

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA - FOP
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP

CÁSSIO VICENTE PEREIRA

(Cirurgião - Dentista)

POTENCIAL CARIOGÊNICO "IN VITRO" DE
ESTREPTOCOCOS GRUPO MUTANS DA
CAVIDADE BUCAL E SEU SIGNIFICADO EM
RELAÇÃO À CÁRIE DENTÁRIA

Dissertação apresentada ao
curso de Pós-Graduação em
Odontologia, Área de Biologia
e Patologia Buco-Dental,
Faculdade de Odontologia de
Piracicaba, Universidade
Estadual de Campinas –
UNICAMP, para obtenção do
título de mestre em Ciências.

PIRACICABA

- 1998 -

F 914.283



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA - FOP
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP

CÁSSIO VICENTE PEREIRA

(Cirurgião - Dentista)

POTENCIAL CARIOGÊNICO "IN VITRO" DE
ESTREPTOCOCOS GRUPO MUTANS DA
CAVIDADE BUCAL E SEU SIGNIFICADO EM
RELAÇÃO À CÁRIE DENTÁRIA

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Biologia e Patologia Buco-Dental, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, para obtenção do título de mestre em Ciências.

ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ FRANCISCO HÖFLING

PIRACICABA

- 1998 -

Declaro que esta Tese
foi devidamente corrigida,
após as necessárias
brevia e as necessárias
29.10.78 WSP

Ficha Catalográfica

P414p Pereira, Cássio Vicente.
Potencial cariogênico "in vitro" de estreptococos grupo mutans da cavidade bucal e seu significado em relação à cárie dentária / Cássio Vicente Pereira. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 1998.
89f. : il.

Orientador : Prof. Dr. José Francisco Höfling.
Dissertação (Mestrado) -- Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Cáries dentárias. 2. Estreptococo. 3. Placas dentárias. 4. Polissacarídeos. 5. Ácidos. I. Höfling, José Francisco. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Ficha Catalográfica Elaborada pela Bibliotecária Marilene Girello CRB / 8 - 6159, da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba / UNICAMP.



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de MESTRADO, em sessão pública realizada em 19 de Outubro de 1998, considerou o candidato CASSIO VICENTE PEREIRA aprovado.

1. Prof. Dr. JOSE FRANCISCO HOFLING

2. Profa. Dra. DENISE MADALENA PALOMARI SPOLIDORIO

3. Profa. Dra. ODILA PEREIRA DA SILVA ROSA

_____DEDICATÓRIA
e AGRADECIMENTOS_____

Dedico este trabalho,

Aos meus pais, **VICENTE** e **GLÓRIA**,
pelo amor, ensinamentos e pelo constante
incentivo para que pudesse seguir o meu
caminho nesta vida.

Agradeço

a **DEUS**

por estar sempre no meu caminho.

Ao meu irmão **LUCIANO**, pelo carinho,
amizade e companheirismo sempre
presente no decorrer deste trabalho.

À minha irmã **MARTHA** e seu esposo
GERALDO, pelo carinho, incentivos e
exemplos de alegria e luta.

À CLÁUDIA, pela compreensão,
paciência, incentivo e amor transmitido
a todo instante.

Ao Prof. Dr. JOSÉ FRANCISCO HÖFLING, pela orientação, apoio, amizade e elevado senso de responsabilidade científica transmitidos durante este trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, na pessoa de seu Diretor **Prof. Dr. Antônio Wilson Sallum**, pelo acolhimento e pela oportunidade de intensificar e aprimorar meus conhecimentos.

À **Profa. Dra. Altair Antoninha Del Bel Cury**, Coordenadora Geral do Curso de Pós-Graduação da FOP-UNICAMP.

Ao **Prof. Dr. Carlos Roberto Hoppe Fortinguerra** ex-Coordenador e à **Profa. Dra. Darci de Oliveira Tosello** atual Coordenadora do Curso de pós-Graduação em Biologia e Patologia Buco-Dental da FOP-UNICAMP, pela amizade e apoio.

À todos os Professores do Curso de Pós-Graduação em Biologia e Patologia Buco-Dental, pelos ensinamentos durante o curso de Mestrado.

À **Prof. Dra. Denise Madalena Palomari Spolidorio**, pela amizade e ensinamentos durante a realização deste trabalho.

Aos funcionários da Disciplina de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, **Anderson Laerte Teixeira, Wilma C. Ferraz e Elza Thomazini**, pela amizade e respeito que sempre me distinguiram.

Aos amigos **Edvaldo A. Ribeiro Rosa e Rosimeire Takaki Rosa**, pelo exemplo de amizade e companheirismo nos árduos momentos no decorrer do curso.

Às colegas **Alessandra S. Campos e Daniella Moreira**, solidárias em todos os momentos deste trabalho.

Aos amigos **Marcelo F. Boriollo, Janaína A. O. Rodrigues e Cristina Crespo Rodrigues**, pela amizade.

Aos meus amigos **Fábio de Abreu Alves e João E Gomes Filho**, pelo incentivo, amizade e companheirismo demonstrados a todo instante.

Aos amigos **Douglas C. Fonseca, Maximilian de Souza Gomes, Heverson W. Pereira e Vanessa Karla de Souza**, pelo apoio e amizade sempre presentes em nossa convivência.

Aos **Prof. Marcone Reis Luis, Prof. José Fernando Esteves e Prof. Marco Aurélio Fraga**, pelos ensinamentos e apoio à minha formação profissional.

À Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual de Minas Gerais, Campus de Lavras - M.G., na pessoa de seu diretor **Prof. Canísio Ignácio Lunkes**, pelo apoio concedido.

À todos os amigos do Centro de Processamento de Dados da FOP-UNICAMP, pela amizade e auxílio no decorrer do curso.

Ao **Prof. Dr. Rubem Delly**, da Universidade Federal de Lavras - UFLA, pela orientação estatística.

Aos amigos do Curso de Pós-Graduação em Biologia e Patologia Buco-Dental, pelo companheirismo e solidariedade sempre recebidos.

À **Heloisa Maria Ceccotti** pela revisão das referências bibliográficas.

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

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I	Tipos de depósito aderente obtido no teste de formação de placa bacteriana " <i>in vitro</i> ".	36
Figura II	Valores comparativos da produção de placa bacteriana " <i>in vitro</i> ", por estreptococos grupo mutans com espécies isoladas e em associação.	38
Figura III	Valores comparativos da produção de carboidratos totais solúveis em ácido, por estreptococos grupo mutans com espécies isoladas e em associação.	40
Figura IV	Valores comparativos da produção de carboidratos totais solúveis em álcali, por estreptococos grupo mutans com espécies isoladas e em associação.	42
Figura V	Valores de pH em intervalos de tempo crescentes, de amostras de estreptococos grupo mutans cultivadas isoladas e em associação.	44
Figura VI	Coefficientes de correlação entre a produção de placa " <i>in vitro</i> " e os valores de pH em intervalos de tempo crescentes por amostras de estreptococos grupo mutans cultivadas isoladas e em associação.	48

Figura VII	Coeficientes de correlação entre a produção de placa “<i>in vitro</i>” e de carboidratos totais solúveis em ácido e em álcali, por amostras de estreptococos grupo mutans cultivadas isoladas e em associação	50
Figura VIII	Coeficientes de correlação entre a produção de carboidratos totais solúveis em ácido e em álcali. e os valores de pH em intervalos de tempo crescentes por amostras de estreptococos grupo mutans cultivadas isoladas e em associação.	53

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I	Valores médios da produção de placa bacteriana “ <i>in vitro</i> ”, por estreptococos grupo mutans com espécies isoladas e em associação.	37
Tabela II	Produção de carboidratos totais solúveis em ácido, por estreptococos grupo mutans com espécies isoladas e em associação.	39
Tabela III	Produção de carboidratos totais solúveis em álcali, por estreptococos grupo mutans com espécies isoladas e em associação.	41
Tabela IV	Valores médios de pH em intervalos de tempo crescentes das amostras de estreptococos grupo mutans, cultivadas isoladas e em associação.	43
Tabela V	Valores dos coeficientes de correlação entre a produção de placa bacteriana e os valores de pH obtidos em intervalos de tempo crescentes por amostras de estreptococos grupo mutans, isoladas e em associação..	47

Tabela VI	Valores dos coeficientes de correlação entre a produção de placa “<i>in vitro</i>” e de carboidratos totais solúveis em ácido e em álcali por amostras de estreptococos grupo mutans isoladas e em associação.	49
Tabela VII	Valores dos coeficientes de correlação entre o pH obtido em intervalos de tempo crescentes e a produção de carboidratos totais solúveis em ácido por amostras de estreptococos grupo mutans isoladas e em associação...	51
Tabela VIII	Valores dos coeficientes de correlação entre o pH obtido em intervalos de tempos crescentes e a produção de carboidratos totais solúveis em álcali por amostras de estreptococos grupo mutans isoladas e em associação...	52

SUMÁRIO

RESUMO

INTRODUÇÃO	1
REVISÃO DE LITERATURA	5
MATERIAL E MÉTODOS	25
RESULTADOS	34
DISCUSSÃO	54
CONCLUSÕES	66
APÊNDICE	69
SUMMARY	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

RESUMO

RESUMO

Com o objetivo de se analisar *in vitro*, o potencial cariogênico de estreptococos grupo mutans, isolados e em associação, através da formação de placa bacteriana *in vitro*, da produção de polissacarídeos extracelulares e da capacidade de produção de ácidos por essas espécies, foram utilizadas cepas desses microrganismos pertencentes ao acervo da Disciplina de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, isoladas e identificadas bioquimicamente a partir de amostras salivares de escolares entre 6 e 9 anos de diferentes categorias sócio-econômicas. Foram analisadas 150 amostras de *S. mutans*, 27 de *S. sobrinus*, 15 de *S. rattus*, 09 de *S. mutans* V e apenas uma de *S. cricetus*, *S. ferus* e *S. downei* totalizando 204 amostras. A quantificação da produção de placa bacteriana *in vitro*, pelos estreptococos isolados e em associação, foi feita através da inoculação de quantidades iguais de culturas recentes de cada amostra, previamente padronizadas pela escala de Mc Farland, em tubos contendo meio BHI à 5% de sacarose e incubados por 48 horas (37° C / 10% CO₂). Cada tubo possuía um bastão-capilar que era pesado previamente e após a incubação, possibilitando, dessa forma, a determinação da produção de placa *in vitro*. A capacidade de produção de ácidos pelas amostras de estreptococos do grupo mutans – isoladas e em associação – foi demonstrada através de medições contínuas em intervalos de tempo crescentes (6, 12, 24 e 48 horas), do pH do meio de cultura (BHI – 5% sacarose) onde essas espécies foram cultivadas. A produção de polissacarídeos extracelulares foi mensurada

pelo método de dosagem de carboidratos totais solúveis em ácido e em álcali. Os resultados obtidos mostraram que entre as amostras analisadas, o *S. rattus* (19,70 mg) seguido pela associação *S. mutans* / *S. sobrinus* (10,32 mg) produziram maiores quantidades de placa bacteriana "in vitro", demonstrando segundo este parâmetro, maior potencial cariogênico. As espécies *S. mutans* (6,89 µg/mg) e *S. sobrinus* (5,12 µg/mg), isoladamente, apresentaram a maior produção de carboidratos totais solúveis em ácido por mg de placa bacteriana "in vitro", não existindo porém, diferença estatisticamente significativa em relação às demais amostras analisadas. Com relação a produção de carboidratos totais solúveis em álcali, o *S. mutans* (6,62 µg/mg) foi, estatisticamente superior a associação *S. mutans* / *S. sobrinus* / *S. rattus*. Esses dados confirmam o elevado potencial cariogênico dessa espécie, considerando-se o importante papel desses componentes na formação da placa bacteriana. A determinação da produção de ácidos pelas amostras de estreptococos, revelou quedas mais acentuadas de pH nos intervalos de tempo inicial e final, com valores de 4,67 (6 horas) e 3,86 (48 horas), respectivamente para a espécie *S. mutans*. Para o período de 12 horas, a espécie *S. sobrinus* produziu a maior queda de pH (4,34), e para 24 horas o menor valor encontrado pertenceu a espécie *S. mutans* V (3,58). Isso favorece a manutenção prolongada do pH abaixo de níveis críticos (pH 5,0), corroborando a sugestão de que indivíduos colonizados pela associação *S. mutans* / *S. sobrinus*, apresentam índices de cárie dental mais elevados. A análise estatística de correlação entre os diversos fatores de virulência estudados demonstrou correlações variáveis de acordo com o período de incubação e

com a amostra de estreptococos grupo mutans, isoladas ou em associação, não indicando, de acordo com as condições de realização da pesquisa, uma correlação constante e uniforme entre esses fatores.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A microbiota oral é variada e complexa, contendo um grande número de espécies que refletem a diversidade dos habitats e dos ecossistemas localizados. A cada dia surgem novos estudos correlacionando estes microrganismos com as alterações patológicas que envolvem esse ambiente. Essas pesquisas partem da aplicação de conceitos ecológicos à microbiota oral que permitem a explicação de alterações que ocorrem nesse ecossistema e ajudam a entender doenças como a cárie, que envolvem a placa dentária e a emergência de bactérias potencialmente patogênicas (THYLSTRUP & FEJERSKOV⁸³, 1995).

