocou-se uma (1) gota de solução de sacarose 20% ou solução contendo glicose 10% + frutose 10% sobre cada bloco dental, e após 5 minutos, o dispositivo foi recolocado na boca. Este procedimento foi repetido oito(8) vezes ao dia (Anexo 2), quando os voluntários estavam nos Grupos II e III , respectivamente, sendo que quando os voluntários estavam no grupo I, eles apenas utilizavam os dispositivos, porém sem uso das soluções de acordo com o delineamento experimental.

## **4.4- FASE LABORATORIAL 2**

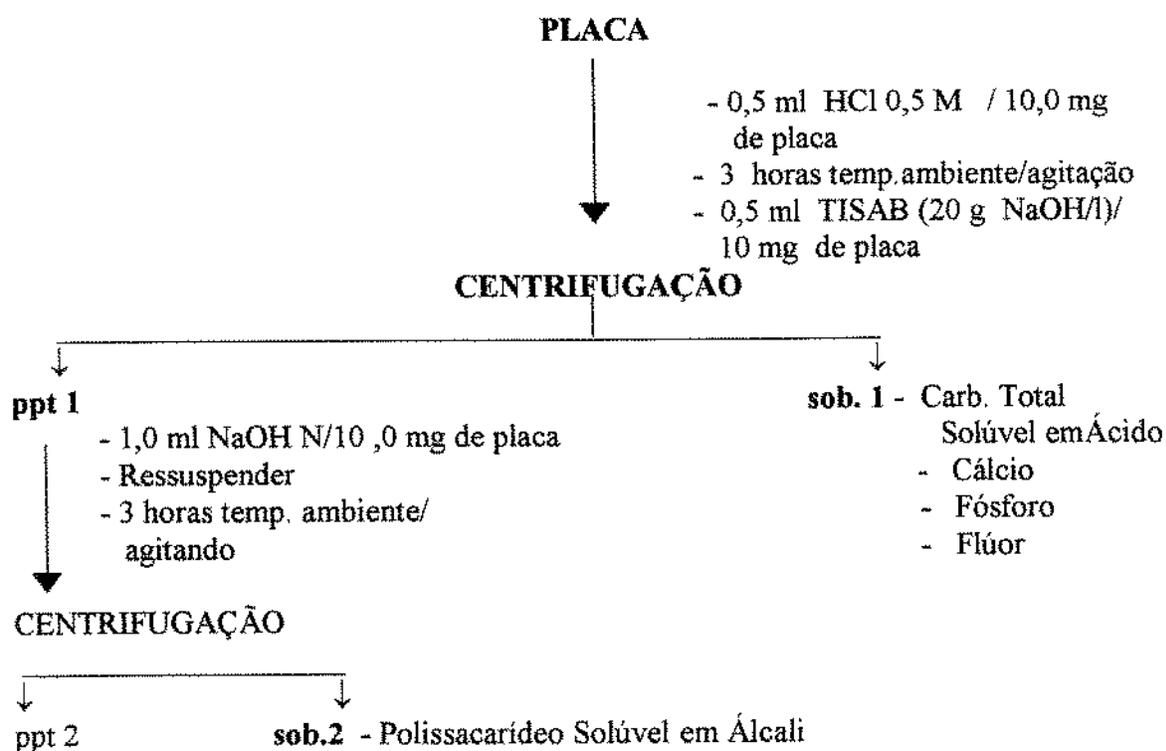
### **4.4.1- Determinação do Peso Úmido da Placa Dental**

Ao final de cada etapa do experimento, 12 horas após a última exposição aos carboidratos, as telas plásticas que recobriam os blocos de esmalte foram removidas com lâminas de bisturi nº 15 e então com uma espátula plástica de ponta fina (JON) coletou-se a placa dental, formada sobre os blocos de esmalte, sendo imediatamente transferidas para tubos de microcentrífugas pré-pesados. O peso úmido da placa dental foi determinado utilizando-se uma balança analítica (Analitical Plus OHAUS), sendo expressa a média em mg/ bloco de esmalte.

## 4.4.2 - Análise da Placa Dental

### 4.4.2.1- Análise de Componentes Inorgânicos e Carboidratos

Para análise de componentes orgânicos e inorgânicos da matriz da placa dental, amostras das placas formadas sobre os dois blocos de esmalte foram tratadas com 0,5 mL de HCl 0,5 M /10 mg de placa dental, durante três (3) horas, temperatura ambiente, sob agitação. Após a extração utilizou-se o mesmo volume de TISAB II pH 5,0 (contendo 20 g NaOH/L) como tampão (CURY et al., 1997). As amostras foram centrifugadas em centrífuga INCIBRÁS SPIN 1 durante um (1) minuto, 11.000 g, sendo então no sobrenadante (sob.<sub>1</sub>) determinadas as concentrações de flúor, fósforo, cálcio (PEARCE, 1984; TATEVOSSIAN, 1990) e carboidrato total solúvel em ácido (MÄKINEN et al., 1985). Ao precipitado (ppt<sub>1</sub>) adicionou-se 1,0 mL de NaOH N / 10 mg de placa dental, ressuspendeu-se o precipitado e deixou-se três horas em temperatura ambiente, sob agitação. Em seguida as amostras foram centrifugadas, conforme especificação acima, sendo então no sobrenadante (sob.<sub>2</sub>) determinada a concentração de polissacarídeo solúvel em álcali (MÄKINEN et al., 1985). O fluxograma 2 resume este tratamento.



Fluxograma 1 - Análise da composição inorgânica e carboidratos da placa dental .

#### 4.4.2.1.1- Determinação da Concentração de Flúor

A concentração de flúor no sobrenadante ( sob.<sub>1</sub> ) foi determinada utilizando-se potenciômetro ORION EA-940 com um eletrodo específico para flúor ORION 96-09, utilizando-se para a curva de calibração padrões de 0,025 a 0,50  $\mu\text{g F}^-/\text{mL}$  preparados com TISAB II<sup>1</sup> pH 5,0 (20 g NaOH/L) a 50% e HCl M. As leituras das amostras foram expressas em milivolt (mV) as quais foram transformadas em  $\mu\text{g F}^-/\text{mL}$  através de regressão linear da curva de calibração, utilizando-se para tal o software Quatro-Pro. O resultado foi expresso em  $\mu\text{g F}^-/\text{g}$  de placa dental.

#### 4.4.2.1.2- Determinação da Concentração de Fósforo

A determinação da concentração de fósforo inorgânico na placa dental foi realizado pelo método de FISKE & SUBARROW, 1925, que tem como princípio que o fósforo dos fosfatos minerais é transformado em fosfomolibdato, o qual é em seguida reduzido pelo ácido alfa-amino-naftol sulfônico a um produto de cor azul, cuja intensidade de coloração é proporcional ao teor de fósforo inorgânico presente na amostra. Sendo assim, foram pipetados 0,25 mL de amostra ( sob.<sub>1</sub> ) e acrescentaram-se 2,05 mL de água deionizada, 0,5 mL de ácido molibdico, agitou-se e após 10 minutos adicionaram-se 0,2 mL de redutor, agitou-se novamente e, após 20 minutos, a intensidade de cor foi medida em um espectrofotômetro BECKMAN DU-65 à 660 nm.

<sup>1</sup> TISAB [ Tampão acetato 1,0 M, pH 5,0, contendo NaCl 1,0 M, CDTA ( Ácido diaminociclohexanotetracético ) 0,4 % e 20 g de NaOH/L ]

#### **4.4.2.1.3- Determinação da Concentração de Cálcio**

A concentração de cálcio nas amostras ( sob.1 ) foi determinada através de espectrofotometria de absorção atômica, um processo pelo qual os constituintes de uma amostra são decompostos e convertidos para partículas atômicas. Para tal utilizou-se um espectrofotômetro, por chama, PERKIN ELMER-306 sendo as leituras realizadas a 212 nm.

#### **4.4.2.1.4- Determinação da Concentração de Carboidrato Solúvel em Ácido**

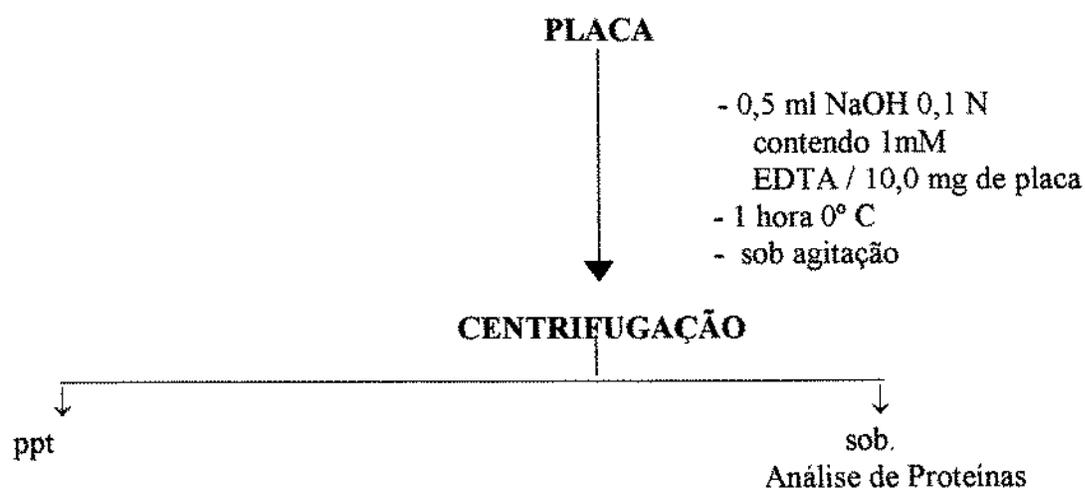
A concentração de carboidratos solúveis em ácido nas amostras de placa foi determinada no (sob.1) do fluxograma 1. A análise foi realizada pelo método de dosagem de carboidratos totais (DUBOIS *et al.* 1956), que se baseia na reação de um açúcar, quando na presença de um ácido forte ( $H_2SO_4$ ), formar compostos furfúricos a partir de uma pentose ou hexose. Os compostos furfúricos na presença de fenol obtêm uma coloração laranja, cuja intensidade é proporcional ao teor de açúcar na amostra. Decorridos 20 minutos, após as amostras terem sido preparadas, a intensidade de cor foi medida em um espectrofotômetro BECKMAN DU-65 a 490 nm. O resultado foi expresso em  $\mu g/mg$  de placa.

#### **4.4.2.1.5- Determinação da Concentração de Polissacarídeo Solúvel em Álcali**

A concentração de carboidratos solúveis em álcali nas amostras foi determinada no sob.2 do fluxograma 1. A dosagem foi realizada como descrito no item 4.4.2.1.4.

#### 4.4.2.2- Análise de Proteínas da Placa Dental e Saliva

Para análise de proteínas da matriz, amostras de placa dental formada sobre os outros dois (2) blocos de esmalte foram pesadas e tratadas durante 1 hora, 0°C, sob agitação com 0,5 mL de NaOH 0,1 N ( FOX & DAWES, 1970 ) contendo 1mM EDTA ( IACONO, 1982 ), para cada 10,0 mg de placa dental. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm (BECKMAN, MICROFUGE-E TM), 4°C, durante 5 minutos. No sobrenadante foram determinadas as concentrações de proteína assim como análise do perfil eletroforético. O fluxograma 2 resume este tratamento.



Fluxograma 2 - Análise da composição orgânica total da matriz da placa dental

#### 4.4.2.2.1 - Análise da Concentração de Proteínas da Placa Dental

A concentração de proteína no extrato da placa foi determinada pelo método de BRADFORD (1976), o qual se baseia na ligação do Comassie Brilliant Blue G-250 à proteína. Para a curva de calibração utilizou-se padrão de soro-albumina bovina ( SIGMA N° A-7638 ), nas concentrações de 1,0-10,0 µg de proteína/mL. Após o preparo das amostras, estas foram lidas em espectrofotômetro BECKMAN-DU 60, a 595 nm.

#### 4.4.2.2.2 -Eletroforese de Proteínas da Placa Dental

As proteínas no extrato da placa dental foram analisadas logo após a extração, através de eletroforese dissociante em gel de poliacrilamida (gradiente de concentração 10- 30%) o qual consiste na análise de proteínas desnaturadas por aquecimento, na presença de SDS e 2-mercaptoetanol. Uma vez que neste método as moléculas se separam de acordo com seus respectivos tamanhos, este sistema serve para a determinação do peso molecular de proteínas na amostra. Para isso, compara-se a mobilidade das moléculas da amostra com a mobilidade de proteínas padrão de peso molecular conhecido. A mobilidade das proteínas no gel é função logarítmica de seus respectivos pesos moleculares (ALFENAS, 1991 ). A eletroforese foi realizada em placa vertical e em sistema descontínuo, o qual consiste em dois sistemas de géis ( gel separador e gel concentrador ) e de solução tampão dos géis ( Tris-HCl ) diferente daquela dos eletrodos ( Tris-glicina). A solução tampão usada na amostra de proteína foi a mesma do gel concentrador. Sob a ação da corrente elétrica, as moléculas migram da parte mais porosa ( gel concentrador ) para a menos porosa ( gel separador ). Enquanto no gel concentrador ( Tris-HCL, pH 6,8 ) as moléculas de proteínas concentram-se em uma banda estreita e compacta, no gel separador ( Tris-HCl, pH 8,9 ) elas se separam de acordo com as suas respectivas cargas e pesos moleculares. A migração se dá em direção ao polo positivo ( anodo ). A mobilidade é função do pH do meio, ponto isoelétrico ( pI ) e pesos moleculares. Assim, quanto menos eletronegativa for a molécula e quanto maior o seu peso molecular, menor será a sua mobilidade no gel. Em seqüência à metodologia, as proteínas totais solúveis extraídas da placa dental foram dissociadas, na proporção 1:1 (v/v) em tampão contendo Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8; glicerol 22,5%; SDS 2,2%; 2-mercaptoethanol (5%); azul de bromofenol

0,001% e submetidas a banho-maria fervente por 10 minutos. Para estimativa dos pesos moleculares, utilizou-se uma mistura padrão de proteínas (SIGMA- Dalton Mark VII-L for SDS Gel Electrophoresis / Peso molecular entre 14,000-70,000) submetidas às mesmas condições de dissociação das amostras. A quantidade aplicada no gel foi de 10  $\mu$ L para a mistura padrão e 50  $\mu$ l para as amostras de placa dental. Em seguida, as placas foram ligadas a uma fonte de energia, sob temperatura de 4° C, utilizando-se corrente constante ( 30 mA ), com voltagem inicial 160-165 e final de 230-270. Quando a linha frontal do azul de bromofenol atravessou todo o gel, desligou-se a fonte, sendo o tempo de corrida de aproximadamente 4 horas. O gel foi então removido das placas, cortado à altura da linha frontal do corante e fixado por 10 minutos em uma solução fixadora ( TCA 5%, ácido sulfosalicílico 5%, metanol 18%, Coomassie brilliant blue 0,02% ), e corado por duas horas em uma solução de Coomassie brilliant blue R-250 0,115%. A coloração de fundo foi removida utilizando-se uma solução descorante ( ácido acético 10%, metanol 23 %, água destilada 68% ) com sucessivas trocas até a visualização das bandas proteicas. A mobilidade relativa ( $R_m$ ) das proteínas foi calculada a partir da relação distância percorrida pela molécula de proteína e distância percorrida pelo corante Azul-de-Bromofenol, indicador da migração eletroforética das amostras.

#### **4.4.2.2.3 - Análise da Concentração de Proteínas da Saliva**

Inicialmente, a saliva não estimulada foi coletada em tubos de centrífuga imersos em gelo. Em seguida, as amostras foram centrifugadas durante 10 minutos, 2.000 rpm ( BEELEY, 1969 ). Após coleta do sobrenadante, a concentração de proteína da saliva foi determinada pelo método de BRADFORD (1976) como descrito no item 4.4.2.2.1.

#### **4.4.2.2.4- Eletroforese De Proteínas Da Saliva**

Em seguida, as proteínas da saliva foram avaliadas por eletroforese dissociante em gel de poliacrilamida 10%, conforme descrição no item 4.4.2.2. ; sendo que o volume aplicado no gel foi de 20  $\mu$ L para as amostras e 10  $\mu$ L para a mistura padrão. Para dissociação das amostras de saliva utilizou-se a metodologia descrita no item 4.4.2.2.2.

### **4.4.3- Avaliação Clínica da Cárie Dental**

Após o término de cada fase e remoção da placa dental sobre os blocos de esmalte, estes foram limpos com escova macia e dentifrício não fluoretado, secos e avaliados por exame visual, quanto à presença ou não de perda visível de minerais (mancha branca). Os blocos foram então fotografados (DENTAL EYE II – YASHICA).

#### 4.4.4- Análise da Microdureza Superficial do Esmalte

Após o término de cada fase, os blocos foram reposicionados nos mesmos suportes de acrílico, e avaliados pela análise da microdureza superficial do esmalte, utilizando-se a mesma metodologia descrita no item 4.2.2. Foram realizadas dez (10) impressões, 5 a 100  $\mu\text{m}$  acima e 5 a 100  $\mu\text{m}$  abaixo das impressões previamente realizadas (inicial) ( Fig.6 ). A partir da média das 10 impressões calculou-se uma média, a partir da qual foi determinada a porcentagem de perda de dureza superficial (% PDS ) calculada pela fórmula descrita abaixo:

$$\% \text{ PDS} = \frac{\text{Dureza inicial} - \text{Dureza pós-tratamento}}{\text{Dureza inicial}} \times 100$$

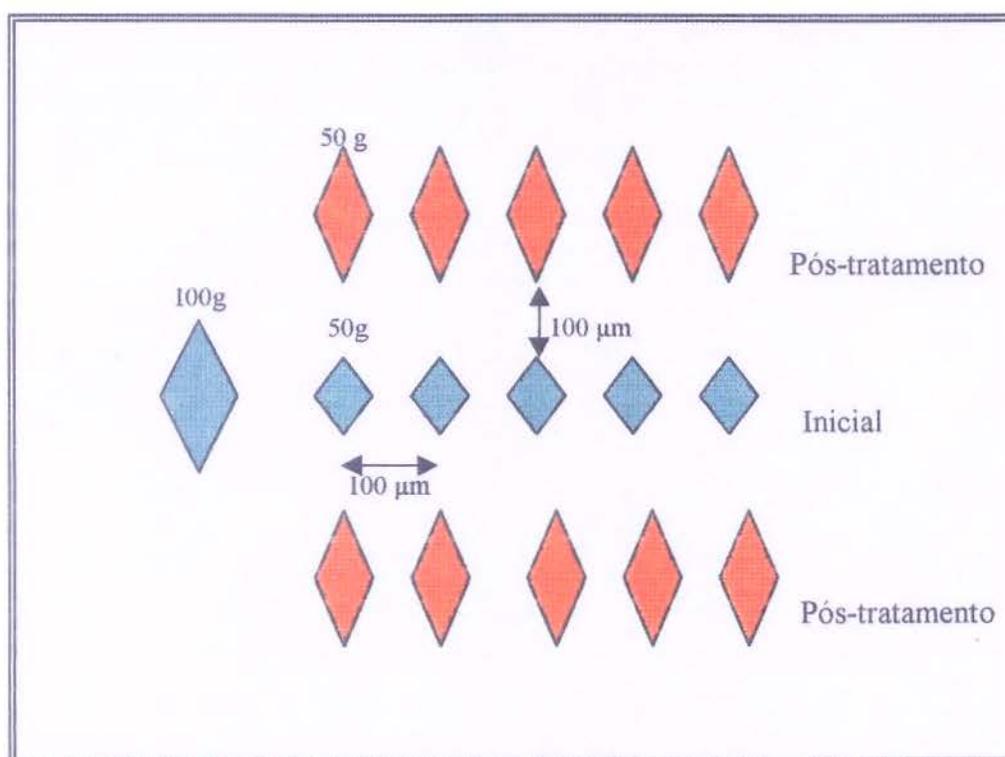


Figura 3 – Representação esquemática das impressões realizadas nos blocos de esmalte

#### 4.4.5 - Análise da Microdureza Interna do Esmalte

Para análise de microdureza interna foram utilizados dois blocos seccionados por corte longitudinal central, utilizando-se disco diamantado de dupla face (nº 11-4243 série 15-HC Diamond BUEHLER) acoplado a uma cortadeira elétrica BUEHLER ISOMET. Em seguida, os blocos foram embutidos com resina acrílica incolor (Clássico), utilizando-se a embutidora metalográfica AROTEC PRE-30, padronizando 10 minutos de aquecimento com uma média de  $100 \text{ Kgf/cm}^2$  de pressão e 20 minutos de resfriamento ( Fig. 4 ). Assim, foram obtidos os corpos de prova os quais foram levados ao microdurômetro SHIMADZU-2000 para determinação da microdureza interna do esmalte. As impressões foram realizadas a distâncias de 20, 40, 60, 80 e 100  $\mu\text{m}$  da superfície externa do esmalte, sendo 05 impressões na região central do bloco dental (posição B) e 5 impressões 100  $\mu\text{m}$  acima ( posição A ) e abaixo ( posição C ) desta região ( Fig. 5 ). Nas áreas com perda mineral severa, onde as leituras das impressões não puderam ser feitas, atribuiu-se valor zero. Médias das microdurezas nas três posições foram calculadas a cada distância da superfície do esmalte. As indentações foram feitas com uma ponta diamantada tipo Knoop, carga estática de 25 g durante 5 segundos. As leituras do número de dureza Knoop (KHN) foram obtidas diretamente do aparelho. A área ( $\text{KHN} \times \mu\text{m}$ ) foi determinada através do cálculo integral utilizando regra trapezoidal simples. De acordo com FEATHERSTONE et al. (1983) há uma boa correlação ( 0,9 ) entre dureza Knoop do esmalte seccionado e a porcentagem de mineral medida por microrradiografia.