Dentre as diferentes patologias que acometem a cavidade oral, a cárie dentária se apresenta como uma das mais relevantes, devido particularmente, a sua frequência de ocorrência nas populações, de modo geral. A erupção dos dentes tem um grande impacto na composição da microbiota oral, provocando alterações na colonização por espécies que se aderem às superfícies dentais e aí se multiplicam. As mais importantes são a presença de *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus sanguis* e de algumas espécies de *Actinomyces*, assim como o aumento no número e nos tipos de bactérias anaeróbias (THYLSTRUP & FEJERSKOV⁸³, 1995).

Os microrganismos do grupo mutans estão intimamente associados à cárie dentária, apresentando a capacidade de produzir polissacarídeos extracelulares aderentes, a partir da sacarose, justificando a

importância da dieta nesse evento biológico. JORDAN & KEYES⁵⁰ (1966) e EDWARDSSON²⁶ (1968) demonstraram em animais experimentais que amostras de estreptococos cariogênicos formavam abundante material mucilaginoso sobre a superfícies de dentes extraídos, dentes artificiais, lâminas de vidro e outros objetos quando cultivados em meios contendo sacarose. Esse material mucilaginoso, atualmente definido como placa bacteriana, é formado principalmente, de agregados bacterianos, polissacarídeos, células epiteliais descamadas, proteínas, restos alimentares e enzimas que ao se depositarem sobre as estruturas dentais desempenham importante papel na etiologia das lesões cariosas.

A utilização da sacarose pelos estreptococos do grupo mutans, com formação de polissacarídeos extracelulares, constitui um mecanismo importante para o potencial cariogênico destas espécies, possibilitando a deposição de placa bacteriana, responsável pela alteração no esmalte dental, que eleva o processo cariogênico. O *S. mutans* e o *S. sobrinus*, são espécies que segundo alguns autores (LINDQUIST & EMILSON⁶⁰, 1991; HIROSE et al.⁴⁵, 1993), podem apresentar um elevado potencial indutor de lesões cariosas. Vários estudos relatados na literatura (CARLSSON¹², 1968; BEIGHTON et al.⁵, 1987; KÖHLER & BJARNASSON⁵⁶, 1987; LINDQUIST & EMILSON⁶⁰, 1991; AHAMADY et al.¹, 1993; HIROSE et al.⁴⁵, 1993) em relação a presença destas duas espécies, separadamente, tem permitido associá-las com a história da cárie dentária. No entanto, quando se apresentam associadas elevam o índice desse processo infeccioso em seus portadores. Ambas as espécies foram detectadas juntas em um grande número de regiões

da cavidade oral, mostrando dessa maneira uma associação positiva (LINDQUIST & EMILSON⁶⁰, 1991; AHAMADY et al.¹, 1993).

Vários tem sido os trabalhos demonstrando essa estrutura "in vitro" (IKEDA et al.⁴⁷, 1990; OLSSON et al.⁷¹, 1992), cujos resultados são demonstrações inequívocas da reprodutibilidade ou existência do fenômeno "in vivo". Recentemente SPOLIDORIO⁸⁰, 1997, isolando estreptococos do grupo mutans da cavidade oral de escolares entre 6 e 9 anos, demonstrou que uma associação entre *S. mutans* e *S. sobrinus* pode elevar o potencial cariogênico destas espécies.

Um maior conhecimento da capacidade de indução de placa bacteriana, de produção de polissacarídeos extracelulares e ácidos "in vitro" por esses microrganismos cariogênicos, seria importante para se avaliar o potencial indutor de lesões cariosas dessas espécies e contribuir com investigações recentes encontradas na literatura (IKEDA et al.⁴⁷, 1990; HIROSE et al.⁴⁵, 1993; SPOLIDÓRIO⁸⁰, 1997). Com o objetivo de contribuir com estudos dessa natureza, a presente pesquisa visa estudar, "in vitro", o potencial cariogênico de algumas espécies do grupo mutans, através da produção de polissacarídeos extracelulares, da formação de placa bacteriana "in vitro" e da determinação da capacidade de produção de ácidos dessas amostras, cultivadas isoladamente e em associação.

REVISÃO DE LITERATURA

2. REVISÃO DE LITERATURA

A microbiota bucal é constituída por um grande número de ecossistemas microbianos distintos, sendo formados por uma variedade de tipos bacterianos que preferem certos ambientes da boca. Os principais habitats da microbiota bucal incluem os dentes, mucosas, saliva, língua e sulco gengival. As populações microbianas que compõem estes ecossistemas diferem tanto em aspectos qualitativos quanto quantitativos. Estudos quantitativos mostraram que as maiores biomassas de bactérias existem nas superfícies dos dentes e no dorso da língua. Estudos nesta área (JORDAN & KEYES⁵⁰, 1966; EDWARDSSON²⁶, 1968) levaram ao conceito de que as lesões cáries eram resultantes da atividade localizada de bactérias que se aderiam ao dente, e o termo "placa microbiana gelatinosa" foi utilizado para descrever esta entidade (MENAHER⁶⁹, 1984).

A correlação entre placa bacteriana e cárie dental, tem sido discutida por pesquisadores da área, considerando a existência prévia da placa bacteriana, de fundamental importância para o início e progressão de uma lesão cáries. Os experimentos em animais, procurando demonstrar o agente etiológico desse evento biológico, tiveram sempre a preocupação em descrever a ocorrência de depósitos (placa dental) sobre e ao redor das estruturas dentárias comprometidas pela lesão.

Os primeiros estudos (KRASSE⁵⁷, 1965; JORDAN & KEYES⁵⁰, 1966) relatavam que, amostras de estreptococos com potencial cariogênico eram diferenciadas das amostras não-cariogênicas, isoladas de animais livres

de cárie, apenas pela capacidade dos primeiros fermentarem sorbitol. Entretanto, outra diferença entre as amostras poderia ser ressaltada, porque, embora apresentassem características bioquímicas e fisiológicas semelhantes, tinham comportamento adverso, quando incubados na cavidade oral de "hamsters", alimentados com uma dieta contendo açúcar: formavam placa sobre as superfícies dentárias e, posteriormente apareciam as lesões cariosas.

A importância da dieta, e particularmente da sacarose, como fator imprescindível para instalação do processo carioso é demonstrada na literatura desde o século passado. Resultados de inúmeros experimentos em animais, desenvolvidos para avaliar a participação da dieta na cárie dentária, ressaltaram a importância da sacarose como carboidrato mais cariogênico em relação a outros substratos glicídios (KRASSE⁵⁷, 1965; GUGGENHEIM et al⁴², 1965; EDWARDSSON & KRASSE²⁷, 1967; KEYES⁵³, 1968; KRASSE⁵⁸, 1968; FITZGERALD³⁰, 1968). Em complemento, GIBBONS et al⁴⁰. (1966) relataram a cariogenicidade em ratos por amostras de estreptococos, com habilidade de formar placa em presença de sacarose. Igualmente, GUGGENHEIM et al⁴³. (1966), descobriram que a indução de cárie dental em ratos - por estreptococos - foi maior naqueles alimentados com uma dieta a base de sacarose, quando comparada com outros açúcares ou com uma dieta ausente de açúcar.

Em meados de 1955, foi demonstrada a participação de estreptococos como agente etiológico da cárie, com a divulgação de trabalhos com ratos gnotobióticos (ORLAND et al⁷², 1955; FITZGERALD et al.³³, 1960), posteriormente reforçada com as experimentações empregando "hamsters" convencionais (FITZGERALD & KEYES³¹, 1960), às quais seguiram o trinômio

hospedeiro-sacarose-estreptococos, capaz de explicar a instalação e a progressão do processo cariioso (KEYES⁵², 1960; KEYES & FITZGERALD⁵⁴, 1962; KEYES & FITZGERALD⁵⁵, 1963; FITZGERALD & KEYES³², 1963).

Entretanto, ainda permanecia desconhecido o potencial de cariogenicidade de certas amostras de estreptococos e a razão pela qual a sacarose constituía realmente o carboidrato mais importante para a atividade cariiosa. O esclarecimento destes aspectos teve início com o trabalho de JORDAN & KEYES⁵⁰ (1966), onde foi observado que amostras de estreptococos cariogênicas para animais, formavam abundante material mucilaginoso sobre a superfície de dentes extraídos, dentes artificiais, fio de aço inoxidável e outros objetos, quando cultivados em meio básico, contendo 0,1% de sacarose. Amostras não-cariogênicas para animais não formavam placa "*in vitro*" nestas condições. A sacarose era imprescindível para a formação de placa, pois a adição de glicose, frutose, galactose, lactose, sorbitol ou a mistura de glicose-frutose, no sistema, não induzia a formação de placa mucilaginosa como acontecia com o emprego da sacarose. O trabalho demonstrou ainda, dois aspectos de importância máxima para relacionar o material mucilaginoso, sintetizado pelos estreptococos a partir da sacarose, com a lesão cariiosa: a) material mucilaginoso foi acumulado sobre um eletrodo, que, quando mergulhado em solução de sacarose acusava abaixamento do pH em torno de 4.5 - 5.0, faixa suficiente e necessária para explicar a descalcificação do esmalte; o pH permanecia baixo por mais 3 horas com o eletrodo imerso em saliva sintética e sem substrato glicídico exógeno para metabolização; b) dente humano íntegro foi submetido ao esquema de

formação de placa e, ao final de 3 semanas, havia abundante material mucilaginoso acumulado sobre sua coroa, observando-se por cortes histológicos, a ocorrência da cárie incipiente sob o depósito. Esses resultados, permitiram uma relação direta entre a presença de estreptococos e a capacidade de formar placa a partir da sacarose. Havia, portanto, indícios de que a sacarose era importante para a colonização de certos microrganismos sobre as estruturas dentárias, funcionando como precursora na síntese da placa mucilaginosa, que aderiu fortemente às superfícies, mesmo as mais lisas. Estes resultados (JORDAN & KEYES⁵⁰, 1966) davam mais consistência às diferenças estabelecidas entre os estreptococos cariogênicos e não-cariogênicos, porque relacionavam os primeiros com capacidade de aderir particularmente às superfícies lisas.

As pesquisas realizadas nas décadas de 50 e 60, convergiram para o entendimento da etiologia da cárie dentária e para a identificação dos microrganismos causadores desta patologia, concluindo que os estreptococos, notavelmente o *Streptococcus mutans*, poderiam se apresentar como os microrganismos potencialmente mais cariogênicos. Estudos taxonômicos realizados com várias amostras dessas espécies, demonstraram variedades correspondentes a *S. mutans* (CARLSSON¹², 1968; DRUCKER & MELVILLE²³, 1971). Nesse sentido, a existência de diferenças sorológicas entre as cepas de *S. mutans* foi primeiramente observada por ZINNER & JABLON⁸⁹ (1968), os quais demonstraram um certo grau de heterogeneidade entre as mesmas. Posteriormente, BRATTHALL⁹ (1970) estudando cepas de *S. mutans*, dividiu-as em cinco grupos baseados na presença de cinco diferentes antígenos

específicos. Essa classificação foi baseada em reação de precipitação obtida pela difusão em gel que resultou na obtenção de cinco grupos sorológicos de a-e. Os relatos de taxonomia levados a efeito por CARLSSON¹² (1968) e DRUCKER & MELVILLE²³ (1971), demonstraram que cepas de *S. mutans* são fenotipicamente homogêneas. No entanto, COYKENDALL¹⁴ (1970) e DUNNY et al.²⁵ (1973), observaram variações na constituição da base do DNA entre cepas de *S. mutans* e, posteriormente em experimentos de reassociação de DNA, demonstraram a existência de 4 grupos genéticos distintos (I a IV), levando COYKENDALL¹⁵ (1974) a propor subespécies ou "genoespécies" de *S. mutans* e a descrição de um novo grupo (genótipo V), isolado da boca de ratos selvagens. Posteriormente, esses genótipos foram correlacionados com os sorotipos descritos por BRATTHALL⁹ (1970), afirmando que - dentre um genótipo - diferentes sorotipos e reações bioquímicas poderiam ocorrer. Subseqüentemente, PERCH et al.⁷³ (1974), com base em estudos sorológicos, propuseram dois sorotipos adicionais (f e g).

Durante esse período, um novo esquema bioquímico foi proposto por SHKLAIR & KEENE⁷⁸ (1974), para separação de *S. mutans*. A identificação foi baseada em provas de fermentação de manitol, sorbitol, rafinose, melibiose e na habilidade em produzir amônia de arginina. Assim, através de características bioquímicas, a existência de 5 grupos distintos (a-e) foram descritas, relacionando-as aos sorotipos de BRATTHALL⁹ (1970). Posteriormente, COYKENDALL¹⁶ (1977), propôs elevar as diversas subespécies de *S. mutans*, à categoria de espécie, tendo como base as suas composições moleculares. As cinco espécies descritas foram: *S. cricetus*, *S.*

rattus, *S. mutans*, *S. sobrinus* e *S. ferus*. Com base ainda, em estudos taxonômicos, BEIGHTON et al⁷. (1984), isolaram da placa dental de macacos, um sorotipo adicional. Este fato, fez com que esses autores propusessem mais uma espécie, *Streptococcus macacae*, pertencente ao grupo mutans apresentando o sorotipo c, assim como *S. mutans* e *S. ferus*; contudo, sua diferente composição genética a distingue das outras espécies que possuem o antígeno c e dos outros estreptococos do grupo mutans. BEIGHTON et al⁶. (1991) propuseram um novo esquema bioquímico mais simplificado, baseado em testes enzimáticos e de fermentação de carboidratos para diferenciar cepas de *S. mutans* e *S. sobrinus*.

A comprovação de que variações em características bioquímicas, sorológicas e genéticas entre estreptococos do grupo mutans relacionam-se à espécie animal da qual foi isolado (BRATTHALL⁹, 1970; COYKENDALL¹⁵, 1974; PERCH et al⁷³, 1974), foi reconhecida pela última edição do manual de BERGEY'S (HARDIE⁴⁴, 1986), o qual descreve o grupo mutans de estreptococos, composto pelas espécies *S. cricetus*, *S. mutans*, *S. rattus*, *S. sobrinus*, *S. ferus* e *S. macacae*. WHILEY et al⁸⁷. (1988), propuseram mais uma espécie, *S. downei*, sorotipo h, representando uma espécie distinta, pertencente ao grupo mutans.

Segundo LINDQUIST & EMILSON⁶⁰ (1991), o *S. mutans* é a espécie mais frequentemente encontrada na cavidade bucal, seguida pelo *S. sobrinus*. Neste estudo, os autores chamam a atenção para o grande número de sítios anatômicos da cavidade oral, onde ambas as espécies foram detectadas juntas, indicando, dessa forma, uma provável associação entre

esses organismos. Nessa linha de investigação, HIROSE et al⁴⁵. (1993), avaliaram a presença de *S. mutans* na saliva de 338 crianças entre 3 e 5 anos de idade e compararam aos índices de cárie dessas mesmas crianças. Os resultados mostraram que os escolares que possuíam as espécies *S. mutans* e *S. sobrinus* apresentavam índices de cárie significativamente mais elevados que as crianças colonizadas por apenas uma das espécies, e que o *S. sobrinus* estava mais intimamente associado às lesões de superfície lisa, sugerindo uma maior capacidade de adesão desse microrganismo à estrutura dentária, quando comparada a espécie *S. mutans*. Recentemente, BABAAHMADY et al⁴. (1998), realizaram um estudo correlacionando a presença de *S. mutans*, *S. sobrinus* e *Lactobacillus* com o processo de iniciação de cáries, a partir de amostras de placa bacteriana de 64 crianças. Os autores concluíram que não houve relação entre *Lactobacillus* e as lesões iniciais de cárie, mas a presença de *S. mutans* e *S. sobrinus* juntos, estava fortemente correlacionada com este processo infeccioso.

A adesão dos estreptococos grupo mutans à superfícies duras, tem sido estudadas desde as primeiras publicações sobre o isolamento e identificação destes microrganismos. Os estreptococos grupo mutans, são aptos a produzir polissacarídeos extracelulares a partir da sacarose (GUGGENHEIM & SCHROEDER⁴¹, 1962; GIBBONS & BANGHART³⁷, 1971) e isto sugere que estes polímeros devem ser importantes na placa dental sobre o dente.

JÜRGENSEN & ARAÚJO⁵¹ (1967) descreveram a formação de placa 'in vitro' por *Streptococcus mutans* numa sequência experimental

bastante simplificada, que empregava exclusivamente uma elevada concentração de sacarose, com a finalidade de oferecer condições mais favoráveis para a deposição do material mucilaginoso. Como superfície de depósito, foi utilizado um bastão de vidro ou uma secção de lamínula fixados a um fio de aço inoxidável e esterilizados por autoclavação. Em tubos contendo caldo sacarosado à 5,0%, era inoculada uma cultura recente do microrganismo, introduzindo-se, imediatamente, o bastão ou a lamínula na massa líquida e seguindo-se a incubação à 37° C, em microaerofilia. Com intervalos de 48 horas, e dentro de rigorosa cadeia asséptica, bastão e lamínula eram transferidos para outros meios com caldo sacarosado, repetindo-se sempre as mesmas condições de incubação. Com as sucessivas transferências, o depósito mucilaginoso avolumava-se gradativamente, com projeção de certas massas de material a semelhança de grandes colônias crescidas sobre as superfícies do bastão e da lamínula. Como controle da experiência, bastão e lamínula foram colocados - nas mesmas condições técnicas - em caldo glicosado à 5,0%, inoculados com a mesma amostra de estreptococos, não havendo formação de placa *"in vitro"*.

GIBBONS et al⁴³. (1966) mostraram que, quando amostras de estreptococos cariogênicos eram cultivadas em caldo sacarosado, as células aderiam às paredes do frasco e se depositavam no fundo, embebidas em material gelatinoso, que foi considerado material capsular dos microrganismos. De certo modo, os autores estavam relatando a formação de placa *"in vitro"*, com recursos técnicos posteriormente ampliados no trabalho de GIBBONS & NYGAARD³⁸ (1968) sobre a natureza do polissacarídeo sintetizado *"in vitro"*

pelos estreptococos, especialmente o *S. mutans*, com finalidade de determinar o efeito dos vários dextranos sobre as características de aderência destes microrganismos.

O primeiro estudo que demonstrou diretamente a ocorrência de polissacarídeos na placa dental foi realizado por Mc DOUGALL⁶⁸ (1964). Extratos de amostras de placa precipitados em etanol 70%, foram hidrolisados e análises revelaram que frutose era o único componente presente nessa estrutura. CRITCHLEY et al¹⁷. (1967) extraíram amostras de placas com água fria e subsequentemente com hidróxido de sódio 0,5 N. A hidrólise ácida e cromatografia de papel do extrato dialisado com água fria, mostrou glucose e frutose como principais componentes, ao passo que glucose foi o principal constituinte no material hidrolisado extraído com álcali. O procedimento de extração foi repetido após uma incubação "*in vitro*" das amostras de placa em sacarose, o material solúvel em água foi uma mistura de frutano e glucano, enquanto que na fração solúvel em álcali encontrou-se um glucano que foi precipitado em etanol 45%. Assim, polissacarídeos extracelulares e glicoproteínas salivares nessas amostras, pareciam ser os principais constituintes da matriz da placa e produzidos por determinadas bactérias orais a partir da sacarose. Os polissacarídeos isolados da placa dental tem sido demonstrado serem glucanos e frutanos. Entretanto, estes compostos não são homogêneos do ponto de vista químico ou morfológico, apresentando diferenças na solubilidade. Devido a suas propriedades químicas e físicas os glucanos insolúveis tem sido considerados como a "peça de resistência" da matriz da placa dental.

GIBBONS & VAN HOUTE³⁹ (1973), em seus relatos sobre formação de placa dental, citam que possivelmente o melhor exemplo de adesão interbacteriana mediada por polímeros bacterianos diz respeito aos *S. mutans*. Existem dados indicando que, o único potencial do *S. mutans* está associado com sua habilidade em formar placa dental, e que isto é dependente da síntese de polissacarídeos extracelulares a partir da sacarose. O *S. mutans* forma depósitos microbianos aderentes na presença de sacarose, e isto origina uma extensa placa bacteriana em animais alimentados com uma dieta contendo esse substrato.

Estudando a relação da saliva e placa bacteriana com a cárie dental, MANDEL⁶⁴ (1974) observou que a quantidade de matriz intercelular na placa é extremamente variável e amplamente dependente da dieta. A placa é formada mesmo em indivíduos alimentados por sonda, mas é fina e produz relativamente pouco ácido. Quando a ingestão de sacarose é alta, a placa cresce rapidamente, devido a formação de uma quantidade substancial de dextrano. Quando a ingestão é um pouco mais moderada (115g / dia), a quantidade de placa não é significativamente elevada, embora dextrano e levano estejam aumentados. Quando a glucose é o maior açúcar da dieta, a matriz intercelular consiste de um hetero-polissacarídeo composto de glucose, galactose, hexosamina e pequenas quantidades de outros açúcares.

GAWRONSKI et al³⁵. (1975), realizaram um estudo com o objetivo de avaliar o efeito da sacarose sobre a concentração de polissacarídeos extracelulares. Assim, adultos jovens entre 21 e 24 anos de idade, foram examinados por acumulação de placa após 4 dias de ausência de

higiene oral, sendo que a placa foi coletada da superfície lingual e vestibular de 28 dentes. Oito indivíduos que acumularam placa em excesso (obtendo por volta de 40 mg - peso úmido) enquanto ingeriam sua dieta normal, foram selecionados para o estudo. Esses indivíduos foram então submetidos a uma dieta rica e baixa em sacarose. Cada período da dieta de 12 dias era separado por uma dieta normal de 16 dias. Ao final de cada período de desenvolvimento, a placa foi removida e submetida a análise bioquímica. Os resultados mostraram uma correlação positiva entre dieta rica em sacarose e aumento na síntese de polissacarídeos extracelulares e intracelulares.