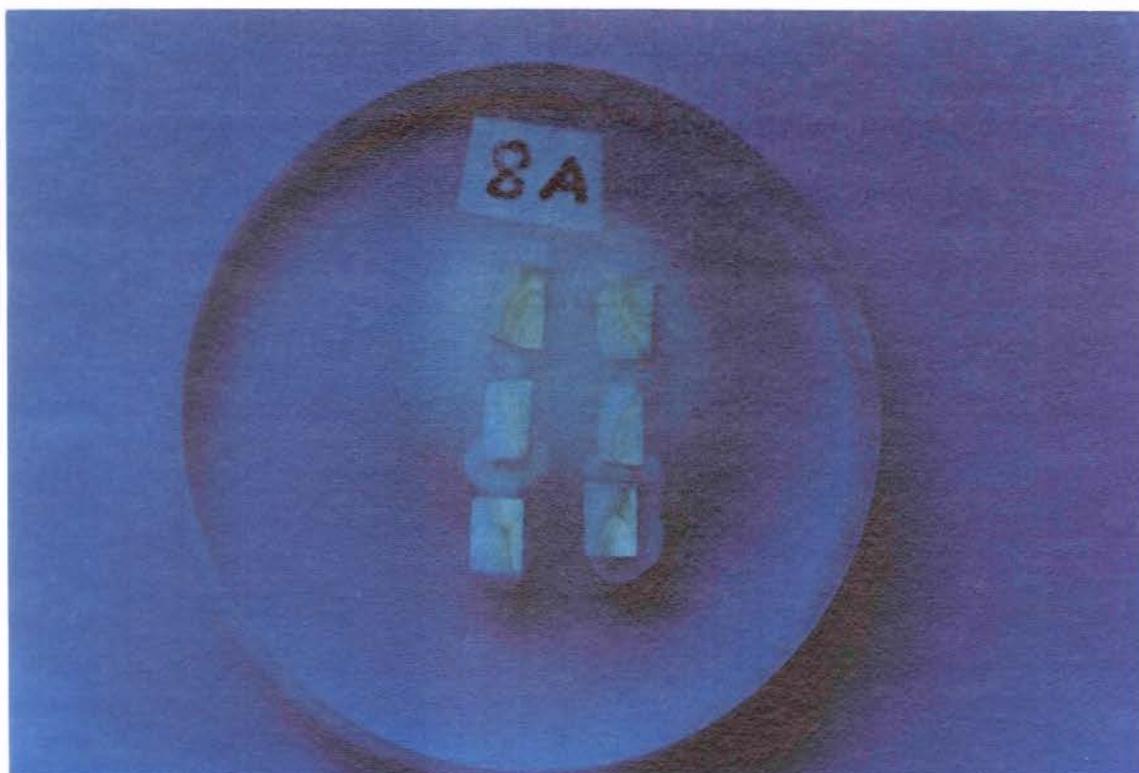


Fig.4 – Corpo de prova com os blocos de esmalte de um voluntário quando submetido aos tratamentos controle, glicose + frutose e sacarose.

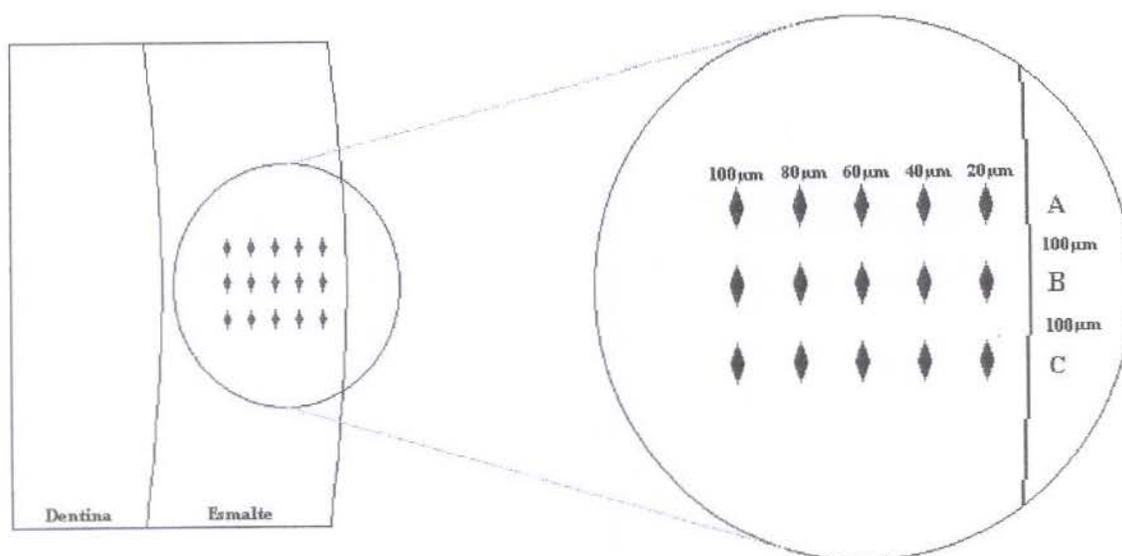
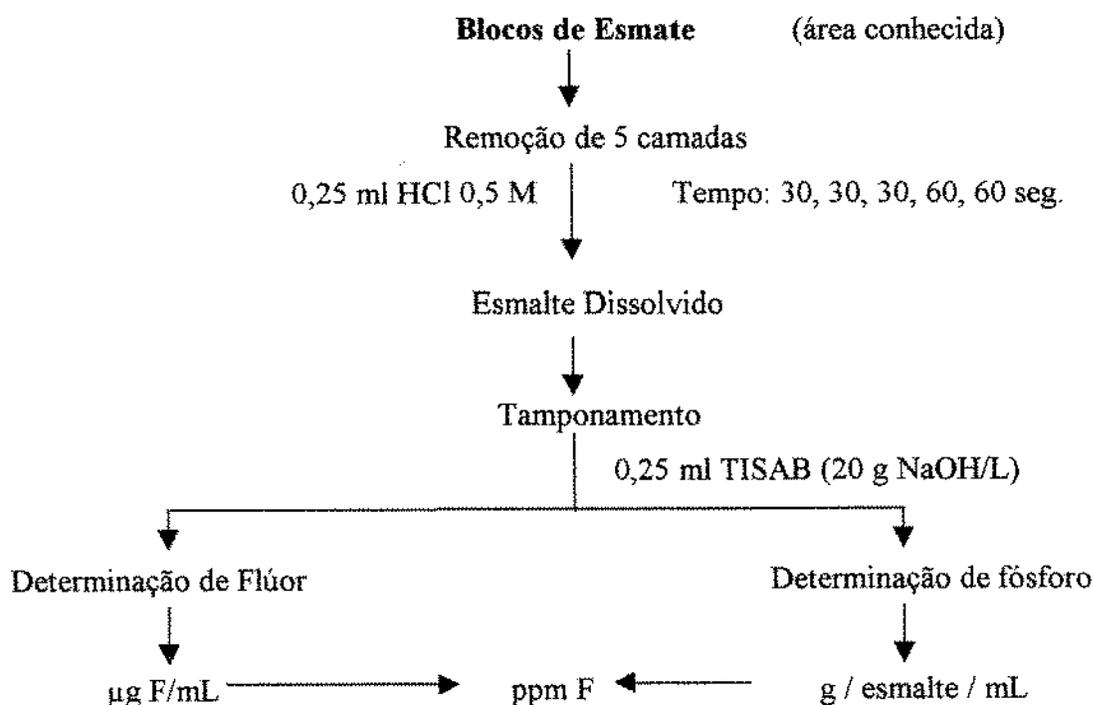


Fig. 5 – Diagrama representando um bloco de esmalte dentário com as 15 indentações e respectivas posições e distâncias.

#### 4.4.6 - Análise da Concentração de Flúor no Esmalte

A concentração de flúor no esmalte dental foi avaliada nos dois blocos remanescentes usados por cada voluntário. De cada bloco, 5 camadas de esmalte foram sequencialmente removidas por imersão em 0,25 ml de HCl 0,5 M nos tempos 30, 30, 30, 60, 60 segundos sob agitação. Um volume igual de TISAB II pH 5,0 (20 g NaOH/L) foi adicionado a cada solução contendo a camada de esmalte dissolvido. A concentração de flúor presente em cada camada de esmalte foi determinada utilizando-se eletrodo específico ORION 96-09 acoplado a um analisador de íons ORION 940. As leituras das amostras foram expressas em milivolt (mV) as quais foram transformadas em  $\mu\text{g F}^-/\text{mL}$  através de regressão linear da curva de calibração, utilizando-se para tal o software Quatro-Pro. A espessura da camada de esmalte removida durante o ataque ácido foi determinada a partir da dosagem de fósforo inorgânico ( $\text{P}_i$ ), basicamente de acordo com o método de FISKE & SUBARROW (1925), descrito anteriormente no item 4.4.2.2.2. Para o cálculo da massa de esmalte removido, considerou-se um teor de  $\text{P}_i$  no esmalte de 17,4 %, e para o cálculo da espessura de cada camada de esmalte considerou-se um valor de densidade do esmalte de 2,92 (LAZZARI, 1976). O diagrama abaixo resume esta metodologia.



A concentração de flúor ( ppm ) a cada distância (  $\mu\text{m}$  ) da superfície do esmalte foi calculada, e a área sob a curva de concentração de flúor em função da distância da superfície ( ppm F x  $\mu\text{m}$  ) foi determinada por regra trapezoidal simples.

#### **4.4.7- Análise Estatística**

A análise estatística através do teste de normalidade de Shapiro-Wilks constatou a não normalidade na maioria das variáveis. Assim optou-se por análise não paramétrica para todas as variáveis, considerando que as variáveis com distribuição normal, quando analisadas por análises não paramétricas, têm o mesmo poder que a análise paramétrica (JONES & KENWARD, 1989). Sendo assim, empregou-se um processo não paramétrico para a análise de variância (ANOVA), sendo as médias das ordens das observações avaliadas por comparações múltiplas em um nível de 5% de significância utilizando-se o SAS<sup>1</sup>. Uma vez que no processo não paramétrico o que se utiliza é a ordem dos dados na amostra, as médias foram apresentadas apenas para facilitar a discussão dos resultados.

## 5- RESULTADOS

### 5.1- Peso Úmido ( P.U ) da Placa Dental

A seguir são apresentadas as médias e os respectivos desvios padrão do peso úmido de placa dental por tratamento.

Tabela I – Médias e erro padrão da média dos pesos da placa dental, por bloco de esmalte, em função dos tratamentos.

Tratamentos	P.U. ( mg)
Controle	4,54 ± 2,15 a
Glicose + Frutose	7,30 ± 1,18 a
Sacarose	13,17 ± 2,06 b

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

Verificou-se que uma maior quantidade de placa foi formada quando da exposição a sacarose, diferença esta estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) em relação aos grupos controle e glicose+frutose. Embora quando da exposição a glicose+frutose tenha sido observada uma maior formação de placa em relação ao controle a diferença não atingiu nível de significância estatística ( $p > 0,05$ ). Os resultados estão ilustrados na figura 6.

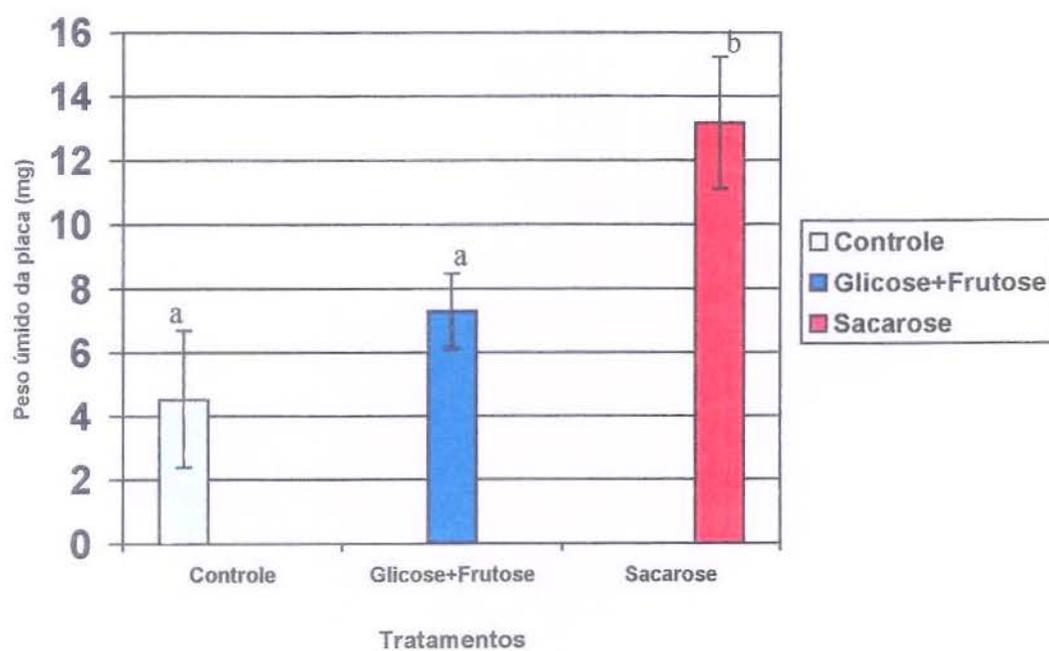


Figura 6 - Representação das médias e seus respectivos desvios padrões do peso úmido da placa dental, em função dos tratamentos e significâncias estatísticas.

## 5.2- Concentração de Flúor na Placa Dental

A seguir são expressas as médias e os respectivos desvios padrão da concentração de flúor na placa dental por tratamento ( $\mu\text{g F}^-/\text{g}$  de peso úmido de placa).

Tabela II – Médias e erro padrão da média das concentrações de flúor na placa dental, em função dos tratamentos (Controle, Glicose+Frutose e Sacarose).

Tratamentos	$\mu\text{g F}^-/\text{g}$
Controle	140,63 $\pm$ 30,78 a
Glicose + Frutose	27,74 $\pm$ 15,92 b
Sacarose	5,58 $\pm$ 2,24 b

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

Verificou-se que os tratamentos sacarose e glicose+ frutose não diferiram entre si de uma maneira significativa ( $p>0,05$ ), apesar da menor média de concentração do flúor ter sido encontrada no tratamento sacarose. Entretanto, os tratamentos sacarose e glicose+frutose foram estatisticamente diferentes ( $p<0,05$ ) do grupo controle, o qual apresentou a maior média de concentração de flúor na placa dental. Estes dados estão ilustrados na figura 7.

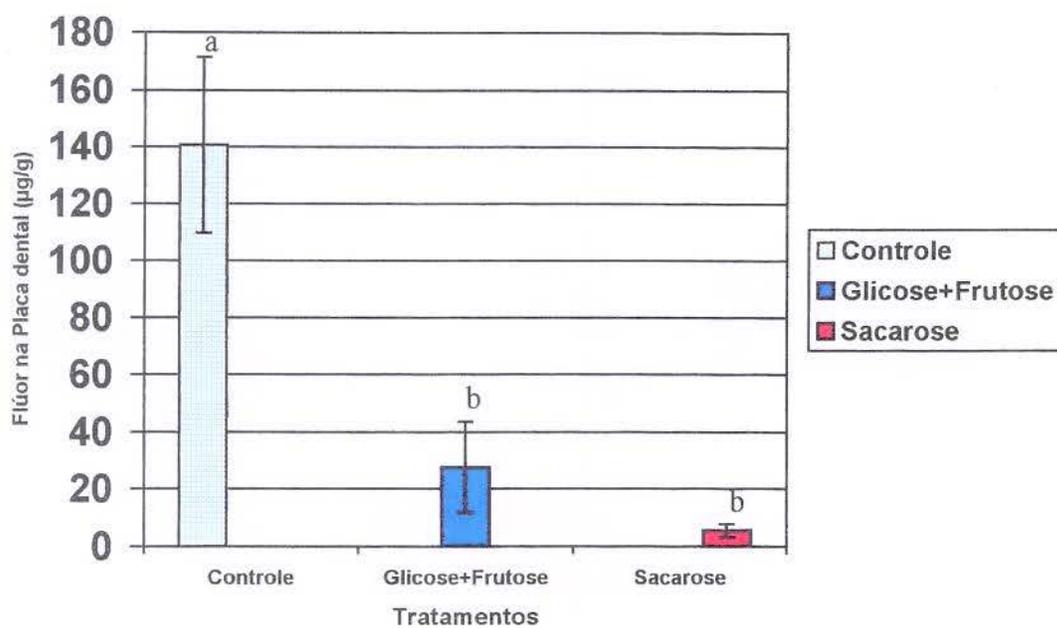


Figura 7 - Representação das médias das concentrações de flúor na placa dental, em função dos tratamentos e significâncias estatísticas.

### 5.3- Concentração de Fósforo na Placa Dental

A seguir são apresentadas as médias e os respectivos desvios padrão da concentração de fósforo na placa dental por tratamento.

Tabela III- Médias e erro padrão da média das concentrações de fósforo na placa dental, em função dos tratamentos (Controle, Glicose+Frutose e Sacarose).

Tratamentos	mg P/ g
Controle	11,52 ± 2,08 a
Glicose + Frutose	0,51 ± 0,14 b
<b>Sacarose</b>	0,30 ± 0,04 b

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

Verificou-se que os tratamentos sacarose e glicose+ frutose não apresentaram diferença significativa entre si ( $p>0,05$ ), apesar da menor média ter sido encontrada com o tratamento sacarose. Entretanto, os tratamentos sacarose e glicose+frutose foram estatisticamente diferentes do grupo controle ( $p<0,05$ ), o qual apresentou a maior média de concentração de fósforo na placa dental. Os resultados estão ilustrados na figura 8.

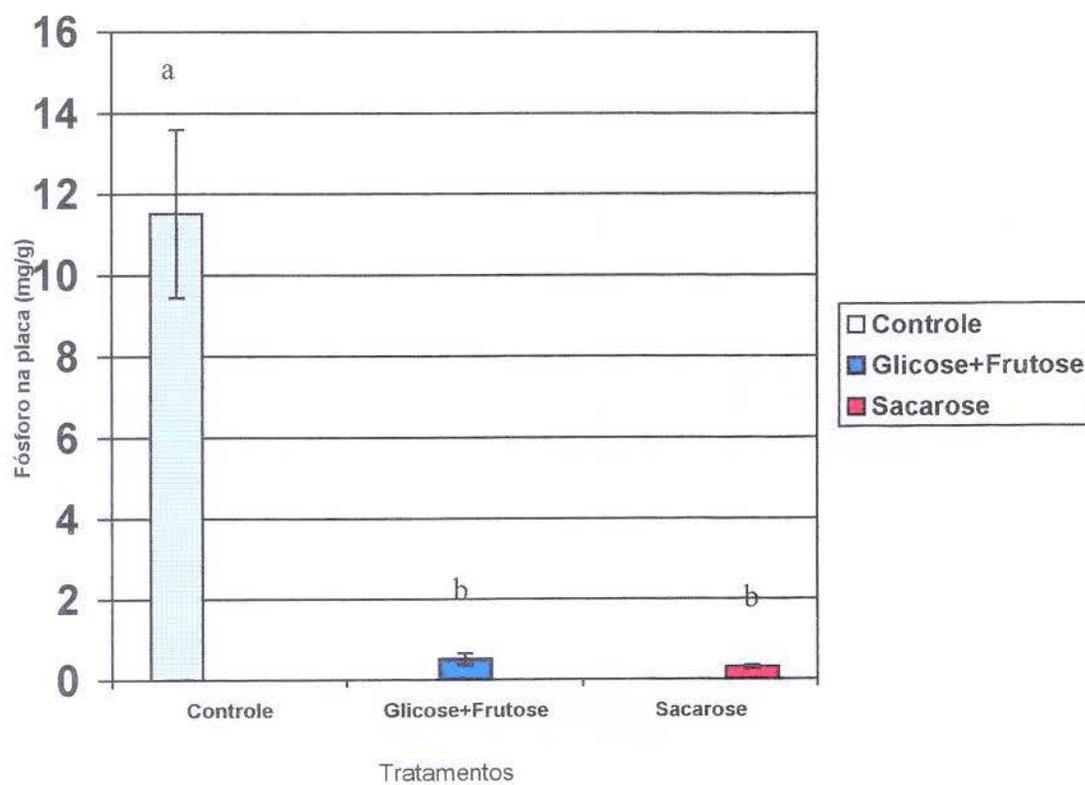


Figura 8 - Médias e erro padrão da média das concentrações de fósforo na placa dental, em função dos tratamentos e significâncias estatísticas.

#### 5.4 – Concentração de Cálcio na Placa Dental

A seguir são expressas as médias e os respectivos desvios padrão da concentração de cálcio na placa dental por tratamento.

Tabela IV– Médias e erro padrão da média das concentrações de cálcio na placa dental, em função dos tratamentos (Controle, Glicose+Frutose e Sacarose).

Tratamentos	mg Ca / g
Controle	17,03 ± 2,75 a
Glicose + Frutose	1,86 ± 0,69 b
Sacarose	0,65 ± 0,08 b

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

Verificou-se que os tratamentos sacarose e glicose+ frutose não diferiram entre si de uma maneira significativa ( $p>0,05$ ), apesar da menor média de concentração de cálcio ter sido encontrada no tratamento sacarose. Entretanto, os tratamentos sacarose e glicose+frutose foram estatisticamente diferentes do grupo controle ( $p<0,05$ ), o qual apresentou a maior média de concentração de cálcio na placa dental. Os resultados estão ilustrados na figura 9.

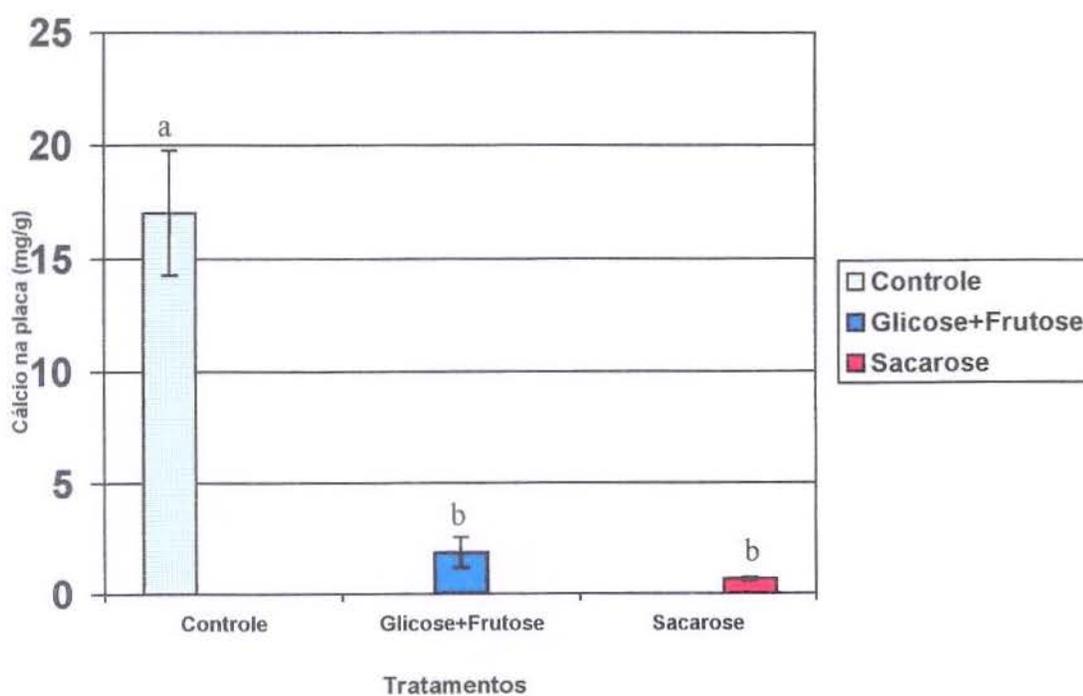


Figura 9 - Representação das médias das concentrações de cálcio na placa dental em função dos tratamentos e significâncias estatísticas.

### 5.5- Concentração de Carboidrato da Placa Dental Solúvel em Ácido

A seguir são apresentadas as médias e os respectivos desvios padrão da concentração de carboidrato solúvel da placa dental em ácido por tratamento.

Tabela V – Médias e erro padrão da média das concentrações de carboidrato solúvel em ácido na placa dental, em função dos tratamentos (Controle, Glicose+Frutose e Sacarose).

Tratamentos	mg / g
Controle	3,80 ± 0,62 a
Glicose + Frutose	10,37 ± 2,61 a b
Sacarose	14,42 ± 3,67 b

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

Verificou-se que os tratamentos sacarose e glicose+ frutose não diferiram entre si de uma maneira significativa ( $p > 0,05$ ), apesar da maior média de concentração de carboidrato solúvel em ácido ter sido encontrada no tratamento sacarose que por sua vez diferiu do grupo controle ( $p < 0,05$ ). Por outro lado, o tratamento glicose+frutose não diferiu estatisticamente do tratamento sacarose e do grupo controle ( $p > 0,05$ ), apesar deste último ter apresentado na placa dental a menor média de concentração de carboidrato solúvel em ácido. Estes dados estão ilustrados na figura 10.

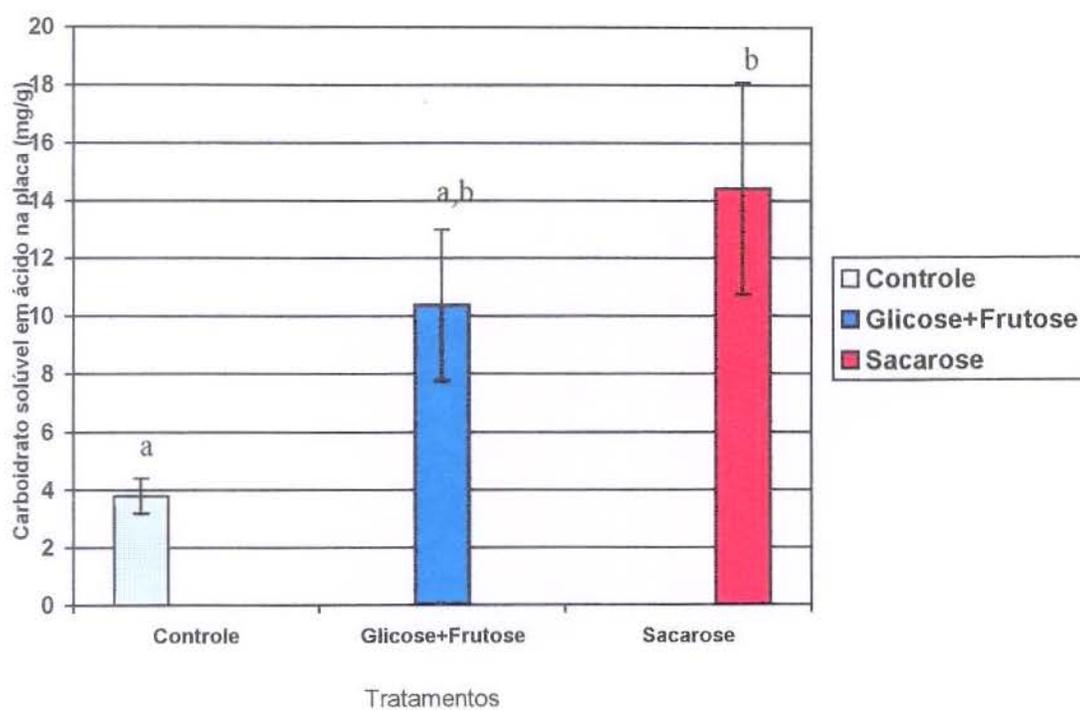


Figura 10 - Representação das médias das concentrações de carboidrato solúvel em ácido na placa dental em função dos tratamentos e significâncias estatísticas.

## 5.6 – Concentração de Carboidrato da Placa Dental Solúvel em Álcali

A seguir estão expressas as médias e os respectivos desvios padrão da concentração de carboidrato na placa dental solúvel em álcali em função dos tratamentos.

Tabela VI – Médias e erro padrão da média das concentrações de polissacarídeos solúveis em álcali na placa dental, em função dos tratamentos (Controle, Glicose+Frutose e Sacarose).

Tratamentos	mg / g
Controle	6,52 ± 1,04 a
Glicose + Frutose	11,83 ± 1,86 a
Sacarose	35,03 ± 7,84 b

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

Verificou-se que o tratamento sacarose diferiu significativamente dos tratamentos glicose+frutose e controle ( $p < 0,05$ ). O tratamento glicose+frutose não diferiu estatisticamente do grupo controle. Estes dados estão ilustrados na figura 11.

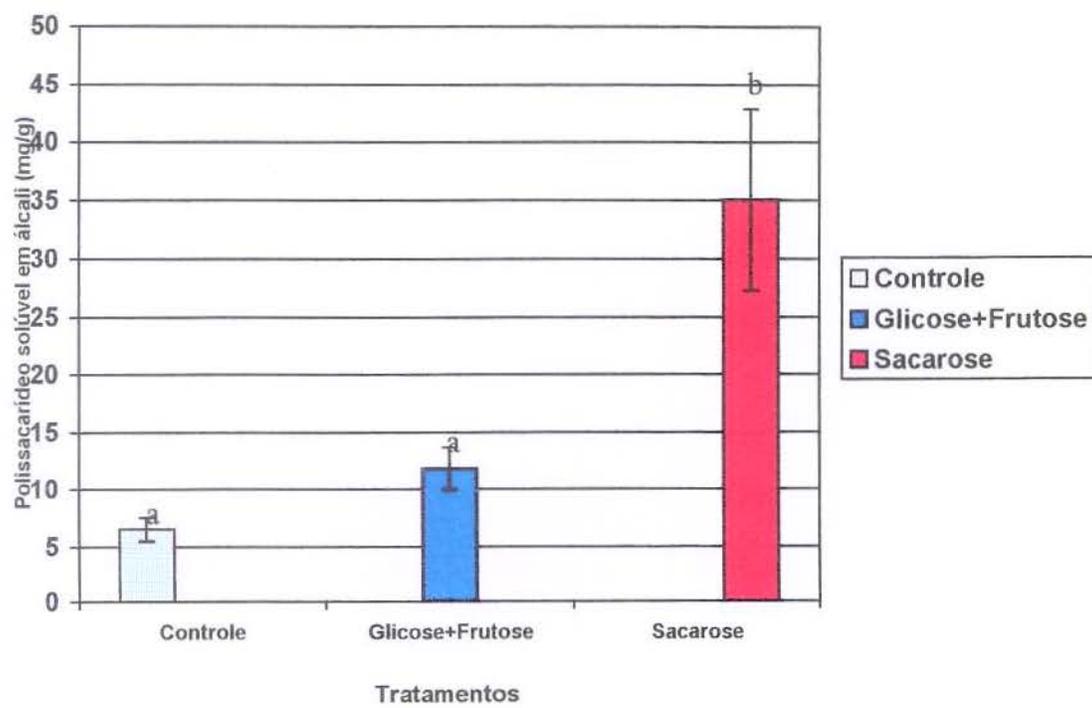


Figura 11 - Representação das médias das concentrações de carboidrato solúvel em álcali na placa dental em função dos tratamentos e significâncias estatísticas.

### 5.7 – Concentração de Proteínas na Placa Dental

A seguir são apresentadas as médias e os respectivos desvios padrão da concentração de proteína da placa dental, extraída com NaOH 0,1 N / 1mM EDTA, de acordo com os tratamentos.

Tabela VII – Médias e erro padrão da média das concentrações de proteína na placa dental, em função dos tratamentos (Controle, Glicose+Frutose e Sacarose).

Tratamentos	mg %
Controle	2,25 ± 0,09 a
Glicose + Frutose	1,50 ± 0,18 b
Sacarose	1,44 ± 0,20 b

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

Verificou-se que os tratamentos sacarose e glicose+ frutose não diferiram entre si de uma maneira significativa ( $p > 0,05$ ). Por outro lado, os tratamentos glicose+frutose e sacarose diferiram estatisticamente do grupo controle ( $p < 0,05$ ). Estes dados estão ilustrados na figura 12.

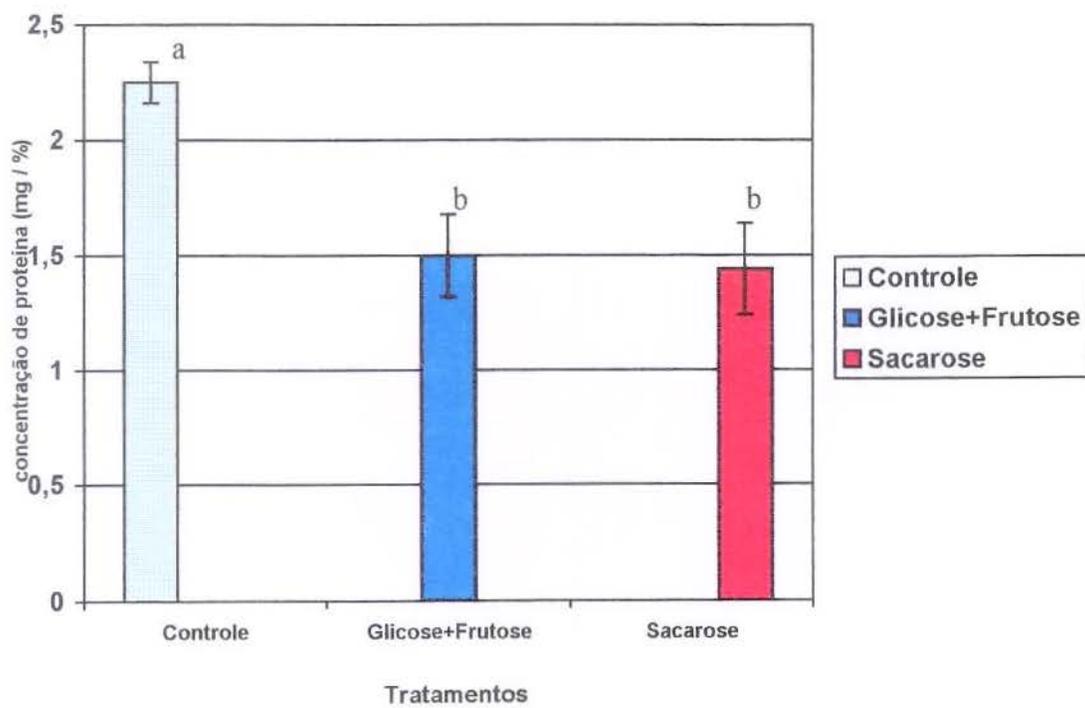


Figura 12 - Representação das médias das concentrações de proteína na placa dental em função dos tratamentos e significâncias estatísticas.

## **5.8 – Eletroforese das Proteínas da Placa Dental e Saliva**

### **5.8.1 Perfis Protéicos das Eletroforeses**

Na figura 13 pode ser vista a eletroforese das proteínas em um dos cruzamentos realizados.

Figura 13 - Fotografia do gel poliacrilamida referente a eletroforese de proteínas da matriz da placa dental em diferentes tratamentos e voluntários. As letras brancas significam os tratamentos ( “c” = controle, “gf” = glicose + frutose e “s” = sacarose ) e em preto os códigos dos voluntários.

Diagramas totais por tratamento podem ser consultados no apêndice. No grupo controle (C) observou-se no perfil dos géis uma média de 14,5 bandas ( com variação de 9 a 21), a predominância de bandas foi na região Rm 0,18-0,41 ( PM 29.00 a 66.000 ), sugerindo proteínas de alto peso molecular, enquanto que na região de Rm 0,70 (PM 14.200 ) observou-se uma região difusa, sugerindo peptídeos de baixo peso molecular. No grupo glicose+frutose observou-se uma média de 8,7 bandas (com variação de 6-14), sendo predominante na região entre os Rms de 0,16-0,28 ( PM 45.000 a 66.000 ); entre os Rms 0,36-0,41 e à altura do Rm 0,70 ( PM 14.200 a 29.000) visualizou-se bandas difusas de menor intensidade de coloração em relação do grupo controle. No grupo sacarose o número de bandas observado foi em média 8 (variação de 12-12), houve uma diminuição de bandas na região de Rm 0,41 ( PM 29.000 ) e ausência de bandas na região de Rm 0,70 ( PM 14.200 ). Em acréscimo, a intensidade da coloração das bandas observadas nos diferentes grupos foi : controle > glicose + frutose > sacarose. De uma forma geral, é visível a mudança do perfil protéico nos 3 tratamentos.

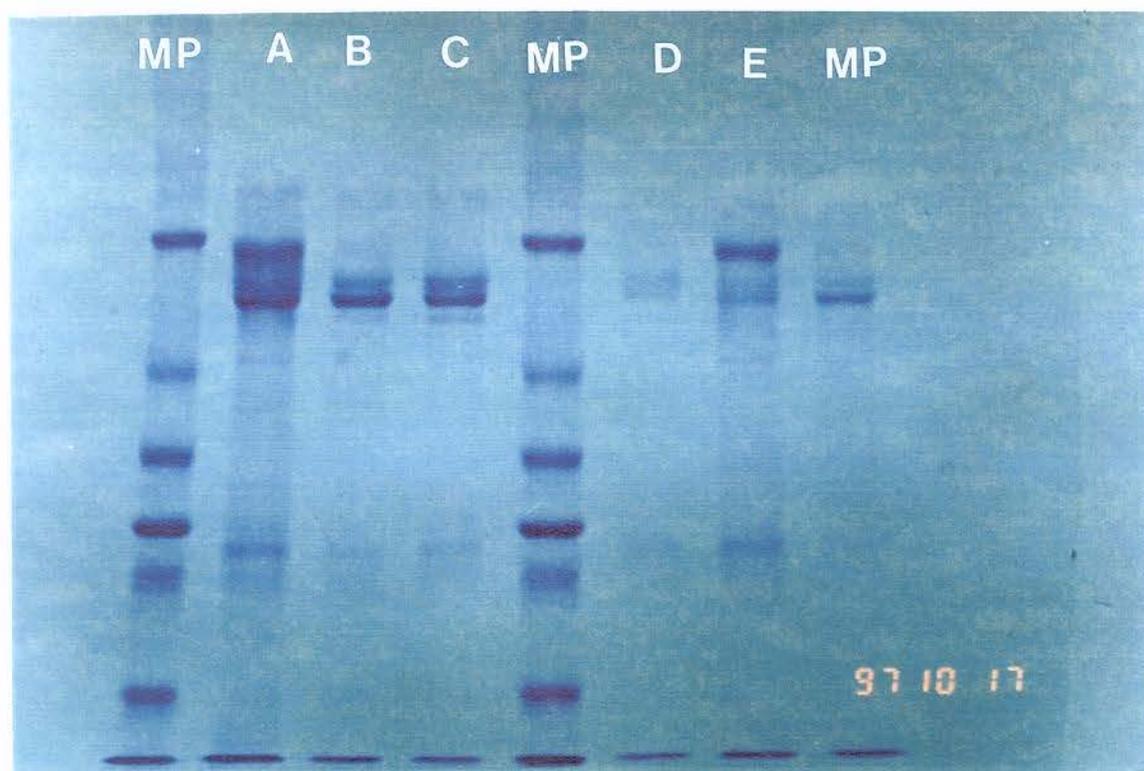


Figura 14 - Fotografia do gel poliacrilamida referente a eletroforese de proteínas da saliva dos voluntários A, B, C, D, E, F e mistura padrão ( MP ).

Na eletroforese das salivas dos voluntários foram visualizadas de 9 a 18 bandas (média de 11), distribuídas entre os Rm de 0,18 a 0,70 (PM 14.000 a 66.000). No apêndice 14 pode ser encontrado em diagrama estes perfis proteicos. A concentração de proteínas na saliva dos voluntários consta no apêndice 13.

### 5.82. Diagramas Comparativos

Tendo em vista o fato da variação individual na concentração de proteínas dos extratos da placa e da saliva, são apresentados a seguir diagramas representativos do perfil eletroforético das proteínas de 03 voluntários cujas concentrações foram próximas.

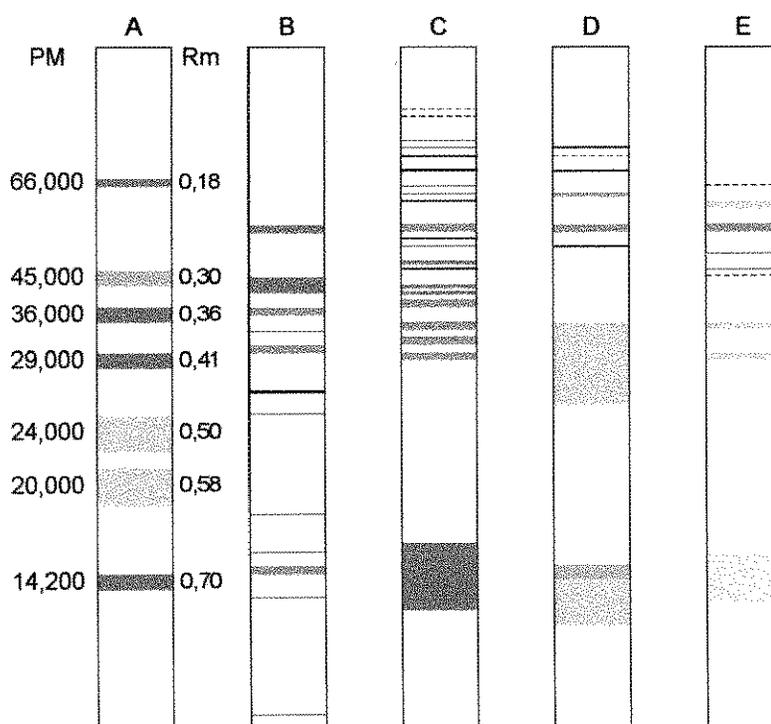


Figura 15 – Diagramas dos perfis proteicos dos géis de poliacrilamida. Na primeira coluna (A) temos a mistura padrão (MP) com seus respectivos pesos moleculares (PM) e mobilidade relativa (Rm) seguida da eletroforese da saliva e placa dental nos tratamentos controle (C), glicose+frutose (D) e sacarose (E) do voluntário E.

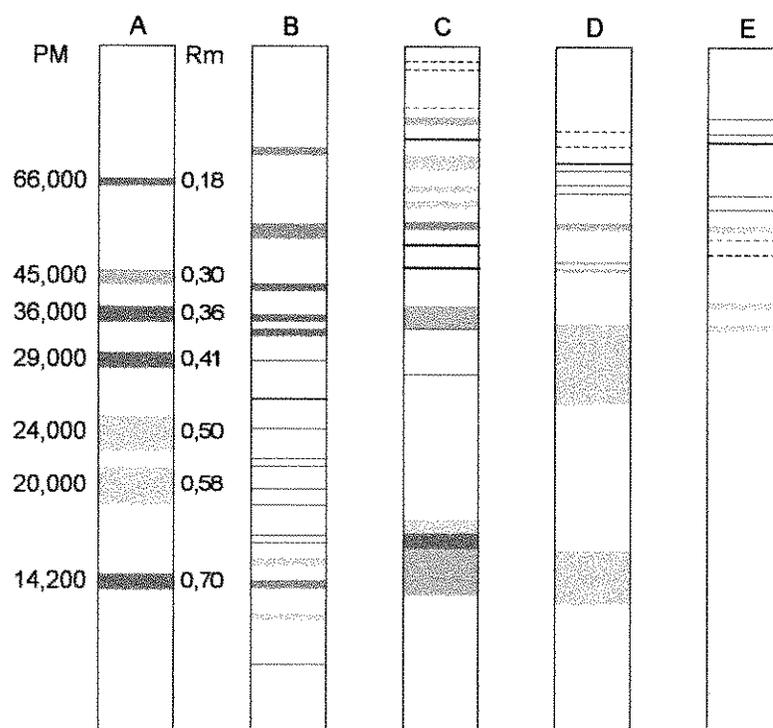


Figura 16 – Diagramas dos perfis proteicos dos géis de poliacrilamida. Na primeira coluna (A) temos a mistura padrão (MP) com seus respectivos pesos moleculares (PM) e mobilidade relativa (Rm) seguida da eletroforese da saliva e placa dental nos tratamentos controle (C), glicose+frutose (D) e sacarose (E), voluntário H.