Em suas pesquisas ASHLEY & WILSON² (1977), estudando a relação entre a experiência de açúcar da dieta e quantidade e composição bioquímica da placa dental em humanos, obtiveram os seguintes resultados: a) a dieta rica em açúcar foi associada com uma concentração significativamente menor de cálcio e fósforo e significativamente maior de carboidratos totais em relação às dietas livres de açúcar; b) há uma correlação positiva entre concentração de carboidratos da placa, com exceção dos carboidratos solúveis em álcali, e a quantidade de açúcar na dieta.

Estudos *"in vitro"* também mostraram que a sacarose pode não ser essencial para o ataque inicial de *S. mutans* às superfícies. CLARK et al¹³. (1978) descobriram que células liofilizadas de *S. mutans* possuíam baixa atividade glicosiltransferase (a enzima envolvida na produção de polissacarídeos extracelulares a partir da sacarose adsorvida da saliva). Evidências mais recentes, entretanto, sugerem que a produção de glucanas a partir de sacarose podem ser importantes apenas no acúmulo subsequente de

S. mutans e não na interação inicial entre *S. mutans* e superfícies duras. Estas evidências tem levado a sugestão (VAN HOUTE et al⁸⁶, 1977) que o ataque do *S. mutans* ao dente pode se dar em dois estágios, consistindo de uma fase inicial, reversível, dependente de parâmetros físico-químicos, seguida por uma fase irreversível envolvendo a produção de polímeros extracelulares.

Durante a década de 60, aumentaram as evidências de que estes polissacarídeos eram importantes constituintes da placa e que influenciavam o processo de cárie. De acordo com o trabalho de JENKINS⁴⁹ (1978), existem três principais grupos de polissacarídeos que podem ser formados: a) polímeros da glicose (glucanos), formados como uma massa gelatinosa extracelular principalmente da sacarose, pela ação da enzima conhecida como glicosiltransferase; b) outra enzima (levanosucrase) converte sacarose em levanos (polímeros extracelulares da frutose); c) muitas bactérias orais estocam carboidratos como polissacarídeo intracelular tipo glicogênio. Ao contrário dos polissacarídeos extracelulares, que são formados essencialmente da sacarose, os polissacarídeos intracelulares podem ser formados a partir de uma variedade de açúcares (incluindo glucose, maltose e sacarose) e são metabolizados quando outras fontes de carboidratos estão ausentes, como entre as refeições.

GEDDES et al³⁶. (1978), observaram que mudanças visuais semelhantes à cáries iniciais ocorreram quando 10 voluntários não escovaram seus dentes por 14 dias e bochecharam uma solução de sacarose nove vezes ao dia - enquanto que o grupo controle que não bochechou com sacarose - revelando uma mudança no esmalte significativamente menor. Entretanto, a

concentração de fósforo e cálcio, e o peso úmido da placa acumulada durante o período sem higiene oral pelos dois grupos, não mostrou diferenças significantes, embora a concentração de carboidratos no grupo sacarose tenha sido significativamente maior. Ainda segundo a pesquisa de JENKINS⁴⁹ (1978), descrevendo a síntese de polissacarídeos pela placa bacteriana, o autor cita que quando certas bactérias, incluindo várias espécies da placa, recebem sacarose, elas podem sintetizar vários tipos de polissacarídeos ou convertê-la em ácido. LOESCHE⁶¹ (1993) utilizando-se de vários modelos "in vitro", descreveu como ocorreria a dissolução do esmalte dental pelos ácidos produzidos pelas bactérias orais, especialmente os estreptococos grupo mutans, indicando que em um meio como a saliva, que está saturada com íons de cálcio e fosfato, o pH da placa teria que cair abaixo de 5,0 para ocorrer a desmineralização.

A partir de estudos como IMFELD et al⁴⁸. (1978), as pesquisas concentraram-se sobre a saliva como variável mais provável capaz de influenciar o início da cárie. Foi constatado que o pH das salivas, são notadamente constantes, próximos da neutralidade, e não diferem entre indivíduos com atividade elevada de cárie e indivíduos livres de cárie. Demonstrou-se que o pH em uma lesão cariada se aproxima de 4.2, e a média do pH das superfícies cariadas era 0,7 unidades de pH menos do que a média das placas a superfície de dentes intactos. A rapidez e a magnitude desta produção de ácidos, sobrepõem a capacidade tampão disponível da saliva. O baixo pH, persistiu por mais de 60 minutos após a expectoração da glicose, demonstrando que os tampões salivares eram inadequados na neutralização

dos ácidos na placa e / ou que o ácido estava sendo produzido continuamente na mesma. Esta última possibilidade foi sugerida pela queda continuada do pH nos indivíduos extremamente cárie-ativos.

LOESCHE⁶¹ (1993), descreveu que uma placa em repouso produz basicamente ácidos acético e propiônico e uma placa exposta a sacarose produz grandes quantidades de ácido láctico. Os vários ácidos produzidos pela placa em repouso, além de estarem presentes em pequena quantidade não são capazes de formar complexos com o cálcio. Em outras palavras, eles não possuíam grande capacidade de desmineralização do esmalte. Quando a sacarose está presente, o perfil ácido da placa se altera significativamente, porque há um aumento de seis vezes na concentração de ácidos e estes incluem os ácidos succínico e láctico, os quais podem formar complexos com o cálcio. Assim a sacarose é metabolizada em uma série de ácidos capazes de desmineralizar a superfície do esmalte dental. Qualquer queda no pH origina condições para o ácido produzido pela placa dental se difundir para dentro do esmalte onde solubiliza a hidroxiapatita, liberando íons cálcio e fosfato. O íon lactato forma complexos com o cálcio, nas camadas da superfície do esmalte, enquanto os íons menores de hidrogênio se difundem para as camadas mais profundas, causando a desmineralização característica da lesão incipiente. A quantidade de polissacarídeos de reserva, formados pela placa, mantém as condições ácidas na mesma, bem além do período em que a sacarose está na boca. Segundo a pesquisa de DIBDIN et al²¹. (1995), onde avaliaram a variação do pH na placa dental de dois grupos de pacientes, sendo um com uso de sacarose na dieta, e outro com ausência de sacarose,

concluíram que, em ambos os grupos ocorre queda do pH da placa, mas onde a sacarose estava presente, esta queda se manteve por um período mais longo.

BREX et al¹⁰. (1981), descrevem que os polissacarídeos sintetizados pelos microrganismos da placa a partir da sacarose podem ser importantes em dois aspectos, a saber, como reserva de energia e como constituintes da matriz da placa. Estes polissacarídeos extracelulares compreendem dextranos, mutanos e levanos, os quais são sintetizados pelas bactérias a partir da sacarose. Polissacarídeos intracelulares são produzidos como grânulos de reserva por muitas espécies bacterianas a partir de vários carboidratos tais como glucose, frutose e sacarose. Os resultados desta pesquisa indicam que frequentes bochechos com água, glucose ou sacarose não tem influência detectável sobre a morfologia ou quantidade de placa no estágio inicial da aderência bacteriana. Porém, demonstram que, uma relação dos possíveis efeitos dos carboidratos sobre os estágios avançados da formação da placa, parece estar fundamentada.

Um estudo envolvendo dietas ricas em sacarose e maltose, na qual amostras de dois dias de placa de 24 indivíduos, colhidas antes e durante 2 períodos de 25 dias, foi realizado por SKINNER et al⁷⁹. (1982). Os resultados mostraram que a concentração de polissacarídeos extracelulares na placa foi menor no grupo maltose em relação ao grupo sacarose. De acordo com RÖLLA et al⁷⁵. (1985), a sacarose é conhecida por possuir um maior potencial para induzir cáries do que a glucose e a frutose, apesar do fato dos monossacarídeos causarem uma alta ou 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. CARLSSON¹¹ (1986), em seus estudos, chama a atenção para um 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. Durante um simpósio, MARGOLIS⁶⁶ (1990), demonstrou que 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.

Na tentativa de encontrar um açúcar que substituísse a sacarose, IKEDA et al⁴⁷. (1990) avaliaram a formação de placa e a produção de ácido láctico por amostras de *S. mutans* a partir de um meio de cultura contendo Nystose. Os resultados mostraram que o carboidrato utilizado (Nystose) não serviu como substrato para a produção de glucano através da enzima glicosiltransferase sintetizada pelo *S. mutans*; a aderência celular às superfícies de vidro foi quase nula; na presença de sacarose a Nystose inibiu a atividade da glicosiltransferase produzida pelo *S. mutans*; e o número de cáries em ratos alimentados com dieta contendo Nystose, e infectados com *S.*

sobrinus, foi significativamente menor quando comparado com os ratos alimentados com sacarose.

FU et al³⁴. (1991), compararam o efeito da espessura da placa sobre a retenção de glucose e ácidos orgânicos produzidos por placas contendo ou não glucanos, utilizando um modelo intra-oral de desmineralização do esmalte. Seus resultados mostraram que a presença de glucano aumenta o índice de difusão e produção de ácido na camada mais profunda da placa adjacente à superfície dental. Estudando a velocidade de formação de placa bacteriana *"in vitro"*, MACPHERSON & DAWES⁶³ (1991), concluíram que quanto mais rápido for a formação da placa, maior será a queda de pH do meio onde as bactérias foram cultivadas.

OLSSON et al⁷¹. (1992), avaliaram *"in vitro"* a capacidade de adesão bacteriana a superfícies de vidro normais e superfícies de vidro tratados com óxido de polietileno, a fim de torná-las hidrofóbicas. Os resultados mostraram que as superfícies submetidas ao tratamento com óxido de polietileno sofreram um menor ataque bacteriano em relação às superfícies de vidro normais. MARGOLIS et al⁶⁷. (1993), sugerem que o potencial cariogênico da placa *"in vivo"* pode também ser influenciado pelos polímeros que constituem parte da matriz da placa. Citam como exemplo, evidências que indicam que polímeros tais como 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 na placa. Um aumento na porosidade da placa pode, portanto, levar a um aumento da acidogênese bacteriana. Segundo DE SOET et al²⁰. (1991),

analisando as diferenças no potencial cariogênico entre *S. mutans* e *S. sobrinus*, verificou que o número de lesões cáries em ratos colonizados por *S. mutans* foi significativamente menor que os colonizados por *S. sobrinus*, e o *S. sobrinus* também produziu ácidos mais rápido, ocasionando uma queda mais brusca do pH, quando comparado ao *S. mutans*. Os autores sugerem que estes resultados se devem a diferenças nas propriedades glicolíticas entre as duas espécies.

RUSSEL⁷⁶ (1994), confirma a importância de bactérias específicas na etiologia das cáries dentais e doenças periodontais. Ainda neste trabalho, o autor defende o desenvolvimento de meios preventivos baseados no entendimento do metabolismo destas espécies bacterianas específicas, através de estudos moleculares que revelem os fatores de virulência a serem inibidos.