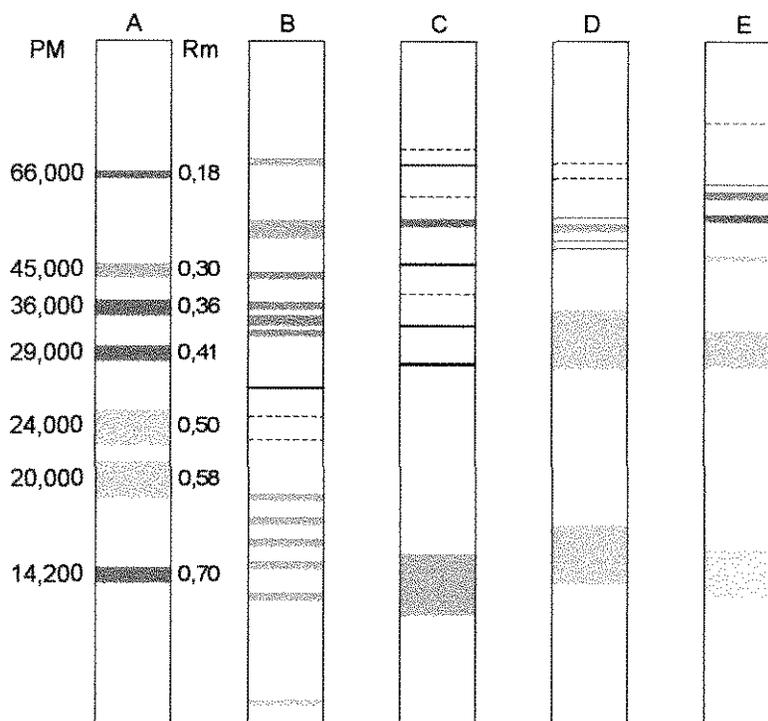


Figura 17 – Diagramas dos perfis proteicos dos géis de poliacrilamida. Na primeira coluna (A) temos a mistura padrão (MP) com seus respectivos pesos moleculares (PM) e mobilidade relativa (Rm) seguida da eletroforese da saliva e placa dental nos tratamentos controle (C), glicose+frutose (D) e sacarose (E), voluntário J.

A análise comparativa destes 03 diagramas mostra diferenças substanciais nos perfis proteicos das placas dentais formadas na ausência e presença de glicose+frutose ou sacarose.

## 5.9 – Avaliação Qualitativa da Cárie Dental

A seguir são apresentadas as fotografias dos blocos de esmalte após os tratamentos controle, glucose+frutose e sacarose.



Figura 18 – Aspectos de blocos de esmalte dental referentes ao grupo controle após 28 dias de acúmulo de placa.

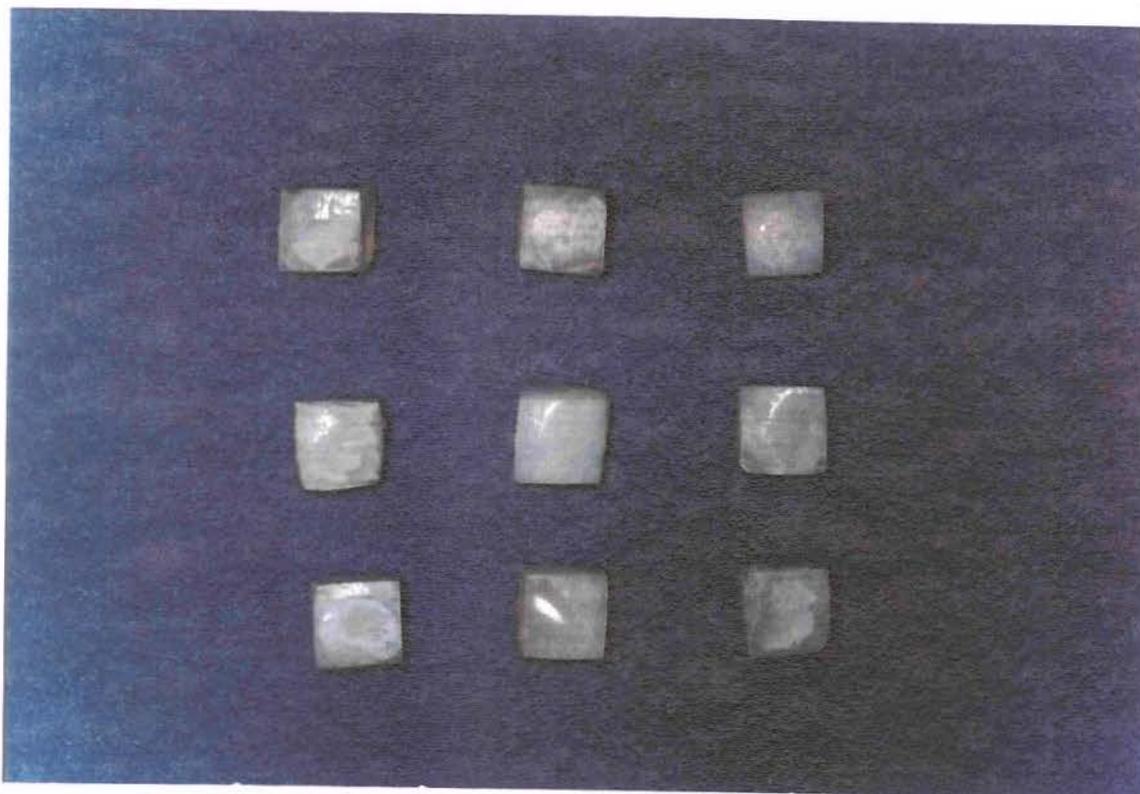


Figura 19 – Aspectos de blocos de esmalte referentes ao grupo glucose+frutose após 28 dias de acúmulo de placa.



Figura 20 – Aspectos de blocos de esmalte dental referentes ao grupo sacarose após 28 dias de acúmulo de placa.

A tabela VIII sintetiza as observações das figuras 18, 19 e 20 .

Tabela VIII - Avaliação clínica dos blocos de esmalte após os tratamentos

Tratamentos	Número de blocos examinados	Blocos com perda	
		mineral visível (Mancha Branca)	Blocos clinicamente Íntegros
Controle	48	0	48
Glicose +Frutose	48	27	21
Sacarose	48	43	05
Total	144	70	74

Foram examinados 144 blocos de esmalte, sendo 48 em cada grupo de tratamento. Com relação ao grupo controle podemos observar, em todos os blocos, o não desenvolvimento de cárie clinicamente visível, enquanto que os grupos que utilizaram glicose + frutose e sacarose apresentaram, respectivamente, 56,25% e 89,58% dos blocos com perda visível de minerais (mancha branca).

## 5.10 – Microdureza de Superfície do Esmalte

A seguir são apresentadas a média da porcentagem de perda de dureza superficial (% PDS) quando da análise de microdureza superficial de esmalte (Dureza em Knoop), obtida através da comparação da microdureza prévia (esmalte íntegro) e a microdureza avaliada após os tratamentos.

Tabela IX – Médias e erro padrão da média da porcentagem de perda da dureza dos blocos de esmalte, em função dos tratamentos (Controle, Glicose+Frutose e Sacarose).

Tratamentos	% PDS
Controle	3,35 ± 0,68 a
Glicose + Frutose	44,20 ± 7,21 b
Sacarose	73,37 ± 6,92 c

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

Verificou-se que os tratamentos controle, sacarose e glicose+ frutose diferiram entre si de uma maneira significativa ( $p < 0,05$ ). Estes resultados estão ilustrados nas figuras 21 a 24.

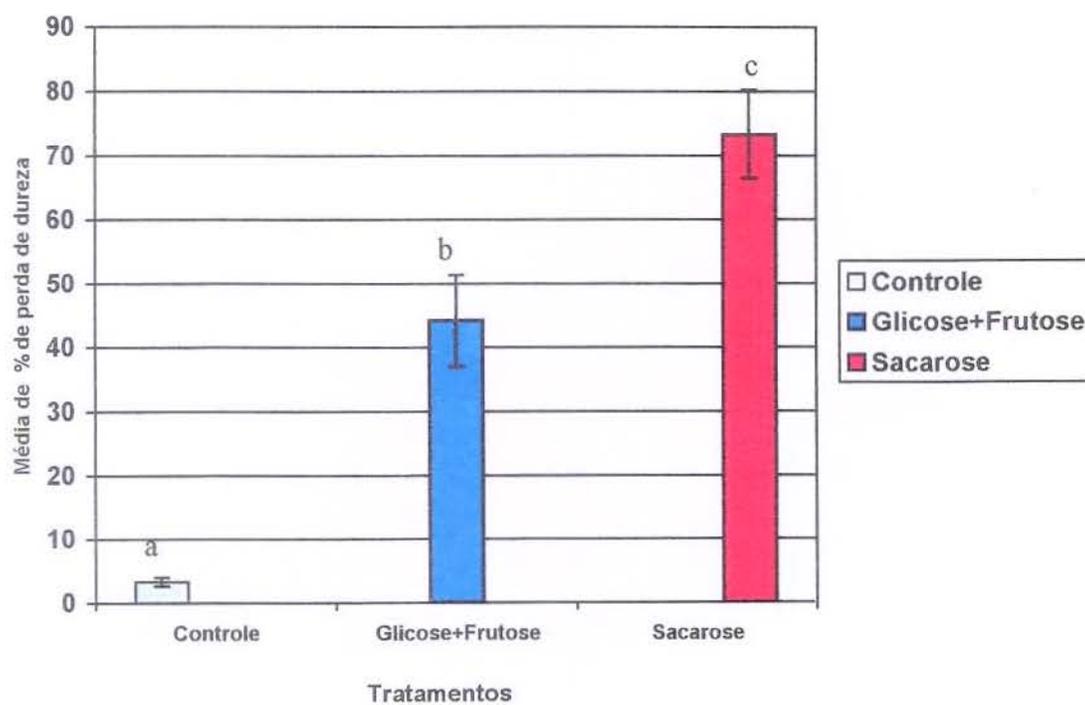


Figura 21 - Representação das médias de porcentagem de perda de dureza dos blocos de esmalte em função do tratamento e significâncias estatísticas.



Figura 22 – Aspecto microscópico (50x) do esmalte dental do grupo controle e as impressões realizadas. 1- Marca de referência (100 g); 2- Dureza inicial; 3 e 4- Dureza após o tratamento



Figura 23 – Aspecto microscópico (50x) do esmalte dental do grupo glicose+frutose e as impressões realizadas. 1- Marca de referência (100 g); 2- Dureza inicial; 3 e 4- Dureza após o tratamento

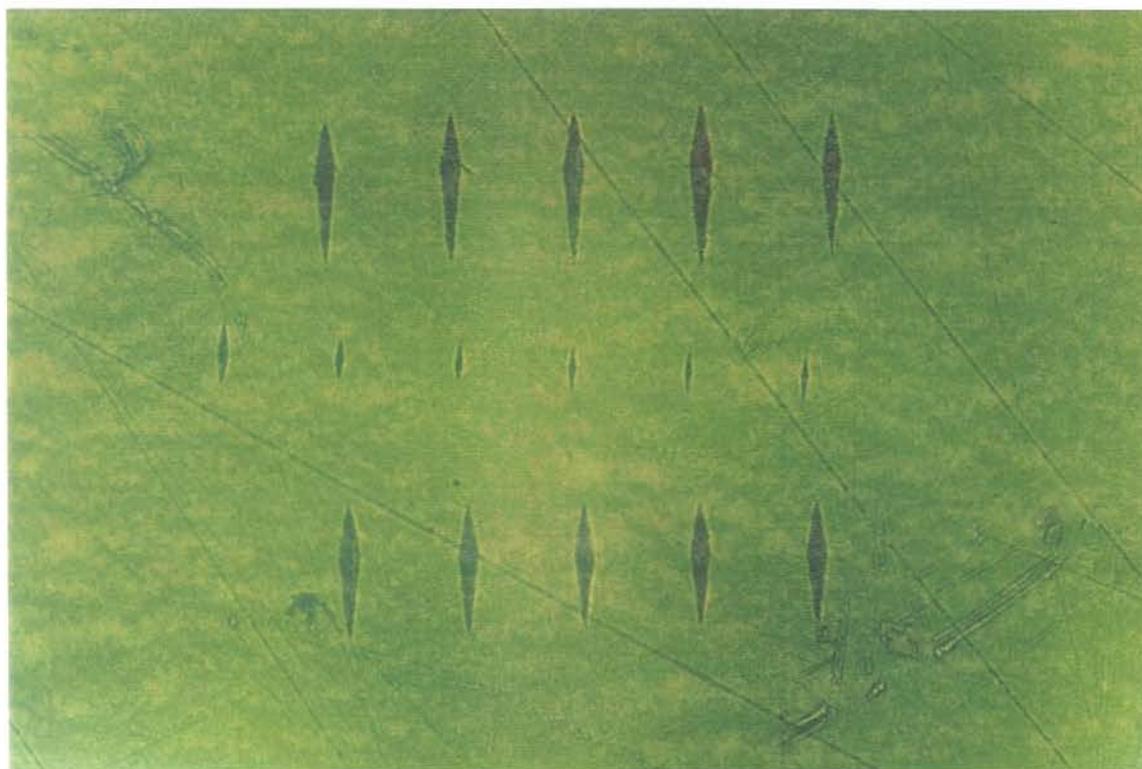


Figura 24 – Aspecto microscópico (50x) do esmalte dental do grupo sacarose e as impressões realizadas. 1- Marca de referência (100 g); 2- Dureza inicial; 3 e 4 - Dureza após o tratamento

### 5.11 – Análise de Microdureza Interna do Esmalte

A seguir são apresentadas as média da microdureza interna do esmalte (Dureza em Knoop), obtida em função da distância da superfície e a área integrada com relação aos tratamentos.

Tabela X – Médias e erro padrão da média da microdureza interna do esmalte a distância ( $\mu\text{m}$ ) da superfície e área integrada, em função dos tratamentos (Controle, Glicose+Frutose e Sacarose).

Distância em $\mu\text{m}$ da superfície / Área integrada	Tratamentos	Média/EP
20	Controle	324,69 $\pm$ 8,46 a
	Glicose + Frutose	143,01 $\pm$ 25,63 b
	Sacarose	78,94 $\pm$ 23,57 c
40	Controle	338,05 $\pm$ 5,88 a
	Glicose + Frutose	198,29 $\pm$ 31,28 b
	Sacarose	103,60 $\pm$ 29,83 c
60	Controle	341,36 $\pm$ 4,01 a
	Glicose + Frutose	255,28 $\pm$ 29,88 b
	Sacarose	160,33 $\pm$ 32,95 c
80	Controle	337,97 $\pm$ 6,08 a
	Glicose + Frutose	296,65 $\pm$ 26,34 a
	Sacarose	203,03 $\pm$ 36,43 b
100	Controle	341,71 $\pm$ 5,04 a
	Glicose + Frutose	312,22 $\pm$ 24,74 a
	Sacarose	231,67 $\pm$ 35,17 b
Área Integrada (KHN x $\mu\text{m}$ )	Controle	27021,73 $\pm$ 394,15 a
	Glicose + Frutose	20159,50 $\pm$ 2213,40 b
	Sacarose	12414,39 $\pm$ 2419,43 c

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

Na análise de microdureza interna do esmalte foi encontrada diferença significativa entre os tratamentos em todas as distâncias avaliadas, assim como na área integrada ( $p<0,05$ ). Com relação as distâncias de 20, 40 e 60  $\mu\text{m}$  foi encontrada diferença significativa entre os três tratamentos ( $p<0,05$ ), sendo a menor média do tratamento sacarose, diferindo dos tratamentos glicose+frutose e controle que por sua vez diferiram entre si. Nas distâncias de 80 e 100  $\mu\text{m}$  o tratamento sacarose diferiu do tratamento glicose+frutose e controle, porém estes últimos não diferiram entre si. Quanto a área integrada a menor média foi observada com tratamento sacarose que diferiu significativamente do tratamento glicose+frutose e controle, os quais diferiram significativamente entre si. Estes resultados estão ilustrados nas figuras 25 a 27.

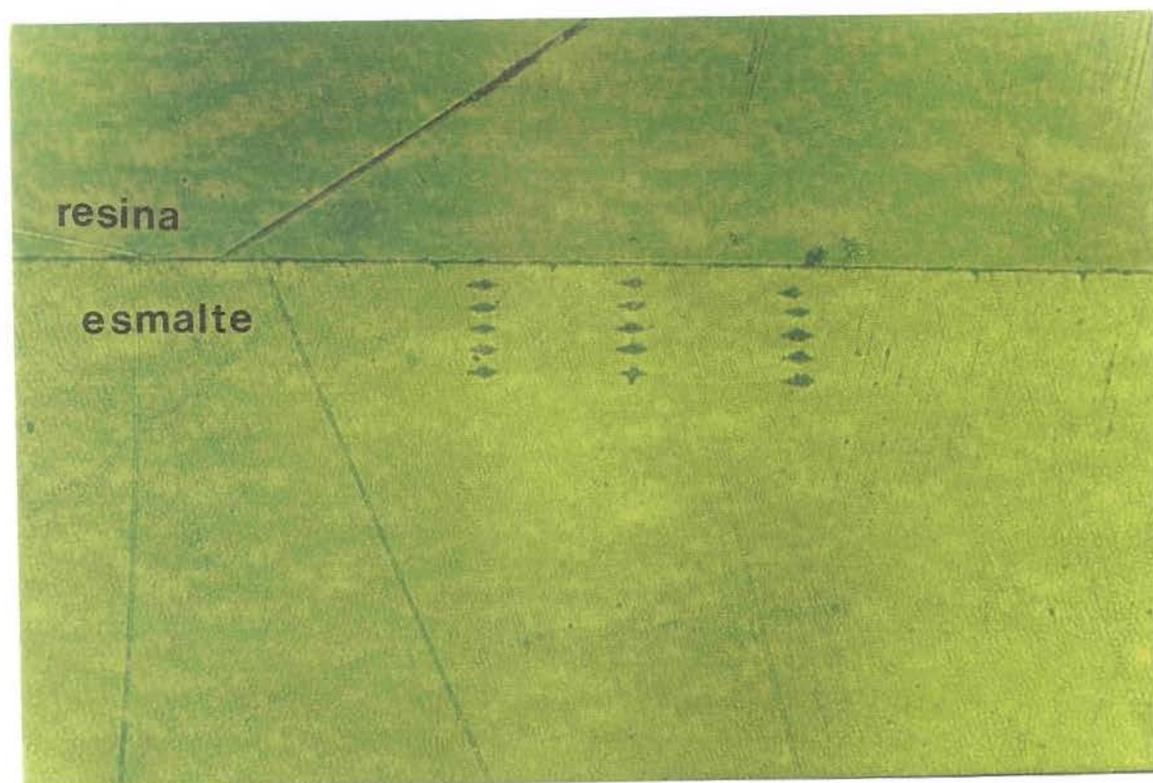


Figura 25 – Aspecto microscópico (50x) da secção do esmalte dental do grupo controle e as impressões realizadas.

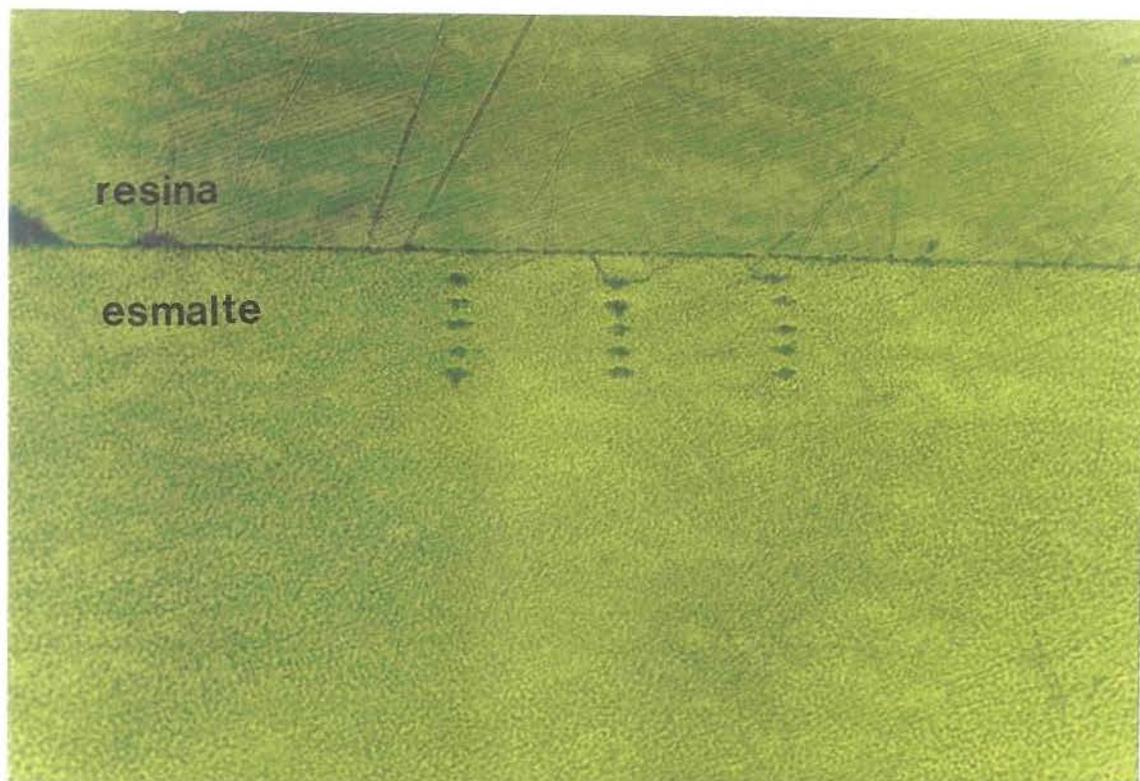


Figura 26 – Aspecto microscópico (50x) da secção do esmalte dental do grupo glicose+frutose e as impressões realizadas.

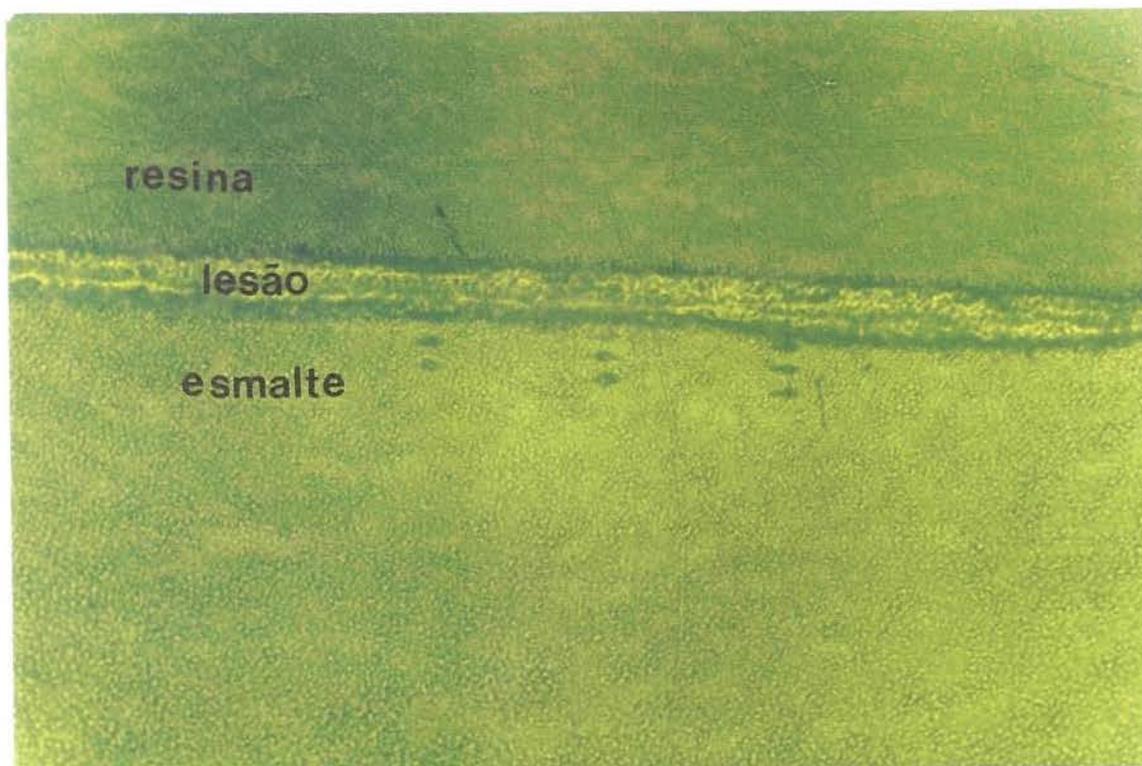


Figura 27 – Aspecto microscópico (50x) da secção do esmalte dental do grupo sacarose e as impressões realizadas.

## 5.12 – Concentração de Flúor no Esmalte Dental

A seguir estão os resultados da concentração de flúor no esmalte dental.

Tabela XI – Médias e erro padrão da média da concentração de flúor no esmalte e área sob a curva, em função da distância (média  $\pm$  dp) da superfície do esmalte ( $\mu\text{m}$ ), por tratamento (Controle, Glicose+Frutose e Sacarose).

Distância em $\mu\text{m}$ da superfície / Área integrada	Tratamentos	Média/E.P.
12,9 $\pm$ 0,39	Controle	2847,76 $\pm$ 307,63 a
	Glicose + Frutose	3811,98 $\pm$ 249,88 b
	Sacarose	4060,70 $\pm$ 241,28 b
24,5 $\pm$ 1,19	Controle	1629,49 $\pm$ 153,51 b
	Glicose + Frutose	1859,71 $\pm$ 163,11 b
	Sacarose	2112,47 $\pm$ 154,13 b
36,9 $\pm$ 2,04	Controle	1278,04 $\pm$ 124,25 b
	Glicose + Frutose	1226,02 $\pm$ 111,11 b
	Sacarose	1433,04 $\pm$ 12510 b
60,6 $\pm$ 3,23	Controle	748,90 $\pm$ 58,67 b
	Glicose + Frutose	735,01 $\pm$ 74,22 b
	Sacarose	849,20 $\pm$ 90,98 b
83,8 $\pm$ 4,87	Controle	543,35 $\pm$ 38,30 b
	Glicose + Frutose	505,24 $\pm$ 59,72 b
	Sacarose	607,47 $\pm$ 77,13 b
Área Sob a Curva (ppm F x $\mu\text{m}$ )	Controle	88057,96 $\pm$ 8002,17 b
	Glicose + Frutose	97821,06 $\pm$ 6870,92 b
	Sacarose	110100,34 $\pm$ 7784,98 b

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

Nas concentrações de flúor no esmalte foi observada diferença significativa apenas na primeira camada na qual, o tratamento sacarose não diferiu do tratamento glicose+frutose e ambos diferiram do controle ( $p < 0,05$ ). Os resultados estão ilustrados na figura 28.

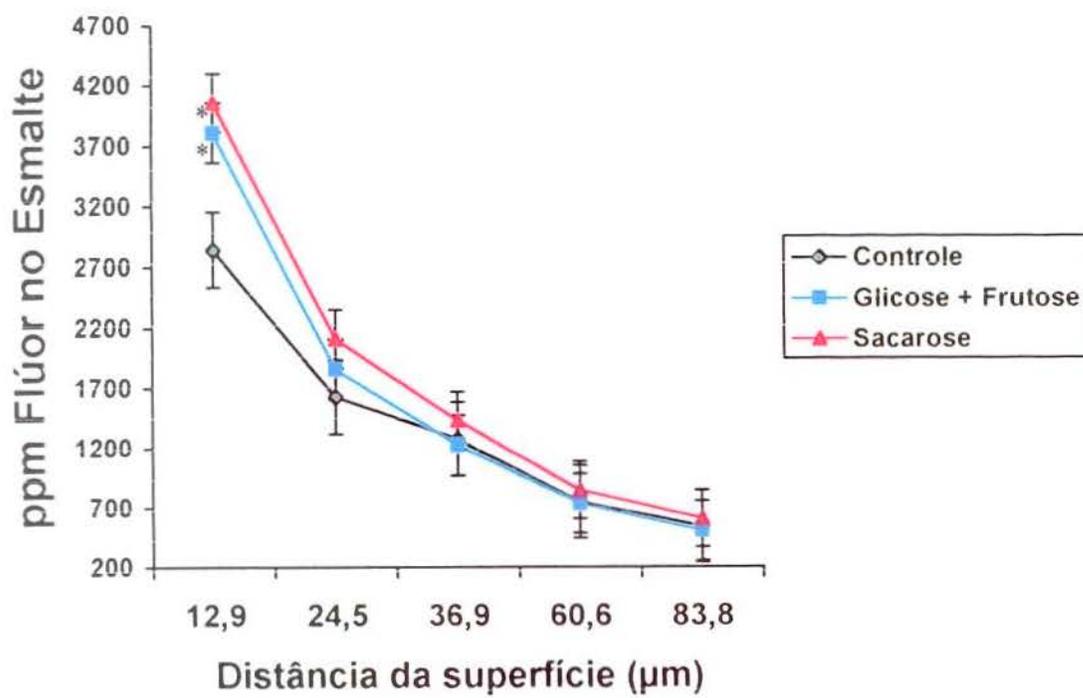


Figura 28 - Média dos valores da concentração do flúor em função da distância da superfície do esmalte (\* Estatisticamente diferentes do controle, mas não entre si).

## 6- DISCUSSÃO

O desenvolvimento da cárie envolve uma série de eventos em um biofilme chamado de placa dental, onde as interações bacterianas entre si e com a superfície dental, as mudanças ecológicas provocadas pela dieta, os aspectos físico-químicos inerentes ao processo e a composição e propriedades da matriz da placa são desafiantes para quem faz pesquisa. De acordo com BURNE ( 1998 ), somente a integração entre a genética molecular, a bioquímica e fisiologia dos microrganismos e a físico-química poderão esclarecer os eventos que ocorrem nesses biofilmes determinando ou não sua patogenicidade.

Os resultados do presente trabalho mostram que tanto a placa dental formada na presença constante de sacarose como a formada quando da alta frequência da mistura dos seus monossacarídeos componentes ( glicose + frutose ) foram mais cariogênicas que o controle. Isso foi observado qualitativamente ( Fig. 18, 19 e 20 e Tab. VIII ) e comprovado quantitativamente pela análise de microdureza superficial ( Tab. IX ) e interna ( Tab. X ) do esmalte dental. Ao mesmo tempo, constatou-se que a placa formada na presença de sacarose foi mais cariogênica que a decorrente da exposição a glicose+frutose. A comparação dos resultados obtidos no presente trabalho com os da literatura não é possível de uma maneira direta, pois esta trata-se da primeira pesquisa *in situ* de longa duração com um delineamento experimental específico. O único trabalho encontrado na literatura que comparou o efeito da sacarose vs. glicose+frutose foi feito em macacos por COLMAN et al. (1977). Os autores concluíram que, embora sacarose tivesse manifestado maior cariogenicidade que frutose, a mistura equimolecular de glicose+frutose foi mais cariogênica que a sacarose. Segundo os referidos autores, sacarose não teria atributos químicos próprios que contribuiriam para sua maior cariogenicidade. A aparente discrepância dos resultados desse trabalho com o presente pode ser explicada pelo fato de que autores não utilizaram soluções puras dos carboidratos, sendo eles misturados com os alimentos. Os outros trabalhos da literatura têm comparado sacarose com outros monossacarídeos, mas não com a mistura glicose+frutose. Assim, EDWARDSON & KRASSE, em 1967, mostraram em hamster que sacarose foi mais cariogênica que glicose, sendo confirmado por HORTON (1985) em ratos. Por outro lado, o primeiro estudo em humanos parece ter sido feito por KOULORIDES et al., em 1976 . Esses autores

desenvolveram um dispositivo intra-oral para estudos *in situ* (ICT) e demonstraram que glicose, frutose ou sacarose tinham a mesma capacidade de provocar desmineralização do esmalte dental. Esse resultado aparentemente discrepante foi justificado pelo não controle da dieta dos voluntários, a qual poderia ser rica em sacarose, mascarando o efeito do teste. Até este período o maior potencial cariogênico da sacarose era atribuído à formação de dextranos e conseqüente maior adesão bacteriana (GIBBONS & BANGHARDT, 1967). Portanto, maior quantidade de placa do que mudanças na sua qualidade induzidas por sacarose era levada em consideração. Em acréscimo, mesmo trabalhos mais recentes que não têm encontrado diferença de desmineralização do esmalte comparando glicose, frutose e sacarose devem ser analisados criticamente. Assim, BRUDEVOLD et al. (1983), utilizando um modelo *in situ* no qual uma massa de cultura de bactérias foi colocada sobre blocos de esmalte (placa experimental), mostraram que uma exposição a soluções de glicose, frutose ou sacarose tinha a mesma capacidade de desmineralizar o esmalte. O resultado não é contraditório, pois os autores apenas avaliaram a acidogenicidade destes carboidratos, os quais são fermentados pelas bactérias em velocidade semelhante. Segundo CHARLTON et al. (1971), fatores outros que não a acidogenicidade devem explicar as diferentes capacidades cariogênicas entre sacarose e glicose ou frutose.

Assim, os resultados do presente trabalho mostram que uma dieta com carboidratos fermentáveis ( sacarose ou a mistura glicose + frutose ) provoca a formação de um biofilme cariogênico em relação à placa formada na ausência de açúcares ( grupo controle ). Por outro lado, os biofilmes formados na presença de sacarose ou glicose + frutose mostraram diferentes potenciais cariogênicos, o que deve estar relacionado com a composição das respectivas placas dentais formadas.

Deste modo, a tabela I mostra que as diferenças começam com a quantidade de placa formada. A princípio, deveria se esperar, do ponto de vista energético, uma mesma quantidade de placa formada na presença de sacarose ou glicose + frutose, sendo menor na ausência de açúcares devido a uma limitação de nutrientes calóricos. A maior quantidade de placa formada na presença de sacarose pode ser explicada pela síntese de polissacarídeos extracelulares decorrentes da variação de energia livre da hidrólise da sacarose pela ação de glicosiltransferases ( GUGGENHEIN, 1970, GIBBONS & van HOUTE, 1973 , JENKINS, 1978 , CARLSSON, 1986 , RÖLLA et al. 1985 ). Essa maior quantidade de placa formada na presença de sacarose está de acordo com CARLSSON & SUNDSTROM (1968) e SCHEININ & MAKINEN (1971), quando compararam com a placa formada na presença de glicose ou frutose. De fato, a tabela VI mostra que na

presença de sacarose observou-se na placa dental uma maior quantidade de polissacarídeos solúveis em álcali do que quando da exposição à glicose + frutose.

Como decorrência de uma maior quantidade de placa por área, o biofilme formado na presença de sacarose é mais espesso do que o formado na presença de glicose + frutose o que por si só explicaria o maior desenvolvimento de cárie, conforme tem sido demonstrado em estudos anteriores ( MELLBERG et al., 1990). Entretanto, na presença de sacarose, as bactérias sintetizam polissacarídeos extracelulares que modificariam a qualidade da placa tornando-a mais cariogênica.

Assim, DIBDIN & SHELLIS (1988 ) sugeriram que uma placa formada na presença de sacarose seria mais cariogênica devido à maior porosidade da sua matriz extracelular em função da presença de polissacarídeos . Deste modo, os substratos se difundiriam facilmente por esta placa atingindo a interface dente-placa onde seriam fermentados a ácidos com grandes quedas de pH ( ZERO et al., 1986; FU et al., 1991). Porém, a maior cariogenicidade de uma placa formada na presença de sacarose foi demonstrada com culturas bacterianas crescidas em meio suplementado ou não deste dissacarídeo. Assim, ZERO et al. (1992) comprovaram com placa experimental que havia uma maior desmineralização do esmalte sob placa rica em glucanos extracelulares (bactéria crescida em meio contendo sacarose), do que na sua ausência. Por outro lado, de acordo com ZERO (1993), pouco é conhecido sobre as respostas biológicas ocorrendo em uma comunidade heterogênea como a placa dental.

No presente trabalho os biofilmes foram formados *in situ* no meio ambiente bucal. Assim, na placa dental formada na presença de sacarose (Tab. VI ) observou-se 5,4x mais carboidratos solúveis em álcali (polissacarídeos extracelulares ) que o controle e 3,0x mais que a formada na presença de glicose+frutose. Deste modo, enquanto a maior perda de mineral do esmalte sob a placa formada na presença de glicose+frutose em relação ao controle seria explicada pela manutenção de um pH baixo decorrente da simples fermentação destes monossacarídeos, a maior cariogenicidade da sacarose seria atribuída a um sinergismo da maior produção de ácidos na interface dente-placa devido a maior porosidade da placa e conseqüente difusão deste carboidrato fermentável através da matriz de polissacarídeos.

Os resultados do presente trabalho, quando se compara o grupo controle e a placa formada na presença de sacarose, estão de acordo com CURY et al. (1997) . Estes autores mostraram que a placa formada na presença de exposição a sacarose 8x/dia apresentava maior concentração de carboidratos solúveis em álcali e desenvolveu cárie no

esmalte em relação ao controle. Entretanto, esses autores mostraram que na placa formada na presença de sacarose havia também uma diminuição significativa das concentrações de Ca, P e F, o que poderia ser um fator adicional para explicar a maior cariogenicidade deste dissacarídeo.

Os resultados atuais comprovam os anteriores, constatando-se concentrações menores e estatisticamente significativas de Ca, P e F na placa formada na presença de sacarose em relação ao controle (Tabs. II, III e IV). Essas concentrações menores destes minerais poderiam ser decorrentes das estruturas das placas formadas ou do simples processo fermentativo da sacarose. Assim, no presente trabalho, foi utilizada solução de glicose+frutose, as quais são apenas fermentáveis, enquanto sacarose, além de ser fermentável, é transformada em polissacarídeos extracelulares tipo glucanos. O presente trabalho mostrou (Tabs. II, III e IV) que a placa formada na presença constante de glicose+frutose também apresenta menores concentrações de Ca, P e F que a formada na ausência de carboidratos ( $p < 0,05$ ). Por outro lado, embora na placa formada na presença de sacarose tenham sido observadas concentrações de Ca, P e F menores do que a formada na presença de glicose+frutose, as diferenças não atingiram nível de significância estatística. Estas menores concentrações de Ca e P em placas dentais têm sido relacionadas com maior exposição a carboidratos da dieta, particularmente sacarose, como tem sido relatado na literatura (ASHLEY, 1972; ASHLEY & WILSON, 1977a; WILSON & ASHLEY, 1988), embora não seja um consenso (SCHEININ & MAKINEN, 1971; GEDDES et al., 1978), mas foi confirmado experimentalmente por CURY et al. (1997).

Entretanto, ainda não há uma explicação para esta menor concentração de Ca, P e especificamente F quando a placa é exposta a carboidratos. Em primeiro lugar, deve ser diferenciada a placa que é formada quando da presença constante de carboidratos, da composição da placa logo após uma única exposição. Assim, quando sacarose é fornecida para uma placa, tem sido observado um aumento de Ca e P no fluido da mesma (KASHKET & YASKELL, 1990; RANKINE et al., 1996) os quais são provenientes principalmente do esmalte dental devido a uma dissolução ácida. No presente trabalho a placa foi analisada depois de 28 dias de formação quando da exposição a sacarose ou glicose+frutose 8x/dia. Portanto, a placa estava se formando ao mesmo tempo que era produzido ácido pela fermentação dos carboidratos. Portanto, a menor concentração de Ca, P e F encontrada pode ser decorrente da estrutura da mesma. Assim, é conhecido que o pH influencia a formação de agregados de proteínas salivares com Ca e P, sendo que pH altos favorecem a precipitação (KLEINBERG, 1970). Deste modo, devido à fermentação

constante da sacarose ou da glicose+frutose o pH baixo não favoreceria a formação de uma matriz protéica rica em Ca e P. Esta hipótese é plausível e encontra respaldo tanto na concentração de proteínas da matriz das placas (Tab. VII), como nos diferentes perfis protéicos encontrados (Fig. 13, 15, 16 e 17). Assim, a menor concentração de Ca e P na placa dental contribuiria para a cariogenicidade da placa formada na presença de glicose+frutose e para a maior cariogenicidade da formada na presença de sacarose.

Entretanto, ao mesmo tempo foi também observada uma menor concentração de F nas placas formadas na presença de sacarose ou glicose+frutose (Tab. II). Esta menor concentração poderia ser explicada primeiro pelo fato de que, durante a dinâmica do desenvolvimento da cárie, ao mesmo tempo que o dente perde minerais tipo apatita, ganha flúor na forma de fluorapatita (LARSEN & BRUNN, 1994). Isto tem respaldo na análise de flúor no esmalte quando concentrações maiores foram encontradas no esmalte sob as placas expostas continuamente a sacarose ou glicose+frutose (Tab. XI). Entretanto, como as placas dentais foram coletadas pelo menos 12h após a última exposição aos carboidratos, teria havido um tempo suficiente para a saliva novamente saturar a placa de flúor.

Por outro lado, embora não estatisticamente significativa, a concentração de flúor na placa formada na presença de sacarose foi menor do que a formada na presença de glicose+frutose. Este dado sugere que a matriz destas duas placas sejam diferentes, quer seja do ponto de vista quantitativo como qualitativo. Em termos quantitativos (Tabs VI e VII), enquanto a relação carboidrato solúvel em álcali/proteínas é de 788,7x na placa formada na presença de glicose +frutose, na formada na presença de sacarose é de 2432,6x. Este resultado está de acordo com CARLSSON & SUNDSTROM (1968), que encontraram uma relação carboidrato/nitrogênio 5x maior na placa formada na presença de sacarose do que glicose. Do ponto de vista qualitativo, diferentes perfis protéicos foram observados na matriz das placas formadas na presença de sacarose ou glicose+frutose (Fig. 15,16,17). Segundo ROLLA & BOWEN (1977), F interage eletrostaticamente com o Ca ligado a radicais aniônicos da matriz da placa, os quais são principalmente proteínas. Assim, a menor concentração de F na placa formada na presença de sacarose contribuiria físico-quimicamente para sua maior cariogenicidade. Ao mesmo tempo, a maior concentração de flúor na placa formada na presença de glicose+frutose contribuiria não só físico-quimicamente como ecologicamente (MARSH, 1990) para sua menor cariogenicidade.

A menor concentração de Ca, P e F na placa poderia também ser explicada pela difusão para a saliva, devido à dissolução dos reservatórios de minerais, quando da

produção de ácidos pela fermentação da sacarose ou da mistura glicose+frutose. Entretanto, as placas dentais formadas nas presenças destes carboidratos foram coletadas pelo menos 12 horas após a última exposição. Assim, haveria um tempo suficiente para que a placa novamente se saturasse destes íons se o problema fosse uma simples lei de ação de massas. Embora possa ser sugerido um outro trabalho para estudar a cinética destes íons na placa dental, os resultados sugerem que o problema está na composição da matriz da placa que não seria capaz de concentrar Ca, P e F.

Fazendo uma análise global dos resultados do presente trabalho, eles mostram em praticamente todas as análises comportamentos extremos da placa controle em relação à formada na presença de sacarose, ficando os da placa desenvolvida na presença de glicose+frutose em situação intermediária. Na comparação entre os resultados nem sempre diferenças significativas foram observadas, porém a tendência do fenômeno biológico é irrefutável e deve ser considerada. Assim sendo, novas pesquisas deverão ser desenvolvidas no sentido de confirmá-lo.

## 7-CONCLUSÕES

- 1- A composição bioquímica da placa dental influencia a sua cariogenicidade ;
- 2- Embora uma matriz de glucanos seja o fator principal para a maior cariogenicidade da placa dental formada na presença de sacarose, seu perfil protéico distinto e menor concentração de Ca, P e F devem ser considerados;
- 3- A menor concentração de Ca e P nas placas formadas na presença de sacarose ou glicose+frutose pode ser devido a estrutura das proteínas da matriz destas placas;
- 4- A menor concentração de F nas placas dentais formadas na presença de sacarose ou glicose+frutose pode ser devido à deficiência de proteínas ligadoras de Ca na matriz destas placas.