A análise detalhada da literatura disponível, demonstra uma preocupação constante dos pesquisadores em ampliar os conhecimentos que envolvem o estudo da cárie dentária, que ainda hoje é a patologia de maior frequência nas populações, de modo geral. Nesse sentido, vários estudos tem contribuído para um maior entendimento da microbiota oral envolvida na iniciação e desenvolvimento das lesões de cárie. O fato dos estreptococos grupo mutans, permanecerem como os microrganismos mais íntimamente relacionados à cárie e a necessidade de se conhecer melhor os mecanismos que tornam esses microrganismos os principais indutores da placa dental, produtores de polissacarídeos extracelulares e ácidos, com ênfase na correlação destes fatores de virulência com o potencial indutor de lesões

caríosis dessas espécies, tem levado os pesquisadores a ampliar os estudos nessa área de atuação.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Origem do Grupo Experimental

Para o presente estudo, foram utilizadas espécies de estreptococos do grupo mutans isoladas e identificadas bioquimicamente a partir de amostras salivares de escolares da região de Piracicaba S. P., pertencentes ao acervo de microrganismos da Disciplina de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP. As amostras de saliva foram coletadas de crianças entre 6 e 9 anos de idade (de ambos os sexos), sem distinção de raça ou cor e que não estavam fazendo uso de antibióticos ou de qualquer outra medicação impediente. As espécies foram identificadas através de testes bioquímicos (fermentação de carboidratos) de acordo com o Manual de BERGEY's (HARDIE⁴⁴, 1986) como *S. mutans*, *S. mutans* V, *S. sobrinus*, *S. rattus*, *S. cricetus*, *S. ferus* e *S. downei*.

Estavam disponíveis para esta pesquisa 150 (cento e cinquenta) amostras de *Streptococcus mutans* I, 27 (vinte e sete) de *S. sobrinus*, 15 (quinze) de *S. rattus*, 09 (nove) de *S. mutans* V e apenas uma amostra de *S. cricetus*, *S. downei* e *S. ferus*, totalizando 204 amostras de estreptococos do grupo mutans mantidas sob congelamento (freezer -20° C), separadas em alíquotas de 5,0 mL em meio de cultura a 10% de glicerol em B.H.I. (Brain Heart Infusion – Difco), segundo TENOVUO et al⁸². (1992).

3.2 Determinação Bioquímica da Viabilidade das Amostras

Testes bioquímicos, seguindo-se os critérios adotados pelo Manual de BERGEY'S (HARDIE⁴⁴, 1986) como a reação de fermentação de carboidratos (manitol) e a reação de peróxido de hidrogênio, foram feitos para a determinação da viabilidade e da ausência de contaminação das cepas de estreptococos do grupo mutans mantidas no laboratório de Microbiologia e Imunologia da FOP-UNICAMP.

3.2.1 Fermentação de Carboidratos (manitol)

O meio base para esta prova bioquímica foi preparado conforme recomendado por FACKLAM²⁹ (1972), ou seja: Caldo de Infusão de Cérebro e Coração (B.H.I. – Difco) e extrato de levedura acrescido de 0,0016% de púrpura de bromocresol (Sigma). Após a dissolução dos componentes em água destilada e o pH acertado para 7,0, o substrato manitol foi adicionado na proporção de 1,0%. A solução foi distribuída em tubos, em porções de aproximadamente 3,0 mL os quais foram autoclavados a 120° C por 20 minutos. Após a esterilização do meio de cultura, os tubos foram etiquetados de acordo com a numeração das espécies, previamente identificadas. Foram inoculadas duas alçadas de cada amostra, diretamente do estoque, nos respectivos tubos e a incubação realizada a 37° C por até 48 horas a 10% CO₂ (Water-Jacked CO₂ Incubators / Cole Parmer Instruments – USA), sendo a primeira leitura realizada após 24 horas. A prova foi considerada positiva

quando houve viragem do indicador de pH, da cor púrpura para amarela. As cepas que apresentaram resultado positivo foram repicadas em meio B.H.I.

3.2.2 Produção de Peróxido de Hidrogênio

A prova foi realizada segundo WHITTENBURY⁸⁸ (1964) para determinar se houve ou não contaminação entre as amostras de *S. mutans* e *S. sobrinus* durante o armazenamento. O meio base apresenta a composição descrita no apêndice. Os componentes foram dissolvidos em água destilada, e o pH ajustado a 7,2. O meio base foi esterilizado em autoclave a 120° C por 20 minutos. A seguir, ao meio ainda fundido e resfriado (45° C) foram adicionados 5,0 mL de uma mistura de sangue desfibrinado de carneiro e água destilada estéril, em partes iguais, sendo o meio total aquecido a 100° C durante 15 minutos, em banho-maria. Uma solução de 0,1g de ortodianisidina (Merck) em 5,0 mL de água destilada estéril, também aquecida a 100° C durante 15 minutos, foi adicionada, ainda quente, ao meio total, que em seguida foi distribuído em Placas de Petri. A semeadura a partir de uma cultura de 24 horas das cepas em BHI, consistiu em 3 picadas próximas feitas com agulha de platina diretamente no meio de cultura. As placas foram incubadas a 10% CO₂, por um período de até 7 dias a 37° C. A produção de peróxido de hidrogênio foi detectada pelo aparecimento de um halo marrom escuro ou preto em torno do crescimento.

3.3 Formação de Placa Bacteriana “*in vitro*”

Para a formação de placa “*in vitro*”, foram utilizadas culturas recentes de cada amostra das espécies do grupo mutans, previamente padronizadas pela escala de Mc Farland (tubo nº 02) em meio BHI. Uma alíquota de 0,2 mL de cada uma destas amostras foi inoculada em tubos contendo 5,0 mL de meio B.H.I. à 5,0% de sacarose (JORDAN & KEYES⁵⁰, 1966; IKEDA et al⁴⁶., 1988; IKEDA et al⁴⁷., 1990; OLSSON et al⁷¹., 1992). Para a obtenção da formação de placa “*in vitro*” pela associação de duas espécies, foram inoculadas 0,1 mL de cada espécie, e na tripla associação 0,06 mL, a fim de que o número de células de cada espécie fosse igual no mesmo inóculo, e o total de células se igualasse ao das espécies isoladas. Foram realizadas “*in vitro*” as associações mais freqüentemente encontradas na cavidade oral, segundo SPOLIDORIO⁸⁰ (1997). Os tubos com caldo sacarosado inoculados com as amostras do grupo mutans, isoladas e em associação, continham também um bastão-capilar de aproximadamente 4,0 cm, com as extremidades fechadas na chama e uma delas dobrada na forma de uma bengala (OLIVEIRA⁷⁰, 1974). Os tubos foram incubados à 37° C durante 48 horas em estufa a 10% CO₂.

Após este período de incubação, foram observados os padrões de crescimento aderente à superfície lisa do bastão-capilar (placa “*in vitro*”), seguindo os critérios estabelecidos por OLIVEIRA⁷⁰, 1974, cuja leitura se deu com base em:

- (-) ausência de crescimento aderente a bengala;
- (+) crescimento não saliente sobre a bengala;
- (++) crescimento saliente sobre a bengala;
- (+++) crescimento saliente e abundante sobre a bengala.

Para efeito de quantificação da produção de placa "*in vitro*", pesou-se o bastão-capilar antes das amostras serem inoculadas no meio BHI à 5,0% de sacarose, e após o período de incubação. Com este procedimento, foi possível quantificar a produção de placa úmida "*in vitro*" formada por cada espécie do grupo mutans, separadamente e em associação, possibilitando uma avaliação comparativa entre elas.

3.4 Produção de Ácidos

Para a determinação da capacidade de produção de ácido pelas amostras de estreptococos do grupo mutans - isoladas e em associação - utilizaram-se medições contínuas, em intervalos de tempo crescentes, do pH do meio de cultura onde estas espécies foram cultivadas. As amostras foram previamente inoculadas em meio B H I e incubadas a 37° C por 24 horas a 10% CO₂, para obtenção de culturas recentes, antecipadamente padronizadas pela escala de Mc Farland (tubo nº 2). Após este período de incubação, alíquotas de 0,2 mL de cada espécie foram inoculadas em meio B H I à 5% de sacarose. Para a associação de duas espécies do grupo mutans, foram inoculadas alíquotas de 0,1 mL de cada espécie, e na tripla associação 0,06

mL, a fim de que o número de células de cada espécie fosse o mesmo e o total de células inoculadas nas associação igual ao das espécies isoladas. As medições realizaram-se em intervalos de tempo pré-estabelecidos, modificados a partir de alguns padrões encontrados na literatura (STEPHAN⁶¹, 1944; LOESCHE⁶¹, 1993), sendo a primeira medição no momento da inoculação (zero hora) e as seguintes em 6, 12, 24 e 48 horas após, de modo que o período total de incubação fosse dividido em períodos regulares e crescentes, possibilitando uma avaliação das quedas de pH durante todo o período de crescimento das amostras.

3.5 Determinação da Concentração de Polissacarídeos Extracelulares Presentes na placa “*in vitro*”

3.5.1 Determinação de Carboidrato Total Solúvel em Ácido

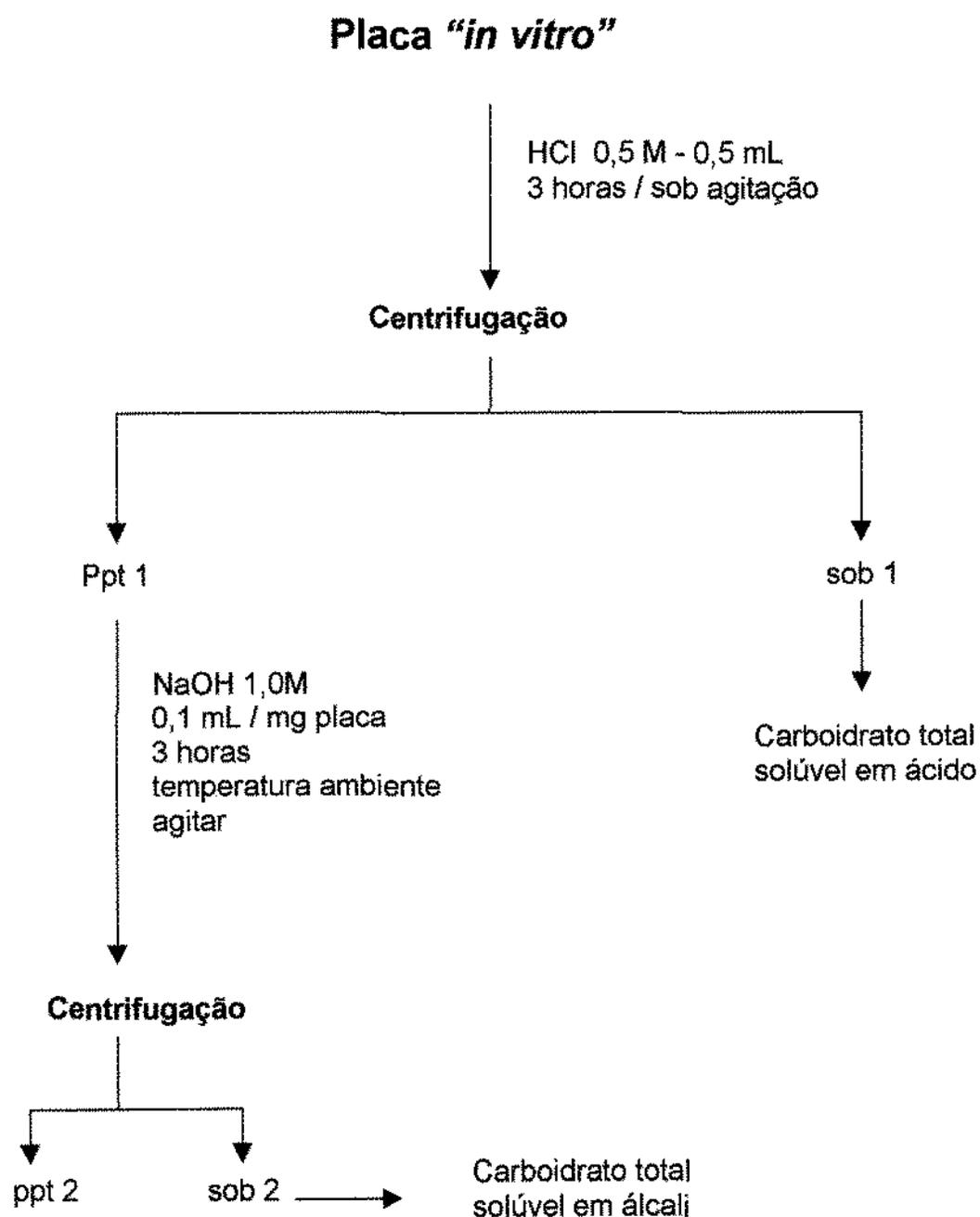
A determinação de carboidratos solúveis na amostra, foi realizada pelo método de dosagem de carboidratos totais (DUBOIS et al²⁴, 1956; REBELO⁷⁴, 1994), o qual se baseia na reação de um açúcar quando na presença de um ácido forte (H₂SO₄), formando compostos furfúricos a partir de uma pentose ou hexose. Os compostos furfúricos na presença de fenol obtêm uma coloração laranja, cuja intensidade é proporcional ao teor de açúcar presente na amostra. Decorridos 20 minutos, a intensidade da cor foi medida em espectrofotômetro digital (MICRONAL B342 II) a 490 nm. O resultado foi

expresso em μg / mg de placa "*in vitro*", a partir de uma reta padrão pre-determinada de concentrações crescentes de sacarose (Esquema 1).