## **8- ANEXOS**

## ANEXO 1

**INFORMAÇÕES E CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO PARA PESQUISA CLÍNICA**

Nome do voluntário: \_\_\_\_\_

As informações contidas neste prontuário foram fornecidas por Maria Augusta Bessa Rebelo (Doutoranda), Prof<sup>a</sup> Dra. Altair A. Del Bel Cury e Prof Dr. Jaime A. Cury (Orientador), objetivando firmar acordo escrito mediante o qual o voluntário da pesquisa autoriza sua participação, com pleno conhecimento da natureza dos procedimentos e riscos a que se submeterá, com a capacidade de livre arbítrio e sem qualquer coação.

**1- Título do Trabalho Experimental**

Análise Bioquímica e Cariogenicidade da Placa Dental Formada na Presença de Sacarose e Glicose+Frutose. Estudo *in situ*.

**2- Objetivo**

Relacionar a composição orgânica e inorgânica da placa dental com sua cariogenicidade.

**3- Justificativa**

A cárie é uma doença que se caracteriza pela desmineralização dos tecidos dentais quando da ingestão de carboidratos fermentáveis, a nível da interface dente-placa. Estudos prévios têm mostrado diminuição da concentração inorgânica (Ca, P, F) formada na presença de sacarose; porém dados na literatura não esclarecem se este achado é devido a composição orgânica da matriz da placa em termos de polissacarídeos e proteínas.

**4- Procedimento da fase Experimental**

O estudo será do tipo cruzado, consistindo de 03 grupos de tratamento, nos quais 12 (doze) voluntários adultos utilizarão dispositivos intra-orais contendo blocos de esmalte íntegros, a saber: Grupo I: Utilizando sacarose 20%, 08 vezes ao dia; Grupo II: Utilizando solução de glicose+frutose 20%, 08 vezes ao dia; Grupo III – Controle: Não utilizando sacarose ou glicose+frutose). O período total do estudo compreenderá 03 etapas de 28 dias com intervalo de 07 dias entre cada etapa. Em cada etapa participarão os doze voluntários, sendo 04 voluntários em cada tratamento, de tal modo que ao final de todos os cruzamentos, todos os voluntários serão submetidos a todos os tratamentos.

**5- Desconforto ou riscos esperados**

Os voluntários poderão apresentar discreta halitose durante o período experimental, o que poderá ser atenuado com adequada higiene bucal bem como limpeza do dispositivo.

**6- Informações**

O voluntário tem garantia de que receberá respostas a qualquer pergunta ou esclarecimento de qualquer dúvida quanto aos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa. Também os pesquisadores supracitados assumem o compromisso de proporcionar informação atualizada obtida durante o estudo, ainda que esta possa afetar a vontade do indivíduo em continuar participando.

**7- Retirada do consentimento**

O voluntário tem a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo sem prejuízo de ordem pessoal-profissional com os responsáveis pela pesquisa.

**8- Aspecto legal**

Elaborados de acordo com as diretrizes e normas que regulamentam pesquisas envolvendo seres humanos, atendendo à Resolução nº. 196, de 10 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde / Ministério da Saúde – Brasília – DF.

**9- Garantia da sigilo**

Os pesquisadores asseguram a privacidade dos sujeitos quanto aos dados confidenciais envolvidos na pesquisa.

**10- Local da pesquisa**

A pesquisa será realizada na Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, localizada à Avenida Limeira, 901 – Caixa Postal 52; CEP 13414-018 – Piracicaba – SP.

**11- Consentimento pós-informação**

Eu \_\_\_\_\_, certifico que tendo lido as informações acima e suficientemente esclarecido(a) de todos os itens pela Doutoranda Maria Augusta Bessa Rebelo, Prof<sup>a</sup>. Dra. Altair A. Del Bel Cury e Prof. Dr. Jaime A. Cury (Orientador), estou plenamente de acordo com a realização do experimento. Assim, eu autorizo a execução do trabalho de pesquisa, exposto acima, em mim.

Piracicaba, 28 de julho de 1997

Nome (por extenso): \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

1<sup>a</sup> via: Instituição

2<sup>a</sup> via: Voluntário

## ANEXO 2

**ANÁLISE BIOQUÍMICA E CARIOGENICIDADE DA PLACA DENTAL  
FORMADA NA PRESENÇA DE SACAROSE E GLICOSE+FRUTOSE  
ESTUDO *IN SITU***

## Instruções aos Voluntários

- 1- O estudo será dividido em 3 etapas. Sendo cada etapa de 28 dias -, e com intervalo de 1 semana entre elas, de acordo com o cronograma abaixo:
  - a) 1ª etapa : 29/07/97 a 26/08/97
  - b) 2ª etapa: 09/09/97 a 07/10/97
  - c) 3ª etapa: 14/10/97 a 11/11/97
- 2- A água ingerida deverá ser necessariamente de abastecimento público de Piracicaba
- 3- Durante o período do experimento e uma semana antes de cada etapa, não utilizar nenhum produto contendo flúor, exceto água.
- 4- Os dispositivos intra-orais deverão ser utilizados durante todo o dia, inclusive para dormir, exceto durante as refeições e higiene oral, sendo nestes períodos os aparelhos acondicionados na caixa plástica fornecida, contendo no seu interior um algodão umedecido.
- 5- A escovação habitual deverá ser feita apenas com o dentífrico fornecido por nós. Os dispositivos devem ser higienizados, escovando-os somente a parte interna dos mesmos.
- 6- Será fornecida solução de sacarose 20% ou glicose+ frutose 20%, em frasco conta-gota. O voluntário deverá colocar 01 gota, solução que receber, sobre cada bloco de esmalte contido no dispositivo intra-oral, esperar 5 minutos e colocá-lo na boca. Este procedimento deverá ser feito 8 vezes ao dia, de acordo com o delineamento experimental, como segue abaixo:

Grupo I (Sacarose)	8:00h	9:30h	11:00h	14:00h
	15:30 h	17:00 h	19:00 h	21:00h

Grupo II (Glicose+Frutose)	8:00h	9:30h	11:00h	14:00h
	15:30 h	17:00 h	19:00 h	21:00h

Grupo III (Controle): Utilizar os dispositivos, porém sem uso das soluções.

Obrigada

**AUGUSTA**

Qualquer dúvida ou problema com o dispositivo intra-bucal, por favor comunicar-nos com a maior brevidade possível

Tel: 430-5303 (Lab. Bioquímica)  
433-4736 (Prof<sup>ª</sup>. Altair / Prof. Jaime)  
9(092) 982-4250 (Augusta)

## **9- APÊNDICES**

## Apêndice 1

## Análise de Flúor na Água de Abastecimento Público de Piracicaba

Apresentamos os resultados da análise de flúor na água de abastecimento público de Piracicaba-SP, no decorrer das três etapas experimentais.

Tabela XII – Médias e desvio padrão da concentração de flúor na água, durante as três etapas do experimento.

Etapas	ppm F <sup>-</sup>	Período
1 <sup>a</sup>	0,62 ± 0,07	29.07.97
2 <sup>a</sup>	0,56 ± 0,03	09.09.97
3 <sup>a</sup>	0,64 ± 0,16	14.10.97

## Apêndice 2

Tabela XIII- Peso Úmido da Placa Dental (mg / bloco dental)

Grupo	Indivíduo	Período		
		1	2	3
1	A	t1=1,25	t2=4,84	t3=4,74
	B	t1=16,27	t2=9,56	t3=4,80
	C	t1=22,12	t2=5,96	t3=2,37
	D	t1=9,92	t2=3,12	t3=*
2	E	t2=11,63	t3=2,34	t1=13,32
	F	t2=9,56	t3=9,54	t1=14,38
	G	t2=1,42	t3=5,88	t1=18,74
	H	t2=9,96	t3=9,32	t1=13,87
3	I	t3=0,96	t1=3,24	t2=0,58
	J	t3=3,66	t1=10,90	t2=9,56
	K	t3=5,02	t1=8,24	t2=13,31
	L	t3=2,60	t1=25,62	t2=8,16

\* placa não quantificável

t1= sacarose

t2= glicose + frutose

t3 = controle

## Apêndice 3

Tabela XIV - Concentração de flúor na placa dental (  $\mu\text{g f/g}$  )

Grupo	Indivíduo	Períodos		
		1	2	3
1	A	t1=21,63	t2=1,99	t3=54,65
	B	t1=19,48	t2=138,02	t3=149,16
	C	t1=0,93	t2=6,35	t3=268,36
	D	t1=1,21	t2=4,81	t3=*
2	E	t2=0,54	t3=166,03	t1=1,34
	F	t2=1,42	t3=42,57	t1=1,26
	G	t2=9,15	t3=10,39	t1=2,23
	H	t2=5,70	t3=44,30	t1=3,99
3	I	t3=252,75	t1=12,65	t2=152,88
	J	t3=313,52	t1=1,23	t2=7,85
	K	t3=142,49	t1=0,61	t2=1,63
	L	t3=102,71	t1=0,55	t2=2,55

t1= sacarose

t2= glicose + frutose

t3= controle

\*placa não quantificável

## Apêndice 4

Tabela XV - Concentração de fósforo na placa dental (mg/g)

Grupo	Indivíduo	Períodos		
		1	2	3
1	A	t1=0,63	t2=0,25	t3=11,07
	B	t1=0,42	t2=2,01	t3=15,76
	C	t1=0,23	t2=0,23	t3=9,41
	D	t1=0,08	t2=0,28	t3=*
2	E	t2=0,39	t3=5,56	t1=0,41
	F	t2=0,49	t3=1,15	t1=0,33
	G	t2=0,03	t3=6,78	t1=0,32
	H	t2=0,76	t3=19,94	t1=0,39
3	I	t3=5,66	t1=0,20	t2=0,57
	J	t3=9,49	t1=0,23	t2=0,41
	K	t3=21,04	t1=0,23	t2=0,21
	L	t3=20,84	t1=0,11	t2=0,45

t1= sacarose

t2= glicose + frutose

t3= controle

\*placa não quantificável

## Apêndice 5

Tabela XVI - Concentração de cálcio na placa dental ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )

Grupo	Indivíduo	Período		
		1	2	3
1	A	t1=0,17	t2=0,90	t3=21,05
	B	t1= *	t2=8,77	t3=32,16
	C	t1=0,74	t2=0,92	t3=16,84
	D	t1=1,15	t2=1,23	t3=*
2	E	t2=0,07	t3=11,25	t1=0,63
	F	t2=0,55	t3=4,82	t1=0,58
	G	t2=2,7	t3=15,04	t1=0,84
	H	t2=0,42	t3=12,60	t1=0,62
3	I	t3=7,84	t1=0,82	t2=3,89
	J	t3=17,40	t1=0,78	t2=1,11
	K	t3=34,10	t1=0,45	t2=0,59
	L	t3=14,27	t1=0,37	t2=1,22

\* placa não quantificável

t1=sacarose

t2=glicose + frutose

t3=controle

## Apêndice 6

Tabela VXII - Concentração de proteínas na placa dental (mg%)

Grupo	Indivíduo	Períodos		
		1	2	3
1	A	t1=0,38	t2=1,03	t3=1,97
	B	t1=2,09	t2=1,39	t3=2,32
	C	t1=1,08	t2=1,44	t3=2,16
	D	t1=0,32	t2=1,04	t3=*
2	E	t2=2,09	t3=2,41	t1=2,14
	F	t2=0,36	t3=2,46	t1=2,29
	G	t2=2,44	t3=1,76	t1=0,8
	H	t2=1,88	t3=1,71	t1=1,81
3	I	t3=2,66	t1=1,29	t2=0,73
	J	t3=2,53	t1=2,31	t2=2,03
	K	t3=2,47	t1=1,59	t2=1,69
	L	t3=2,29	t1=1,25	t2=1,95

t1= sacarose

t2= glicose + frutose

t3= controle

\*placa não quantificável

## Apêndice 7

Tabela VXIII - Concentração de carboidrato solúvel em ácido na placa dental

Grupo	Indivíduo	Período		
		1	2	3
1	A	t1=8,7	t2=5,9	t3=4,7
	B	t1=4,6	t2=5,7	t3=4,1
	C	t1=12,1	t2=6,7	t3=3,5
	D	t1=3,5	t2=7,2	t3=*
2	E	t2=2,6	t3=7,0	t1=15,1
	F	t2=17,3	t3=6,2	t1=8,1
	G	t2=*	t3=2,1	t1=49,2
	H	t2=22,0	t3=6,1	t1=10,2
3	I	t3=3,2	t1=17,0	t2=29,3
	J	t3=0,4	t1=27,7	t2=3,5
	K	t3=2,4	t1=8,6	t2=9,1
	L	t3=2,1	t1=8,3	t2=4,8

t1= sacarose

t2=glucose + frutose

t3=controle

\* placa não quantificável

## Apêndice 9

Tabela XIX - Concentração de polissacarídeo solúvel em álcali na placa dental

GRUPO	Indivíduo	Período		
		1	2	3
1	A	t1=13,0	t2=7,1	t3=6,7
	B	t1=9,1	t2=5,9	t3=3,1
	C	t1=41,1	t2=14,4	t3=4,8
	D	t1=60,3	t2=15,7	t3=*
2	E	t2=8,6	t3=7,6	t1=12,0
	F	t2=29,5	t3=6,9	t1=68,1
	G	t2=10,9	t3=3,3	t1=85,2
	H	t2=9,5	t3=5,4	t1=21,4
3	I	t3=16,0	t1=12,3	t2=8,5
	J	t3=6,8	t1=26,1	t2=14,1
	K	t3=5,8	t1=36,7	t2=11,5
	L	t3=5,3	t1=104,3	t2=6,3

t1= sacarose

t2=glucose + frutose

t3=controle

\*placa não quantificável

## Apêndice 10

Tabela XX - Microdureza Superficial do Esmalte  
% de perda mineral

Grupo	Indivíduo	Período		
		1	2	3
1	A	t1=63,94	t2=77,61	t3=2,70
	B	t1=41,52	t2=0,80	t3=3,99
	C	t1=79,71	t2=44,57	t3=3,03
	D	t1=85,15	t2=82,12	t3=4,96
2	E	t2=58,47	t3=3,23	t1=88,52
	F	t2=20,24	t3=0,0	t1=45,76
	G	t2=36,04	t3=0,0	t1=35,51
	H	t2=27,67	t3=0,0	t1=95,05
3	I	t3=7,16	t1=96,76	t2=21,76
	J	t3=4,97	t1=99,53	t2=38,44
	K	t3=5,25	t1=53,18	t2=71,10
	L	t3=4,87	t1=95,78	t2=51,65

t1= sacarose

t2= glicose + frutose

t3 = controle

Apêndice 11  
Tabela XXI - Média da Microdureza Interna do esmalte

Grupo	Indivíduo	dist. $\mu\text{m}$	Período		
			1 T1	2 T2	3 T3
1	A	20	141,65	51,51	346,92
		40	149,31	80,38	374,17
		60	249,55	160,69	363,58
		80	330,92	301,77	364,08
		100	322,08	336,97	377,58
	B	20	227,75	276,17	353,50
		40	304,33	326,58	339,42
		60	320,25	344,25	356,92
		80	326,67	341,50	357,00
		100	336,58	327,42	341,42
	C	20	98,88	98,42	277,25
		40	104,94	146,70	312,33
		60	222,67	250,01	331,58
		80	269,42	290,42	324,58
		100	289,08	324,67	327,75
D	20	42,07	103,63	282,67	
	40	83,73	249,00	322,58	
	60	147,28	341,75	335,92	
	80	226,08	351,67	294,50	
	100	287,42	358,67	317,92	

T1= sacarose

T2= glicose + frutose

T3= controle

( cont. )

cont. da Tabela XXI

Grupo	Indivíduo	µm	Período		
			1	2	3
			T2	T3	T1
2	E	20	191,53	284,83	46,17
		40	228,98	311,25	34,33
		60	303,08	333,00	167,27
		80	327,83	336,67	315,75
		100	329,25	336,17	345,83
	F	20	173,08	334,08	0,00
		40	208,45	360,33	0,00
		60	266,19	366,08	0,00
		80	312,17	357,17	0,00
		100	326,25	355,00	0,00
	G	20	229,20	320,08	13,78
		40	286,38	348,50	49,28
		60	324,33	341,00	76,53
		80	341,67	344,67	115,42
		100	345,50	351,58	151,25
	H	20	266,67	349,33	224,67
		40	322,00	345,00	288,50
		60	336,00	331,42	302,00
		80	344,25	350,83	308,83
		100	349,67	352,92	312,08

( cont. )

cont. da Tabela XXI

Grupo Individuo		dist. $\mu\text{m}$	Período		
			1 T3	2 T1	3 T2
3	I	20	340,33	86,83	170,17
		40	344,83	126,74	314,42
		60	341,92	264,47	343,42
		80	337,67	298,56	351,42
		100	343,67	337,50	356,92
	J	20	318,00	0,00	51,05
		40	308,92	0,00	92,78
		60	321,58	14,03	191,13
		80	306,92	27,13	282,50
		100	313,50	55,45	314,50
	K	20	316,92	65,32	0,00
		40	346,50	102,04	0,00
		60	331,92	141,97	0,00
		80	330,58	172,02	17,73
		100	335,25	236,67	43,59
	L	20	352,42	0,00	104,67
		40	342,75	0,00	123,88
		60	341,42	18,00	202,56
		80	350,83	45,60	296,83
		100	347,75	106,06	333,25

Apêndice 12

Tabela XXII - Concentração de Flúor no Esmalte

Grupo	Indivíduo	Período					
		1		2		3	
		ppm	dist. sup. µm				
1	A	t1=4736,4	10,83	t2=4869,55	13,02	t3=2393,95	13,79
		t1=1825,55	21,99	t2=2083,3	26,15	t3=1360,45	27,79
		t1=1289,6	35,67	t2=1173,85	40,92	t3=1831,8	39,71
		t1=633,45	56,89	t2=675,45	65,09	t3=648,2	65,64
		t1=491,25	77,67	t2=363,4	87,30	t3=477	93,65
	B	t1=5517,35	12,25	t2=2205,55	12,36	t3=1615,85	9,63
		t1=2417,7	24,94	t2=1132,75	25,38	t3=1152,5	19,26
		t1=1325,8	38,18	t2=830,5	39,17	t3=936,75	29,10
		t1=888,75	63,23	t2=535,55	65,97	t3=670,15	48,90
		t1=608,05	88,29	t2=446,35	92,88	t3=567,05	72,86
	C	t1=4578,65	15,76	t2=3841,1	17,73	t3=2698,25	11,05
		t1=2504,5	32,93	t2=1958,35	33,92	t3=1883,70	22,65
		t1=1645,35	50,44	t2=1275,55	48,25	t3=1343,00	33,04
		t1=1081,05	80,63	t2=772,05	78,77	t3=910,75	56,23
		t1=628,95	107,76	t2=481,05	113,01	t3=639,8	79,10
	D	t1=4716,45	14,88	t2=3379,95	15,10	t3=2006,8	10,07
		t1=2220,05	28,01	t2=1856,7	29,65	t3=891,25	21,88
		t1=1604,8	40,59	t2=1283,65	44,42	t3=625,05	33,81
		t1=1006,5	61,59	t2=687,2	74,17	t3=425,65	54,92
		t1=685,65	86,97	t2=447,85	103,38	t3=345,55	73,74

(cont.)

2	E	t2=5042,35	11,71	t3=3639,95	13,35	t1=4048,4	11,60
		t2=2646,35	25,39	t3=1921,5	26,26	t1=2031,65	26,15
		t2=1920,3	40,26	t3=1343,9	40,59	t1=1208	40,04
		t2=1122,45	66,41	t3=831,55	68,70	t1=477,35	68,48
		t2=680,15	94,96	t3=606,9	95,51	t1=306,35	95,95
	F	t2=4276,4	8,98	t3=2381,7	14,44	t1=4393	9,63
		t2=2183,8	17,50	t3=1143,8	29,54	t1=2584,05	21,34
		t2=1433,55	25,82	t3=912,25	45,40	t1=2138,9	34,57
		t2=1018,75	47,37	t3=440,05	76,37	t1=1484,2	58,20
		t2=689,5	64,44	t3=336,65	106,56	t1=1337,85	78,88
	G	t2=4099,05	8,53	t3=2127,55	13,35	t1=3699,5	11,60
		t2=2770,35	19,69	t3=1234,15	28,01	t1=2228,9	24,94
		t2=1751,15	30,86	t3=940,75	39,06	t1=1319,45	38,07
		t2=1137,55	43,44	t3=589,8	65,42	t1=859,15	61,59
		t2=980,2	58,97	t3=446,55	86,65	t1=582,05	84,35
	H	t2=3969,35	9,19	t3=3610,4	10,72	t1=2311,6	14,66
		t2=2457,8	18,38	t3=2067,9	22,65	t1=914,75	28,89
		t2=1904,8	27,68	t3=1390,2	33,92	t1=616,15	40,92
		t2=1440,25	48,03	t3=849,5	56,34	t1=416,4	64,22
		t2=864,6	68,81	t3=625,5	79,87	t1=342,9	89,38

( cont. )

3	I	t3=5496,05	13,02	t1=4215,8	10,55	t2=3939,35	18,60
		t3=2671,55	27,02	t1=2933,9	21,33	t2=1251,55	36,65
		t3=2082	41,69	t1=2037,3	30,63	t2=720,1	53,28
		t3=973,8	64,00	t1=1197,45	47,05	t2=487,5	82,92
		t3=680,2	83,69	t1=798,55	63,67	t2=372,7	112,46
	J	t3=3354,75	16,41	t1=3813,95	11,49	t2=3247,9	13,57
		t3=2246,6	30,20	t1=2333,3	23,52	t2=1565,05	26,04
		t3=1729,65	44,86	t1=1789,75	35,12	t2=1095,75	36,87
		t3=966,7	68,93	t1=908,9	57,22	t2=583,45	61,81
		t3=777,25	93,43	t1=527,8	81,07	t2=383,4	82,05
	K	t3=1942,15	18,27	t1=3282,65	13,24	t2=4089,55	12,26
		t3=1376,5	33,04	t1=1586,8	27,35	t2=1699,15	25,05
		t3=1044,05	47,81	t1=988,65	42,12	t2=1095,65	41,03
		t3=674,5	80,52	t1=563,95	73,96	t2=542,45	68,70
		t3=481,6	112,03	t1=494,95	105,90	t2=346,5	90,15
	L	t3=2905,7	12,15	t1=3414,65	12,91	t2=2941,05	17,40
		t3=1603,95	23,85	t1=1768,5	28,99	t2=1309,5	35,34
		t3=1157,1	33,48	t1=1232,75	44,85	t2=906,2	52,19
		t3=1006,2	55,80	t1=673,25	78,33	t2=522,75	82,16
		t3=536,15	71,77	t1=485,3	113,56	t2=369,8	111,15

t1=sacarose  
t2=glucose+frutose  
t3=controle

## Apêndice 13

Tabela XXII – Média e desvio da concentração total de proteínas na saliva dos voluntários .

Voluntário	mg/ml
A	1,92
B	0,72
C	0,53
D	0,27
E	0,93
F	0,61
G	0,58
H	1,10
I	0,45
J	0,94
K	0,64
L	1,31
Média	0,83
Dp	0,45

Apêndice 14

SALIVA

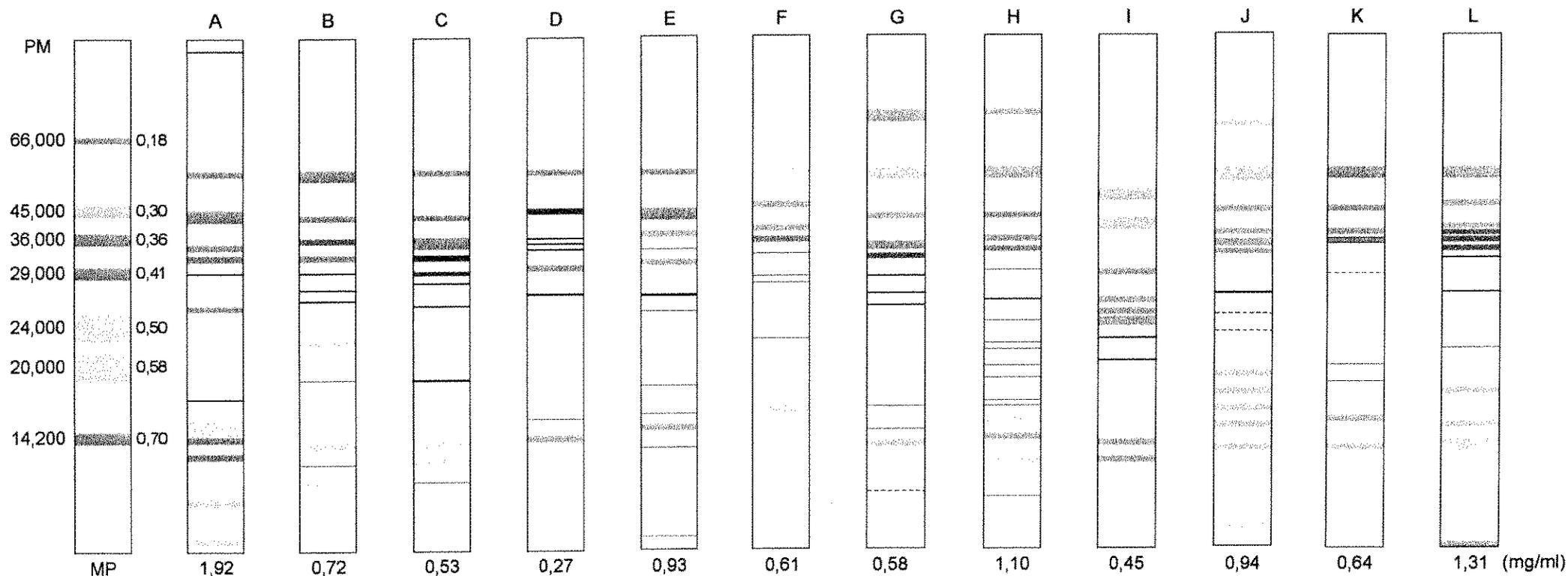


Figura 29 - representação diagramática das proteínas da saliva dos voluntários participantes do estudo. A primeira coluna representa a mistura padrão com seus respectivos pesos moleculares (PM) e mobilidades relativas ( Rm ); as demais colunas representam o perfil eletroforético de cada voluntário e os valores abaixo das colunas representam a concentração de proteínas (mg/mL ).

CONTROLE

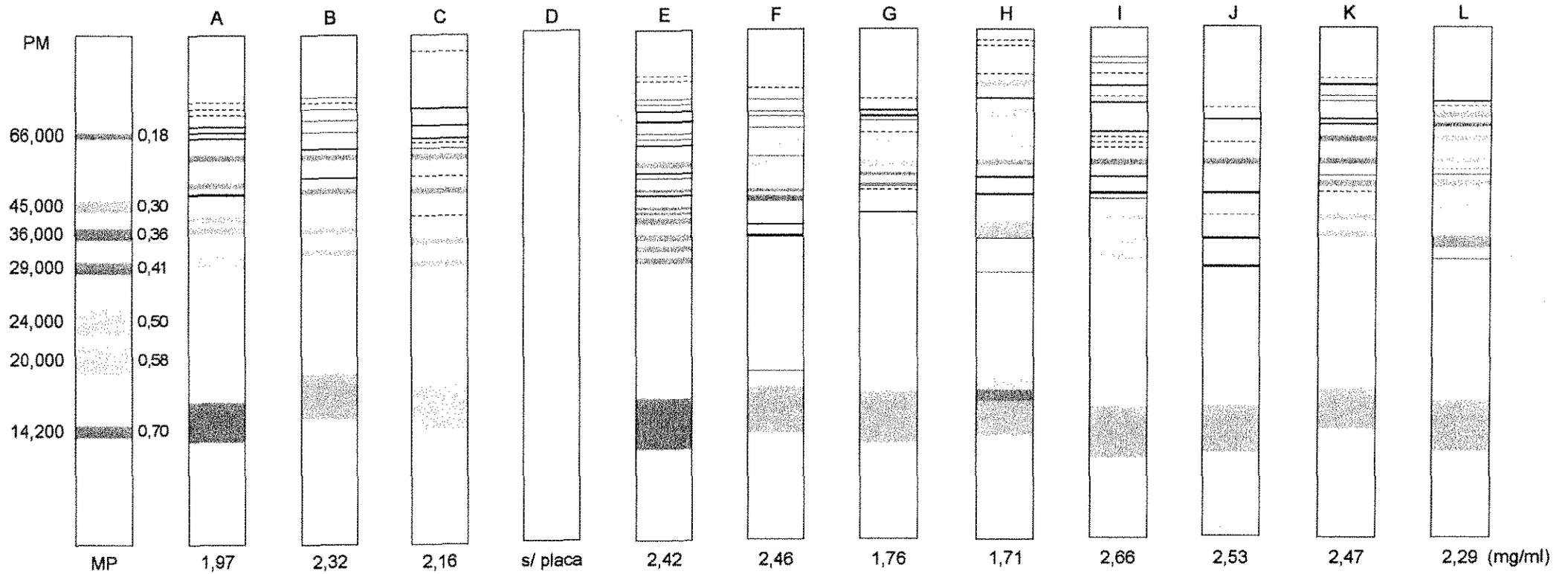


Figura 30 - representação diagramática das proteínas da saliva dos voluntários participantes do estudo. A primeira coluna representa a mistura padrão com seus respectivos pesos moleculares (PM) e mobilidades relativas ( Rm ); as demais colunas representam o perfil eletroforético de cada voluntário no grupo controle e os valores abaixo das colunas representam a concentração de proteínas (mg/mL).

GLICOSE + FRUTOSE

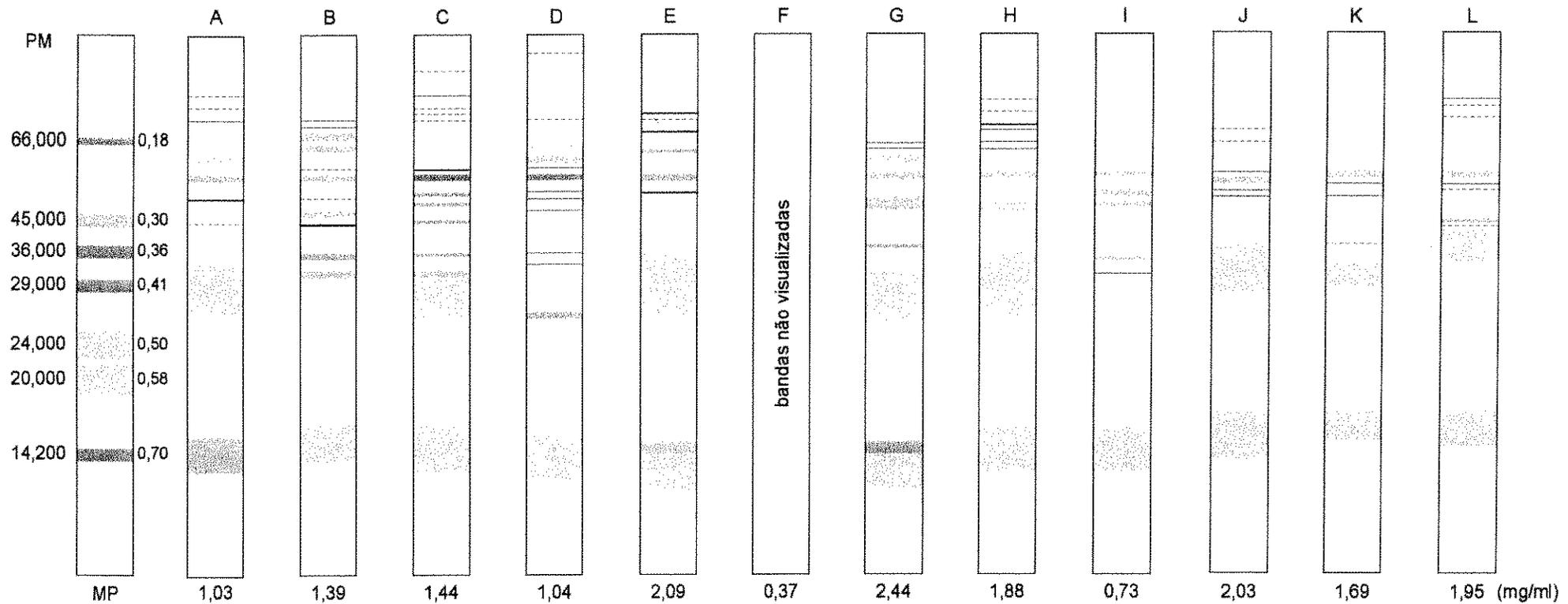


Figura 31 - representação diagramática das proteínas da placa dental dos voluntários participantes do estudo. A primeira coluna representa a mistura padrão com seus respectivos pesos moleculares (PM) e mobilidades relativas ( Rm ); as demais representam o perfil eletroforético de cada voluntário no grupo glicose + frutose e os valores abaixo das colunas representam a concentração de proteínas (mg/ mL ).

### SACAROSE

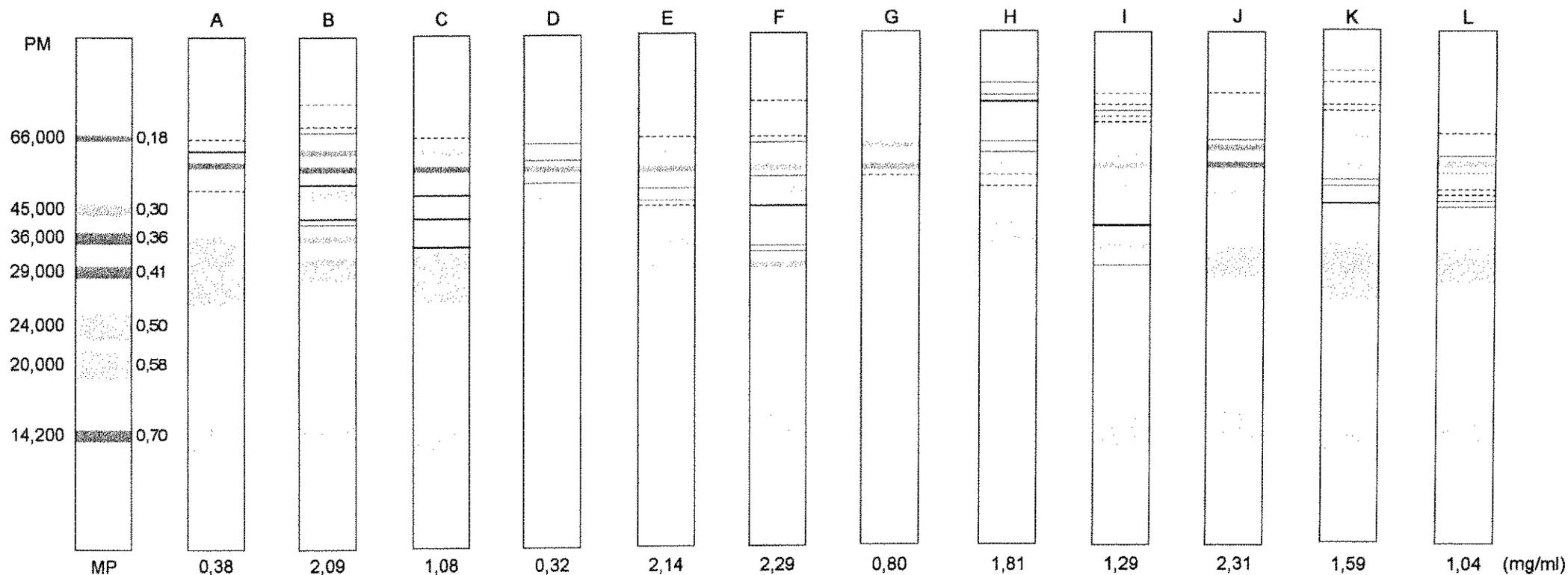


Figura 32 - representação diagramática das proteínas da saliva dos voluntários participantes do estudo. A primeira coluna representa a mistura padrão com seus respectivos pesos moleculares (PM) e mobilidades relativas ( Rm ); as demais colunas representam o perfil eletroforético de cada voluntário no tratamento sacarose e os valores abaixo das colunas representam a concentração de proteínas ( mg/mL ).

### Abstract

The aim of this study was to analyze the composition of dental plaque formed in the presence of sucrose or glucose+fructose and its relation with cariogenicity. Twelve adult volunteers took part in this crossover study done in three phases of 28 days each. For each phase of the study, an acrylic resin appliance containing four human dental enamel blocks was constructed for the volunteers. Solutions containing 20% sucrose or 10% glucose + 10% fructose were dripped onto the enamel blocks 8 times/day, while in the control group nothing was used. During the experimental period all the subjects used fluoride-free dentifrice, refrained from brushing the enamel blocks and drank water fluoridated at 0.6 ppm F. The concentrations of calcium, phosphorus, fluoride, total carbohydrate, and protein (as well as electrophoresis) were determined in dental plaque after each phase. The concentration of fluoride and microhardness were analyzed in the dental blocks. The results showed that the dental plaque formed in the presence of sucrose was more cariogenic than that formed in the presence of glucose+fructose. These results were observed qualitatively and determined quantitatively ( $p < 0.05$ ) by the analysis of surface and cross-sectional microhardness of dental enamel. Relative to fluoride concentration in enamel, there was an increase in the surface ( $12.9 \mu\text{m}$ ) when the plaque was formed in the presence of sucrose or glucose+fructose in relation to the control ( $p < 0.05$ ). Lower concentrations of Ca, P, and F were found in dental plaque formed in the presence of sucrose and glucose+fructose than in the control ( $p < 0.05$ ). The concentration of insoluble polysaccharides was higher in the sucrose group than in the control and glucose+fructose groups ( $p < 0.05$ ). The electrophoretic profile of the proteins in the dental plaque showed distinct patterns when the plaque was formed in the absence and presence of the different carbohydrates. The results suggest that the high cariogenicity of dental plaque formed in the presence of sucrose cannot be explained only by the high porosity of the matrix. Its low inorganic concentration and its peculiar composition in proteins may also contribute to this phenomenon.

## 10- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS \*\*

1. AGUS, H.M. et al. Associations between the total fluoride content of dental plaque and individual caries experience in Australian children. *Community Dent. Oral Epidemiol.*, Copenhagen, n.4, p.210-214, 1976.
2. ALFENAS, A. C. et al. In: *Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais*. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1991. p.241.
3. ARENDS, J. et al. Rate and mechanism of enamel demineralization *in situ*. *Caries Res.*, Basel, v.26, n.1, p.18-21, 1992.
4. ASHLEY, F.P. Calcium and phosphorus concentrations of dental plaque related to dental caries in 11-to-14-year-old male subjects. *Caries Res.*, Basel, v.9, p.351-362, 1975 a.
5. \_\_\_\_\_. Effects of single exposure to sugar on calcium and phosphorus concentrations of dental plaque. *J. dent. Res.*, Washington, v.55, p.1015-1018, 1975b.
6. \_\_\_\_\_. Relationship between dietary sugar intake, parotid saliva, plaque calcium, and phosphorus concentrations and caries. *J. dent. Res.*, Washington, v.50, p.1212, 1971.
7. \_\_\_\_\_. Relationship of diet, saliva, plaque, and caries. *J. dent. Res.*, Washington, v.51, p.1234, 1972.
8. \_\_\_\_\_, WILSON, R.F. Dental plaque and caries. A 3-year longitudinal study in children. *Brit. Dent. J.*, London, v.142, n.3, p.85-91, 1977a..
9. \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_. The relationship between dietary sugar experience and the quantity and biochemical composition of dental plaque in man. *Archs. Oral Biol.*, Oxford, v.22, p.409-414, 1977b.
10. \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_. The relationship between calcium and phosphorus concentration concentration of human saliva and dental plaque. *Archs oral Biol.*, Oxford, v.23, p.69-73, 1978.
11. BEELEY, J.A. Separation of human salivary proteins by isso-electric focusing in polyacrilamide gels. *Archs oral Biol.*, Oxford, v.14, p.559-561, 1969.
12. BENELLI, E.M. et al. An *in situ* study of glass ionomer cement anticariogenic potential. *Caries Res.*, Basel, v.27, p.280-284, 1993.
13. BOWEN, W., EASTOE, J.E., COCK, D.J. 1966 *apud* CHARLTON, FITZGERALD, D.B., KEYES, P.H. Hydrogen ion activity in dental plaques of hamsters during metabolism of sucrose glucose and fructose. *Archs oral Biol.*, Oxford, v.16, n.46, p.655-661, 1971.

---

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

14. BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.*, Orlando, n.72, p.248-254, 1976.
15. BRECX, M., THEILADE, J., ATTSTRÖM, R. Ultrastructural estimation of the effect of sucrose and glucose rinses on early dental plaque formed on plastic films. *Scand. J. dent. Res.*, Copenhagen, v.89, p.157-164, 1981.
16. BRUDEVOLD, F. et al. Enamel demineralization potential of dietary carbohydrates. *J. dent. Res.*, Washington, v.62, n.12, p.1218-1220, 1983.
17. BURNE, R.A. Oral Streptococci... Products of their environment. *J. dent. Res.*, Washington, v.77, n.3, p.445-452, 1998.
18. CAREY, C.M., MAO, Y., VOGEL, G.L. Calcium activity in human plaque fluid during a sucrose challenge. *J. dent. Res.*, Washington, v.73, 1994. [ Abstracts, 1902].
19. CARLSSON, J., SUNDSTRÖM, B. Variations in composition of early dental plaque following ingestion of sucrose and glucose. *Odont. Revy*, Malmö, n.19, p.161-168, 1968.
20. \_\_\_\_\_, EGELBERG, J. Effect of diet on early plaque formation in man. *Odont. Rev.*, Malmö, n.16, p. 112-125, 1965.
21. \_\_\_\_\_, FITZGERALD, D.B., KEYES, P.H. Hydrogen ion activity in dental plaques of hamsters during metabolism of sucrose glucose and fructose. *Archs oral Biol.*, Oxford, v.16, n.46, p.655-661, 1971.
22. CIARDI, J.E. et al. Adsorption of *Streptococcus mutans* lipoteichoic acid to hydroxyapatite. *Scand. J. dent. Res.*, Copenhagen, v.85, n.6, p.387-391, 1977.
23. COLMAN, G, BOWEN, W.H., COLEMAN, M.F. The effects of sucrose, fructose, and a mixture of glucose and fructose on the incidence of dental caries in monkeys (*M. fascicularis*). *Brit. Dent. J.*, London, v.142, n.5, p.217-220, 1977.
24. CRITCHLEY, et al. 1967 *apud* GUGGENHEIM, B. Extracellular polysaccharides and microbial plaque. *Int. Dent. J.*, Guildford, v.20, n.4, p.657-678, 1970
25. CURY, J.A. Fluoride therapy. In: BARATIERI, L.N. et al. *Advanced Operative Dentistry*. São Paulo: Quintessence, 1993. p.43-67.
26. \_\_\_\_\_, REBELLO, M.A.B., DEL BEL CURY, A.A. In situ relationship between sucrose exposure and the composition of dental plaque. *Caries Res.*, Basel, v.31, p.356-360, 1997.
27. DAWES, C. & JENKINS, G.N. Some inorganic constituents of dental plaque and their relationship to early calculus formation and caries. *Archs. Oral Biol.*, Oxford, v.7, p.161-172, 1962.