3.5.2 Determinação de Carboidrato Total Solúvel em Álcali

A determinação de polissacarídeos solúveis em álcali contidos na amostra foi realizada pelo método de dosagem de açúcar total (DUBOIS²⁴ et al, 1956; REBELO⁷⁴, 1994) já descrito, e as dosagens foram feitas em espectrofotômetro digital (MICRONAL B 342 II). O resultado foi expresso em μg / mg de placa "*in vitro*".

Esquema 1. Tratamento da placa *"in vitro"* para determinação da concentração de carboidratos totais solúveis em ácido e em álcali.



RESULTADOS



4. RESULTADOS

Os resultados obtidos dos tipos de depósito aderente ao bastão-capilar obtidos após a incubação das amostras de estreptococos grupo mutans, estão expressos na Figura I. Com relação a quantificação da produção de placa bacteriana "in vitro" pelas espécies de estreptococos grupo mutans, isoladas e em associação, os dados encontram-se descritos na Tabela I e Figura II.

Entre as amostras analisadas, a espécie *Streptococcus rattus* apresentou maior produção de placa bacteriana (19,70 mg), não apresentando diferença estatisticamente significativa em relação a associação *S. mutans* / *S. sobrinus* (10,32 mg), mas sim, em relação às demais espécies isoladas e em associação, de acordo com o Teste de Tukey, considerando-se como nível mínimo de significância (n.m.s.) 5%. As espécies *S. ferus*, *S. cricetus* e *S. downei* apresentaram valores de 26,50 mg, 11,10 mg e 4,0 mg, respectivamente. Estes valores não puderam ser avaliados estatisticamente devido à existência de apenas uma amostra destas espécies em particular e, deste modo, não ser possível a realização de repetições experimentais para obtenção de valores médios.

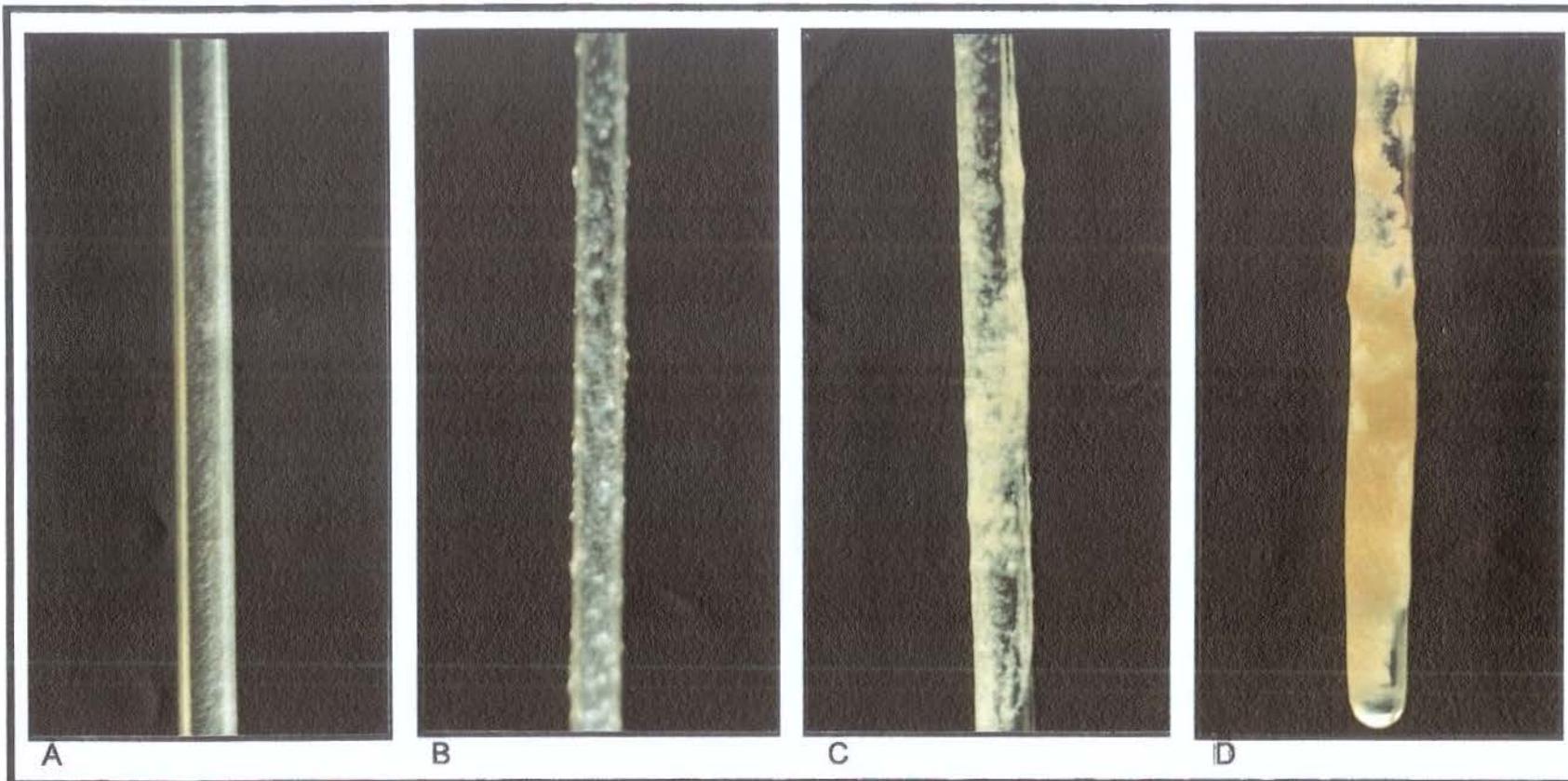


Figura I – Tipos de depósito aderente obtido no teste de formação de placa bacteriana *in vitro*: A- (-) ausência de depósito; B- (+) depósito escasso; C- (++) depósito saliente; D- (+++) depósito saliente e abundante.

Tabela I – Valores médios da produção de placa bacteriana “*in vitro*”, por estreptococos grupo mutans com espécies isoladas e em associação.

Espécies de estreptococos grupo mutans isoladas e em associação	mg – placa / 48 hs*	
	\bar{x}	DP**
<i>S. rattus</i>	19,70 ^A	±15.5
<i>S. mutans</i> / <i>S. sobrinus</i>	10,32 ^{AB}	±7,4
<i>S. mutans</i> / <i>S. mutans</i> V	9,82 ^B	±3.8
<i>S. mutans</i>	9,35 ^B	±5.8
<i>S. mutans</i> V	9,22 ^B	±8.4
<i>S. sobrinus</i>	8,45 ^B	±3.6
<i>S. mutans</i> / <i>S. rattus</i>	8,02 ^B	±6.0
<i>S. mutans</i> / <i>S. sobrinus</i> / <i>S. rattus</i>	7,11 ^B	±3.3

* médias seguidas pela mesma letra não diferem entre sí pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$).

** desvio padrão.

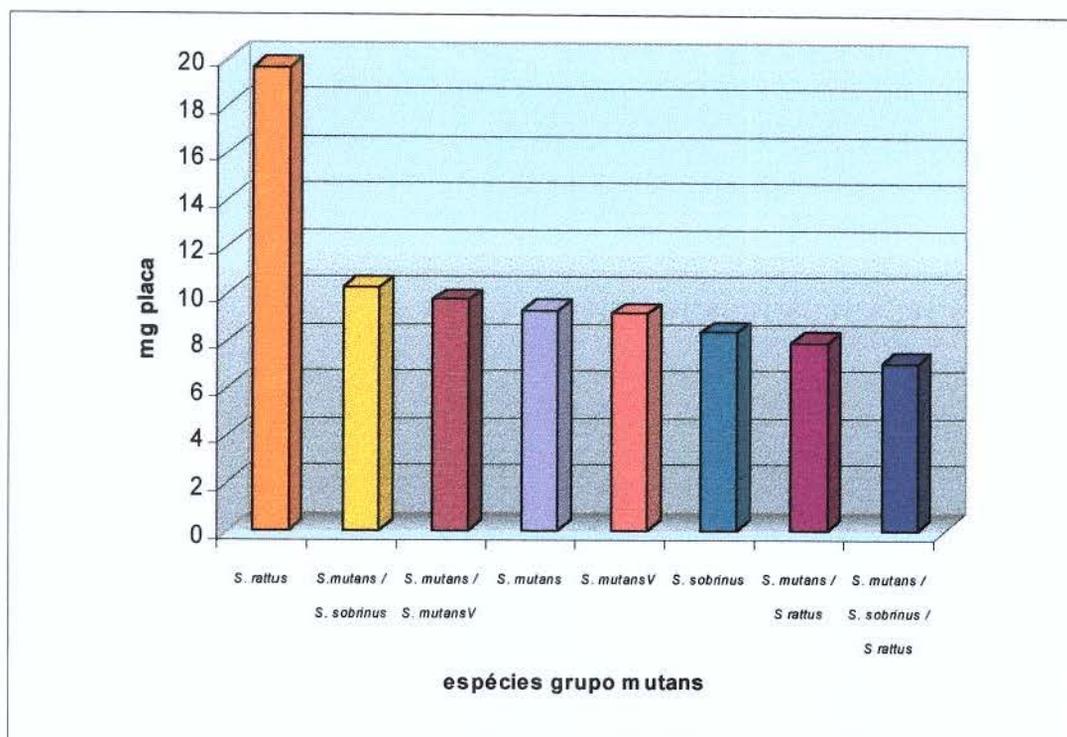


Figura II - Valores comparativos da produção de placa bacteriana “*in vitro*”, por estreptococos grupo mutans com espécies isoladas e em associação.

Os resultados da Tabela II e Figura III, indicam os valores médios da produção de carboidratos totais solúveis em ácido, pelas espécies de estreptococos grupo mutans, isoladas e em associação. A análise de variância, não demonstrou diferenças estatisticamente significantes entre as médias, devido ao alto coeficiente de variação dos valores obtidos. As espécies que apresentaram a maior produção de carboidratos totais solúveis em ácido, foram o *S. mutans* e o *S. sobrinus*, isoladamente, com valores de 6,89 $\mu\text{g}/\text{mg}$ e 5,12 $\mu\text{g carb.}/\text{mg placa}$, respectivamente. Para as espécies *S. ferus*, *S. cricetus* e *S. downei* os resultados encontrados foram: 2,57 $\mu\text{g carb.}/\text{mg placa}$, 13,41 $\mu\text{g carb.}/\text{mg placa}$ e 72,37 $\mu\text{g carb.}/\text{mg placa}$ respectivamente, porém estes valores não puderam ser submetidos

na avaliação estatística devido a existência de apenas uma amostra de cada espécie, como já descrito anteriormente.