28. DIBDIN, G.H., SHELLIS, R.P. Physical and biochemical studies of *Streptococcus mutans* sediments suggest new factor linking with cariogenicity of plaque with its extracellular polysaccharides content. *J. dent. Res.*, Washington, v.67, n. , p.890-895, 1988.
29. DIPAOLO, C., HERRERA, M.S., MANDEL, I.D. Host proteins in dental plaques of caries-resistant versus caries-susceptible human groups. *Archs oral Biol.*, Oxford, v.29, n.5, p.353-355, 1984b.
30. \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_. Immunochemical study of host proteins in human supragingival compared with denture plaque. *Archs oral Biol.*, Oxford, v.29, n.2, p.161-163, 1984<sup>a</sup>.
31. DOBBS, E.C. Local factors in dental caries. *J. dent. Res.*, Washington, v.12, p.853-864, 1932.
32. DONOHUE et al., 1966 *apud* GUGGENHEIM, B. Extracellular polysaccharides and microbial plaque. *Int. Dent. J.*, Guildford, v.20, n.4, p.657-678, 1970.
33. DuBOIS, L.M., et al. A comparison between the effects of sucrose and fructose intake on early formation. *Clin. Prev. Dent.* , v.6, n.4, p.6-8, 1984.
34. DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analyt. Chem.*, Washington, v.28, p.350-356, 1956.
35. EDGAR, W.M. Studies of the role calcium in plaque formation and cohesion. *J. Dent.*, Oxford, v.7, n.2, p.174-179, 1979.
36. \_\_\_\_\_, BOWEN, W.H., COLE, M.F. Protein components in saliva and plaque fluid from irradiated primates. *J. oral Path.*, Copenhagen, v.11, p.252-259, 1982.
37. EDWARDSSON, S., KRASSE, B. Human streptococci and caries in hamsters fed diets with sucrose or glucose. *Archs oral Biol.*, Oxford, v.12, p.1015-1016, 1967.
38. ESSIG, M.E. et al. Enamel microhardness change and plaque pH measurements in an intra-oral model in humans. *J. dent. Res.*, Washington, v.64, n.8, p.1065-1068, 1985.
39. FEATHERSTONE, J.D.B. , ZERO, D.T. An in situ model for simultaneous assesment of inhibition of demineralization and enhancement of remineralization. *J. dent. Res.*, Washington, v.71, p.804-810, 1992.
40. FERGUSON, D.B. The electrophoresis of dental plaque. *J. dent. Res.*, Washington, v.43, p.956, 1964.
41. FISK, C. M., SUBARROW, Y. The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v.66, p.375-400, 1925.
42. FOLKE, L.E.A. et al. Effect of dietary sucrose on quantity and quality of plaque. *Scand. J. dent. Res.*, Copenhagen, v.80 p.529-533, 1982.

43. FOX, D.J., DAWES, C. The effect of various factors on the extraction of protein from the predominant microorganisms in human dental plaque. *Scand. J. dent. Res.*, Copenhagen, v.100, p.88-92, 1992.
44. \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_. The extraction of protein matrix from human dental plaque. *Archs oral Biol.*, Oxford, v.15, p.1069-1077, 1970.
45. FRY, A.J., GRENBY, T.H. The effects of reduced sucrose intake on formation and composition of dental plaque in a group of men in the Antarctic. *Archs oral Biol.*, Oxford, v.17, p.873-882, 1972.
46. FU, J. et al. Effect of plaque thickness on glucose retention and acid production. *J. dent. Res.*, Washington, v.70, 1991. [Abstract, 1815]
47. GAUGLER, R.W., BRUTON, W.F. Fluoride concentration in dental plaque of naval recruits with and without caries. *Archs oral Biol.*, Oxford, v.22, n.4, p.269-272, 1982..
48. GEDDES, D.A.M. Acids produced by human dental plaque metabolism *in situ*. *Caries Res.*, Basel, v.9, p.98-109, 1975.
49. \_\_\_\_\_. The effect of frequent sucrose mouthrinsing on the induction in vivo of caries-like changes in human dental enamel. *Archs oral Biol.*, Oxford, v.23, p.663-665, 1978.
50. GIBBONS, R.J., VAN HOUTE, J. On the formation of dental plaques. *J. Periodont.*, v.44, n.6, p.347-360, 1973.
51. GRAF, H. Potential cariogenicity of low and high sucrose dietary patterns. *J. Clin. Periodont.*, v.10, p.636-642, 1983.
52. GROBLER, S.R., REDDY, J., VAN WYK, C.W. Calcium, phosphorus, fluoride, and levels of human dental plaque from areas of varying fluoride levels. *J. dent. Res.*, Washington, v.61, n.8, p.986-988, 1982.
53. GUGGENHEIM, B. Extracellular polysaccharides and microbial plaque. *Int. Dent. J.*, Guildford, v.20, n.4, p.657-678, 1970.
54. GUSTAFSON, B.E., et al. The Vipeholm Dental Caries Study. The effect of different levels of carbohydrate intake on caries activity in 436 individuals observed for five years. *Acta odontol. scand.*, Oslo, v.11, p.232-364, 1954.
55. HARDWICK, J.L. Association between plaque fluoride concentrations and other parameters. In : McHUGH, W.D. (ed). *Dental Plaque*. Edinburgh: Livingstone, 1970. p.171-178.

56. HOLT, R.L. Studies on human dental plaque. 1. Physical and chemical characteristics and enzyme activities of pooled plaque extracts. *J. oral Path.*, Copenhagen, v.4, n.2, p.73-85, 1975a.
57. \_\_\_\_\_ Studies on human dental plaque. 3. Variation of protein constituents among individuals. *J. oral Path.*, Copenhagen, v.4, n.2, p.96-100, 1975b.
58. \_\_\_\_\_, MESTECKY, J. Studies on human dental plaque. 2. Immunochemical characteristics. *J. oral Path.*, Copenhagen, v.4, n.2, p.86-95, 1975.
59. HOLTZ, P., GUGGENHEIN, B., SCHIMD, R. Carbohydrates in pooled dental plaque. *Caries Res.*, Basel, v.6, p.103-121, 1972.
60. HORTON, W.A. et al. The cariogenicity of sucrose, glucose and maize starch in gnotobiotic rats mono-infected with strains of the bacteria *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius* and *Streptococcus milleri*. *Archs oral Biol.*, Oxford, v.30, n.11/12, p.777-780, 1985.
61. HUIS in't VELD, 1979 *apud* NEWBRUN, E. *Cariology*. Chicago, Quintessence, 1989. p.177-219.
62. IACONO et al. 1982 *apud* DI PAOLA et al. Immunochemical study of host proteins in human supragingival compared with denture plaque. *Archs oral Biol.*, Oxford, v.29, n.2, p.161-163, 1984.
63. JENKINS, G.N. *The physiology and biochemistry of the mouth*. 4 ed. Oxford, Blackweel, 1978, 360-413.
64. \_\_\_\_\_, EDGAR, W.M. Distribution and forms of F in saliva and plaque. *Caries Res.*, Basel, v.11, p.226-237, 1977. [Supplement, 1]
65. JONES, B., KENWARD, C. *Design and analysis of cross-over trials*. London: Chapman & hall, 1989. p.340.
66. KASHKET, S., AHERN, J.M. Correlation between physical changes in tooth enamel and changes in iodide penetrability following *in vitro* or intraoral demineralization. *Caries Res.*, Basel, v.23, n.1-6, p.232-237, 1989.
67. KASHKET, S., YASKELL, T. Accumulation of enamel constituents in *Streptococcus mutans* plaque during intra-oral demineralization. *Caries Res.*, Basel, v.24, p.248-253, 1990.
68. \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_. Effectiveness of calcium lactate added to food in reducing intraoral demineralization of enamel. *Caries Res.*, Basel, v.31, n.6, p.429-433, 1997.
69. KEYES & JORDAN, 1964, *apud* CHARLTON, FITZGERALD, D.B., KEYES, P.H. Hydrogen ion activity in dental plaques of hamsters during metabolism of sucrose glucose and fructose. *Archs oral Biol.*, Oxford, v.16, n.46, p.655-661, 1971.

70. KLEINBERG, I. Biochemistry of dental plaque. *Adv. Oral Biol.*, v.4, p.43-90, 1970.
71. KLIMEK, J., HELLWING, E., AHRENS, G. Movement of plaque fluoride under cariogenic conditions. *Caries Res.*, Basel, v.17, p.315-320, 1983.
72. KOULOURIDES, T. et al. Cariogenicity of nine sugars tested with na intraoral device in man. *Caries Res.*, Basel, v.10, n.6, p.427-441, 1976.
73. KREMBEL, J., FRANK, R.M., DELUZARCHE, A. Fractionation of human dental plaques. *Archs oral Biol.*, Oxford, v.14, p.563-565, 1969.
74. LARSEN, M.J. , BRUNN, C. Caries chemistry and fluoride. Mechanism of action . In: THYLSTRUP, A., FEJERSKOV, O. (eds). *Textbook of clinical cariology*. 2.ed. Copenhagen: Munksgaard,1994. p.231-257.
75. LINGSTRÖM, P. et al. Effect of frequent consumption of starchy food items on enamel and dentin demineralization and on plaque pH *in situ*. *J. dent. Res.*, Washington, v.73, n.3, p.652-660, 1994.
76. LOWRY et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. biol. Chem.* V.93, p.1458,1951.
77. LUOMA, A. R. et al. Bovine enamel microhardness and its Ca, P, Mg and F contents modified by the bacterium *Streptococcus mutans*, artificial dental plaque and fluoride. *Archs oral Biol.*, Oxford, v.28, n.1-6, p.347-352, 1983.
78. MÄKINEN, K.K., SODERLING, E.; HURTTIA, H. Biochemical microbiologic, and clinical comparison between two dentifrices that contain different mixtures of sugar alcohols. *J. Am. dent. Ass.*, Chicago, v.111, p.745-751, 1985
79. MANDEL, I.D. Effects of dietary modifications on caries in humans. *J. dent. Res.*, Washington, v.49, n.6, p.1202-1211, 1970.
80. \_\_\_\_\_. Relation of saliva and plaque to caries. *J. dent. Res.*, Washington, v.53, p.246-266, 1974.
81. MARGOLIS, H.C. An assessment of recent advances in the study of the chemistry and biochemistry of dental plaque fluid. *J. dent. Res.* , Washington, v.69, n.6, p.1337-1342, 1990.
82. \_\_\_\_\_, MORENO, E.C. Composition of pooled plaque fluid from caries-free and caries-positive individuals following sucrose exposure. *J. dent. Res.*, Washington, v.71, n.11, p.1776-1784, 1992.
83. \_\_\_\_\_, DUCKWORTH, J.H., MORENO, E.C. Composition and buffer capacity of pooled starved plaque fluid from caries-free and caries-susceptible individuals. *J. dent. Res.*, Washington, v.67, n.12, p.1476-1482, 1988a.

84. MARGOLIS, H.C. , DUCKWORTH, J.H. MORENO, E.C. Composition of pooled resting plaque fluid from caries-free and caries-susceptible individuals. *J. dent. Res.*, Washington, v.67, n.12, p.1468-1475, 1988b.
85. MARGOLIS, H.C. et al. Effect of sucrose concentration on the cariogenic potential of pooled plaque fluid from caries-free and caries positive individuals. *Caries Res.* , Basel, v.27, p.467-473, 1993.
86. MARQUIS, R.E., et al. Arginine deiminase and alkali generation in plaque. In: BOWEN, W., TABAK, L.A. (eds.). *Cariology for the nineties*. 1 ed. Rochester, 1993. P.309-317.
86. MARSH, P.D. Microbiol ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv. Dent. Res.*, Washington, v.8, p.263-271, 1994.
87. \_\_\_\_\_, BRADSHAWN, D.J. The effect of fluoride on the stability of oral bacterial communities *in vitro*. *J. dent. Res.*, Washington, v.69, p.668-671, 1990.
88. McDOUGALL, 1964 *apud* GUGGENHEIM, B. Extracellular polysaccharides and microbial plaque. *Int. Dent. J.*, Guildford, v.20, n.4, p.657-678, 1970
89. MCNEE, S.G. et al. Effect of extracellular polysaccharides on diffusion of NaF and [<sup>14</sup> C] – sucrose in human dental plaque and in sediments of the bacterium *Streptococcus Sanguis* 804 (NCTC 10904). *Archs oral Biol.*, Oxford, v.27, p.981-986, 1982.
90. MELLBERG, J. R., PETROU, I.D., GROTE, N.E. The effect of plaque thickness on progression of artificial caries lesion formation *in situ* . *J. dent. Res.*, Washington, v.69, n.3, p.865-867, 1990.
91. MINAH, G. et al. Sucrose induced ecological response of experimental dental plaques from caries-free and caries susceptible human volunteers. *Infect. Immun.* , v.34, p.662-675, 1981.
92. MORENO, E.C., MARGOLIS, H.C. Composition of human plaque fluid. *J. dent. Res.*, Washington ,v.67, n.9, p.1181-1189, 1988.
93. NEWBRUN, E. *Cariology*. Chicago, Quintessence, 1989. p.177-219.
94. \_\_\_\_\_. Sucrose, the arch criminal da cárie dental. *Odont Revy*, Malmo v.18, p.373-386, 1967.
95. NIKIFORUK, G. *Understanding dental caries*. Basel: Karger, 1985, p.122-142.
96. NOBRE DOS SANTOS, M., CURY, J.A. Dental plaque fluoride is lower after discontinuation of water fluoridation. *Caries Res.*, Basel, v.22, p.316-317, 1988.

97. OSTROM, C.A. Combined effects of sucrose and fluoride on experience caries and on the associated microbial plaque. *J. dent. Res.*, Washington, v.56, n.3, p.212-221, 1977.
98. \_\_\_\_\_, KOULOURIDES, T. The intraoral cariogenicity test in young subjects. *Caries Res.*, Basel, v.10, n.6, p.442-452, 1976.
99. PEARCE, E.I.F., HANCOCK, E.M., GALLAGHER, I.H.C. The effect of fluorhydroxyapatite in experimental human dental plaque on its pH, acid production and soluble calcium, phosphate and fluoride levels following glucose challenge. *Archs oral Biol.*, Oxford, v.29, n.7, p.521-527, 1984.
100. PERINPANAYAGAM, H.E.R. et al. Characterization of low-molecular-weight peptides in human parotid saliva. *J. dent. Res.*, Washington, v.74, p.345-350, 1995.
101. RANKINE, C.A.N. et al. Biochemical comparison comparison of plaque fluid on tooth and acrylic surfaces during a sucrose challenge. *Archs oral Biol.*, Oxford, v.41, n.7, p.695-698, 1996.
102. RÖLLA, G. High amounts of lipoteichoic acid in sucrose-induced plaque *in vivo*. *Caries Res.*, Basel, v.14, p.235-238, 1980.
103. \_\_\_\_\_. Why is sucrose so cariogenic ? The role of glucosyltransferase and polysaccharides. *Scand. J. dent. Res.*, Copenhagen, v.97, p.115-119, 1989.
104. \_\_\_\_\_, BOWEN, W. Concentration of fluoride in plaque – a possible mechanism. *Scand J. dent. Res.*, Copenhagen, v.85, p.149-151, 1977.
105. \_\_\_\_\_, EMBREY, G. Sulfated glycoproteins in the acquired pellicle and in plaque from *Macaca fascicularis* demonstrated with labeled sulfate. *Scand. J. dent. Res.*, Copenhagen, v.85, p.237-240, 1977.
106. \_\_\_\_\_, CIARDI, J.E., SCHULTZ, A.S. Adsorption of glucosyltransferase to saliva coated hydroxyapatite – Possible mechanism for sucrose dependnt bacterial colonization of teeth. *Scand. J. dent. Res.*, Copenhagen, v.91, p.112-117, 1983.
107. \_\_\_\_\_, SCHEIE, A.A., CIARDI, J.E. Role of sucrose in plaque formation. *Scand. J. dent. Res.*, Copenhagen, v.93, p.105-111, 1985.
108. RUDNEY, J.D. et al. Antimicrobial proteins in human unstimulated whole saliva in relation to each other, and to measures of health status, dental plaque accumulation and composition. *Archs oral Biol.*, Oxford, v.36, n.7, p.497-506, 1991.
109. SCHAMSCHULA, R.G. et al. The concentrations of selected major and trace minerals in human dental plaque. *Archs. Oral Biol.*, Oxford, v.22, p.321-325, 1977.

110. SCHWARTZ, S.S., ZHU, W.X., SREEBNY, L.M. Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis of human whole saliva. *Archs oral Biol.*, Oxford, v.40, n.10, p.949-958, 1995.
111. SCHEIE, A.A. Mechanisms of dental plaque formation. *Adv. Dent. Res.*, Washington, v.8, n.2, p.246-253, 1994.
112. SCHEININ, A., MÄKINEN, K.K. 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, 1971.
113. SHAW, L. et al. Calcium and phosphorus content of plaque and saliva in relation to dental caries. *Caries Res.*, Basel, v.17, p.543-548, 1983.
114. SILNESS, J. & LÖE, H. Periodontal disease in pregnancy. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odont. Scand.*, OSLO, v. 24, p.747-759, 1964
115. SILVERMAN, G. , KLEINBERG, I. Fractionation of human dental plaque and the characterization of its cellular and acellular components. *Archs oral Biol.*, Oxford, v.12, p.1387-1405, 1967.
116. SIMONSSON, T. et al. Rate of plaque formation – some clinical and biochemical characteristics of “heavy”and“light”plaque formers. *Scand. J. dent. Res.*, Copenhagen, v.95, p.97-103, 1987.
117. SKINNER, A., CONNOLLY, P., NAYLOR, M.N. The influence of the replacement of dietary sucrose by maltose on the formation and biochemistry of human dental plaque. *Archs. Oral Biol.*, Oxford, v.27, p.603-8, 1982.
118. TATEVOSSIAN, A. Calcium and phosphate in human dental plaque and their concentration after overnight fasting and after ingestion of a boiled sweet. *Archs oral Biol.*, Oxford, v.32, n.3, p.201-205, 1987.
119. \_\_\_\_\_. Facts and artefacts in research on human dental plaque fluid. *J. dent. Res.* , Washington, v.69, n.6, p.1309-1315, 1990b.
120. \_\_\_\_\_. Fluoride in dental plaque and its effects. *J. dent. Res.*, Washington, v.69 (Sp Iss), p.6450683, 1990., 1990a.
121. \_\_\_\_\_, GOULD, C.T. The composition of the aqueous phase in human dental plaque. *Archs oral Biol.*, Oxford, v.21, p.319-323, 1976.
122. \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_. The kinetics of inorganic phosphate in human dental plaque and saliva. *Archs oral Biol.*, Oxford, v.24, p.461-466, 1979.
123. TATEVOSSIAN, A. , GOULD, C.T. Methods for sampling and analysis of the aqueous phase of human dental plaque. *Archs oral Biol.*, Oxford, v.21, p.313-317, 1976.

124. TATEVOSSIAN, A., NEWBRUN, E. Electrophoretic and immunoelectrophoretic studies of proteins in the aqueous phase of human dental plaque. *Archs oral Biol.*, Oxford, v.26, p.275-280, 1981.
125. TAUBMAN, M.A. Immunoglobulins of human dental plaque. *Archs oral Biol.*, Oxford, v.19, p.430-446, 1974.
126. TURTOLA, L O. Enamel microhardness and fluoride uptake underneath fermenting and non-fermenting artificial plaque. *Scand J. Dent. Res.*, Copenhagen, v.85, n.6, p.373-379, 1977.
127. VAN HOUTE, J. Bacterial adhesion in the mouth. In: Leach S. A. *Dental plaque and surface interactions in the oral cavity*. London, Information Retrieval Ltd. 1979. p. 69.
128. VAN HOUTE, J. Role of micro-organisms in caries etiology. *J. dent. Res.*, Washington, v.73, p.672-681, 1994.
129. VAN PALENSTEIN HELDERMAN, W.H. et al. Cariogenicity depends more on diet than the prevailing mutans streptococcal species. *J. dent. Res.*, Washington, v.75, n.1, p.535-545, 1996.
130. WHITE, R.R. The acquired enamel integuments : Pellicle, plaque, and calculus. In : LAZZARI, E.P. (ed). *Dental Biochemistry*, 2 ed.. Philadelphia: Lea & Febiger, 1976. p.257.
131. WICKEN et al, 1973 *apud* RÖLLA, G.. High amounts of lipoteichoic acid in sucrose-induced plaque *in vivo*. *Caries Res.*, Basel, v.14, p.235-238, 1980
132. WILSON, R.F., ASHLEY, F.P. The effects of experimental variations in dietary sugar intake and oral hygiene on the biochemical composition and pH of free smooth-surface and approximal plaque. *J. dent. Res.*, Washington, v.67, n.6, p.949-953, 1988.
133. \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_. The relationship between the biochemical composition of dental plaque from both approximal and free smooth surfaces of teeth and of subsequent 3-years caries increment in adolescents. *Archs oral Biol.*, Oxford, v.35, n.12, p.933-937, 1990.
134. WYCOFF, S.J., MORRIS, M.E., NEWBRUN, E. The effect of mouthrinse containing calcium glucerophosphate on the composition and development of plaque in human. *J. dent. Res.*, Washington, v.59, n.1, p.23-28, 1980.
135. ZERO, D.T. *In situ* caries models. *Adv. Dent. Res.*, Washington, v.9, n.3, p.214-230, 1995.

136. ZERO, D.T., VAN HOUTE, J., RUSSO, J. Enamel demineralization by acid produced from endogenous substrate in oral streptococci. *Archs. Oral Biol.*, Oxford, v.31, n.4, p.229-234, 1986a.
137. \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_. The intra-oral effect on enamel demineralization of extracellular matrix material synthesized from sucrose by *Streptococcus mutans*. *J.dent. Res.*, Washington, v.65, p.918-923, 1986b.
138. \_\_\_\_\_ et al. An improved intra-oral enamel demineralization test model for the study of dental caries. *J. dent. Res.*, Washington, v.71, p.871-878, 1992.
139. \_\_\_\_\_ et al. Comparison of the iodide permeability test, the surface microhardness test, and mineral dissolution of bovine enamel following acid challenge. *Caries Res.*, Basel, v.24, p.181-188, 1990.