Tabela II- Produção de carboidratos totais solúveis em ácido, por estreptococos grupo mutans com espécies isoladas e em associação.

Espécies de estreptococos grupo mutans isoladas e em associação	µg carb. / mg placa*	
	\bar{x}	Dp
<i>S. mutans</i>	6,89	±4.6
<i>S. sobrinus</i>	5,12	±1.2
<i>S. mutans</i> / <i>S. mutans</i> V	5,09	±1.8
<i>S. rattus</i>	4,77	±3.3
<i>S. mutans</i> / <i>S. sobrinus</i>	4,64	±0.9
<i>S. mutans</i> V	4,53	±3.6
<i>S. mutans</i> / <i>S. rattus</i>	4,42	±2.6
<i>S. mutans</i> / <i>S. sobrinus</i> / <i>S. rattus</i>	3,72	±0.8

* valores médios e desvio padrão. - µg carboidratos totais solúveis em ácido / mg de placa "in vitro". De acordo com Teste Tukey.

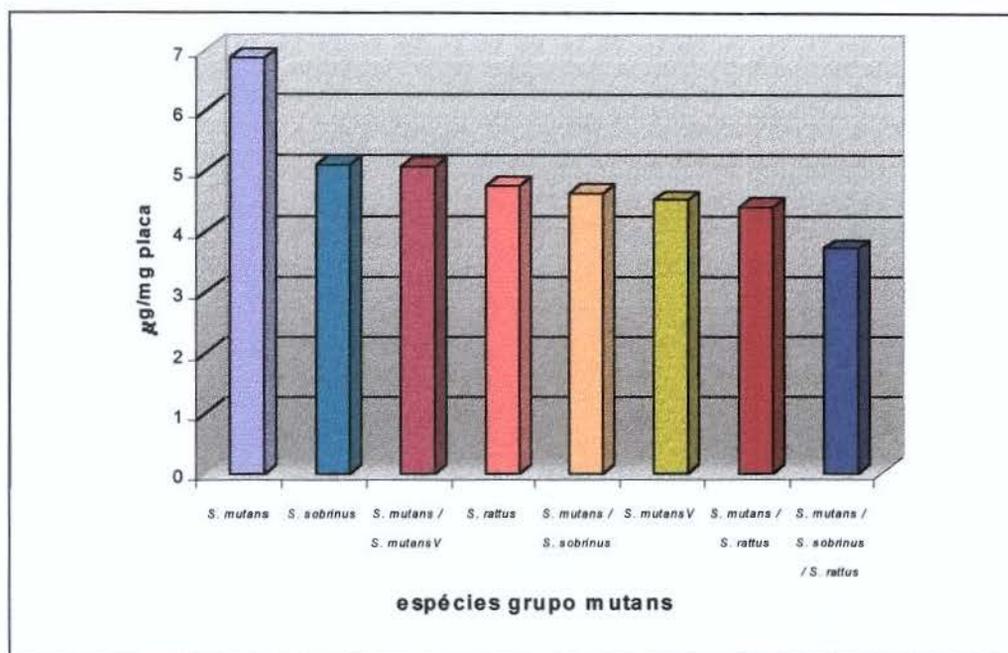


Fig. III – Valores comparativos da produção de carboidratos totais solúveis em ácido, por estreptococos grupo mutans com especies isoladas e em associação.

Os valores da produção de carboidratos totais solúveis em álcali, acham-se expressos na Tabela III e Figura IV. A espécie *S. mutans* (6,62 µg/mg) apresentou um valor médio superior, às demais, mas sem diferença estatisticamente significativa, ao contrário da tripla associação *S. mutans* / *S. sobrinus* / *S. rattus* na qual se observa valores inferiores (1,76 µg/mg), avaliados ao nível mínimo de significância de 5%. As espécies *S. ferus*, *S. cricetus* e *S. downei* demonstraram valores de 1,59 µg/mg, 6,47 µg/mg e 56,41 µg/mg de placa “*in vitro*”, respectivamente.

Tabela III - Produção de carboidratos totais solúveis em álcali, por estreptococos grupo mutans com espécies isoladas e em associação.

espécies de estreptococos grupo mutans isoladas e em associação	µg carb. / mg placa*	
	\bar{x}	DP
<i>S. mutans</i>	6,62 ^A	±3.1
<i>S. sobrinus</i>	3,44 ^{AB}	±2.2
<i>S. rattus</i>	3,34 ^{AB}	±2.4
<i>S. mutans</i> V	3,04 ^{AB}	±2.4
<i>S. mutans</i> / <i>S. mutans</i> V	3,02 ^{AB}	±1.3
<i>S. mutans</i> / <i>S. rattus</i>	2,92 ^{AB}	±1.6
<i>S. mutans</i> / <i>S. sobrinus</i>	2,76 ^{AB}	±1.9
<i>S. mutans</i> / <i>S. sobrinus</i> / <i>S. rattus</i>	1,76 ^B	±0.5

*valores médios e desvio padrão (SD) -µg carboidratos totais solúveis em álcali/mg de placa "in vitro". Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey (p< 0.05).

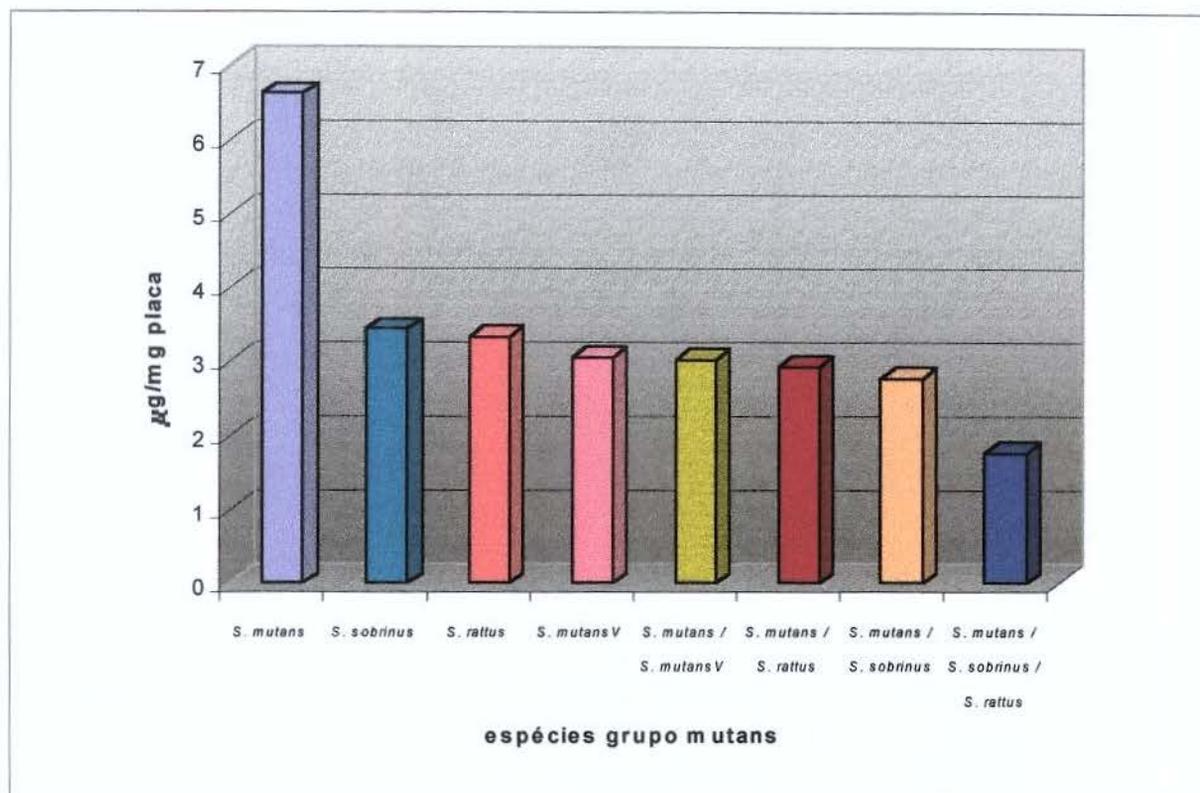


Figura IV – Valores comparativos da produção de carboidratos totais solúveis em álcali, por estreptococos grupo mutans com espécies isoladas e em associação.

Os resultados da Tabela IV e Figura V, descrevem os valores encontrados nas medições de pH do meio de cultura, onde foram cultivadas as amostras de estreptococos grupo mutans, em intervalos de tempo crescentes com as espécies isoladas e em associação, de acordo com a avaliação estatística de regressão. As curvas demonstradas na Figura V expressam quedas significativas de pH do meio de cultura para todas as amostras avaliadas, nos intervalos de tempo estabelecidos. Quedas gradativas dos níveis de pH para cada amostra nos três períodos iniciais (6, 12 e 24 horas após o inóculo), e uma elevação destes valores no período final (48 horas) são observadas. A espécie *S. mutans* apresentou as maiores quedas de pH nos intervalos de tempo inicial e final, com valores de 4,67 (6 horas) e 3,86 (48 horas). Para o período de 12 horas, a espécie

S. sobrinus produziu queda de pH mais acentuada (4,34), e para 24 horas o menor valor encontrado pertence a espécie *S. mutans* V (3,58). Todos os gráficos da figura V apresentam uma equação extraída da análise estatística das quedas de pH, permitindo a obtenção do valor do pH correspondente às amostras, isoladas e em associação, em qualquer momento do período de incubação.

Tabela IV – Valores médios de pH, em intervalos de tempo crescentes das amostras de estreptococos grupo mutans, cultivadas isoladas e em associação.

espécies de estreptococos grupo mutans isoladas e em associação	0 h	6 h	12 h	24 h	48 h
<i>S. mutans</i>	7,2	4,67	4,40	4,02	3,86
<i>S. mutans</i> / <i>S. mutans</i> V	7,2	4,91	4,63	4,28	4,43
<i>S. mutans</i> / <i>S. rattus</i>	7,2	4,93	4,68	4,38	4,53
<i>S. mutans</i> / <i>S. sobrinus</i>	7,2	4,98	4,64	4,24	4,56
<i>S. sobrinus</i>	7,2	4,74	4,34	3,84	3,97
<i>S. mutans</i> V	7,2	5,92	4,87	3,58	4,28
<i>S. rattus</i>	7,2	5,38	4,61	3,70	4,45
<i>S. mutans</i> / <i>S. sobrinus</i> / <i>S. rattus</i>	7,2	5,07	4,77	4,39	4,52
BHI / CO ₂	7,2	6,80	6,85	6,85	6,84

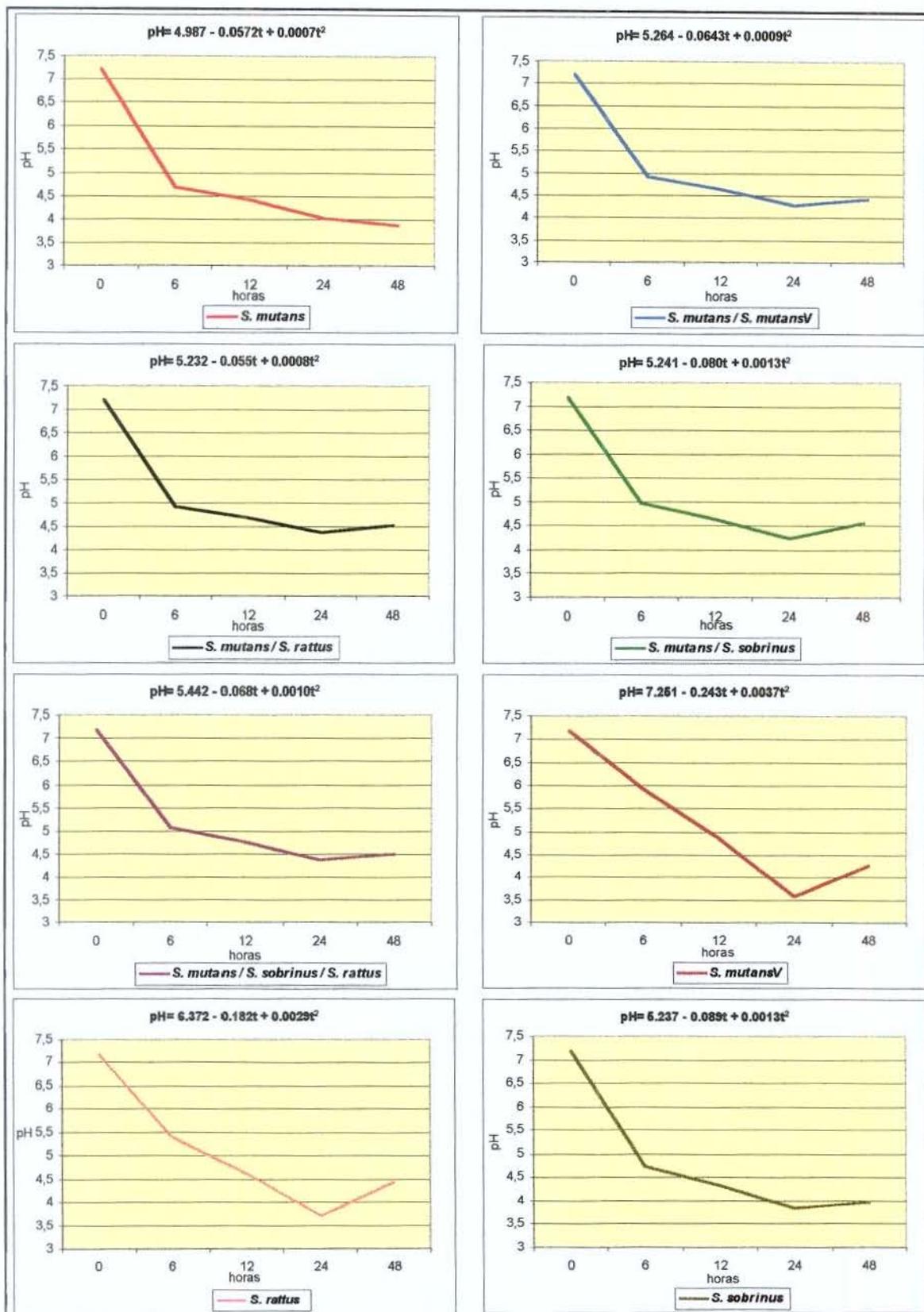


Figura V – Valores de pH em intervalos de tempo crescentes, de amostras de estreptococos grupo mutans cultivadas isoladas e em associação.

A análise de correlação entre a produção de placa bacteriana "*in vitro*" pelas espécies de estreptococos grupo mutans, isoladas e em associação, e os valores de pH do meio de cultura aferidos nos intervalos de tempo determinados são apresentados na Tabela V e Figura VI. Os valores apresentados na Tabela V mostram os índices de correlação entre os parâmetros avaliados para cada amostra. Estes dados estão acompanhados dos índices de significância que devem possuir um valor menor que 0,05, para que a correlação, positiva ou negativa, entre a produção de placa e os valores de pH, em cada intervalo de tempo, sejam estatisticamente significante ao nível de 5%.

A análise estatística de correlação entre a produção de placa "*in vitro*", e a produção de carboidratos totais solúveis em ácido e em álcali do total de amostras, estão presentes na Tabela VI e Figura VII. Os dados apresentados na Tabela VI revelam os índices de correlação entre os parâmetros avaliados, seguidos pelos índices de significância para cada amostra, cujos valores devem ser menores que 0,05, para que, estatisticamente, a correlação seja significante ao nível de 5%. Os valores obtidos para a tripla associação *S. mutans* / *S. sobrinus* / *S. rattus* não apresentaram correlação estatística entre a produção de carboidratos totais solúveis em ácido e em álcali e a produção de placa bacteriana "*in vitro*".

A Tabela VII e a Figura VIII expressam os resultados da análise de correlação entre a produção de carboidratos totais solúveis em ácido e os valores de pH das amostras, avaliados em intervalos de tempo crescentes. Os valores apresentados mostram os índices de correlação, acompanhados pelos índices de significância ao nível de 5% (n.m.s. < 0,05). Os valores expressos na Tabela VIII e Figura VIII revelam a análise de correlação entre os valores de pH alcançados nos

intervalos de tempo estabelecidos e a produção de carboidratos totais solúveis em álcali pelas amostras estudadas. Os dados correspondem aos índices da análise de correlação, seguidos pelos índices de significância ao nível de 5%, como nas avaliações anteriores. A tripla associação *S. mutans* / *S. sobrinus* / *S. rattus* não apresentou correlação estatística entre a produção de carboidratos totais solúveis em ácido e em álcali, e as quedas de pH do meio de cultura.

Tabela V – Valores dos coeficientes de correlação entre a produção de placa bacteriana e os valores de pH obtidos em intervalos de tempos crescentes por amostras de estreptococos grupo mutans, isoladas e em associação.

Espécies de estreptococos grupo mutans isoladas e em associação	coeficientes de correlação ¹ / índice de significância ² entre a produção de placa bacteriana "in vitro" e os valores de pH			
	6 h	12 h	24 h	48 h
<i>S. mutans</i>	0,1502*	-0,2096	-0,2987	0,1334
	0,1531**	0,0449	0,0038	0,2050
<i>S. mutans</i> / <i>S. mutans</i> V	-0,0327	-0,2112	-0,2561	-0,1358
	0,8499	0,2162	0,1316	0,4296
<i>S. mutans</i> / <i>S. rattus</i>	-0,2959	-0,5134	-0,5016	-0,4399
	0,0217	0,0001	0,0001	0,0004
<i>S. mutans</i> / <i>S. sobrinus</i>	-0,4323	0,0218	0,0498	-0,2158
	0,0014	0,8780	0,7257	0,1243
<i>S. sobrinus</i>	0,0893	0,0151	-0,2396	-0,2357
	0,3766	0,8811	0,0163	0,0182
<i>S. mutans</i> V	-0,0358	0,6450	0,0634	-0,5320
	0,8564	0,0002	0,7486	0,0036
<i>S. rattus</i>	0,2422	0,2830	0,2182	0,2637
	0,0623	0,0285	0,0940	0,0417
<i>S. mutans</i> / <i>S. sobrinus</i> / <i>S. rattus</i>	0,2284	0,3570	0,3587	0,4344
	0,2425	0,0622	0,0609	0,0209

** índice de significância (<0,05)

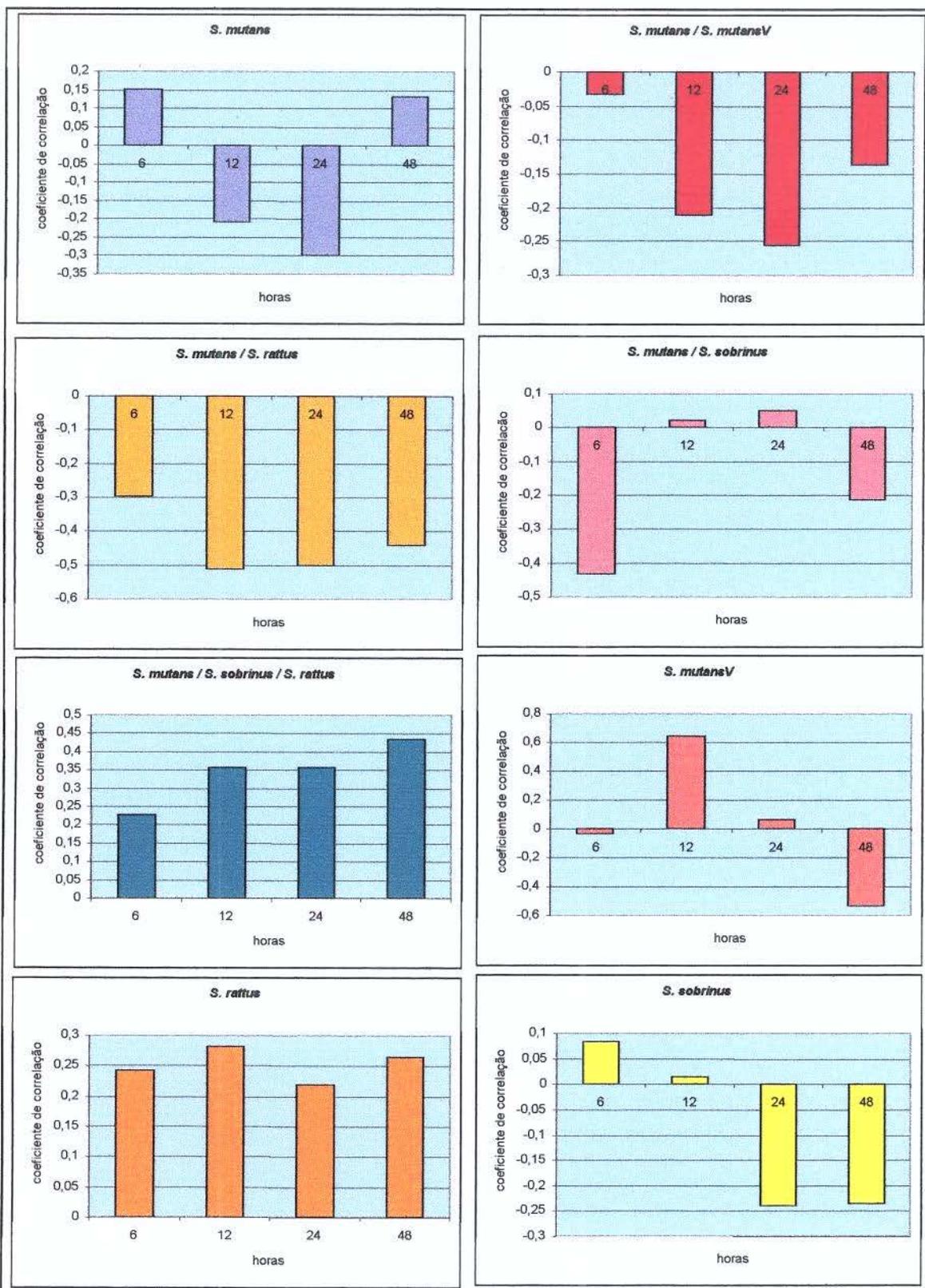


Figura VI – Coeficientes de correlação entre a produção de placa “*in vitro*” e os valores de pH em intervalos de tempo crescentes por amostras de estreptococos grupo mutans cultivadas isoladas e em associação.

Tabela VI – Valores dos coeficientes de correlação entre a produção de placa “*in vitro*” e de carboidratos totais solúveis em ácido e em álcali por amostras de estreptococos grupo mutans isoladas e em associação.

Espécies de estreptococos grupo mutans isoladas e em associação	Placa x conc. carboidratos solúveis em ácido	Placa x conc. carboidratos solúveis em álcali
<i>S. mutans</i>	-0,4669* 0,0379**	-0,2945 0,2075
<i>S. mutans</i> / <i>S. mutans</i> V	0,0200 0,9414	0,8934 0,0001
<i>S. mutans</i> / <i>S. rattus</i>	-0,7283 0,0003	-0,9689 0,0001
<i>S. mutans</i> / <i>S. sobrinus</i>	0,4397 0,0883	0,2438 0,3629
<i>S. sobrinus</i>	0,5148 0,0867	0,3167 0,2320
<i>S. mutans</i> V	-0,0787 0,7414	-0,1042 0,6618
<i>S. rattus</i>	0,9058 0,0001	0,7730 0,0001

* coeficiente de correlação.

** índice de significância (<0,05).

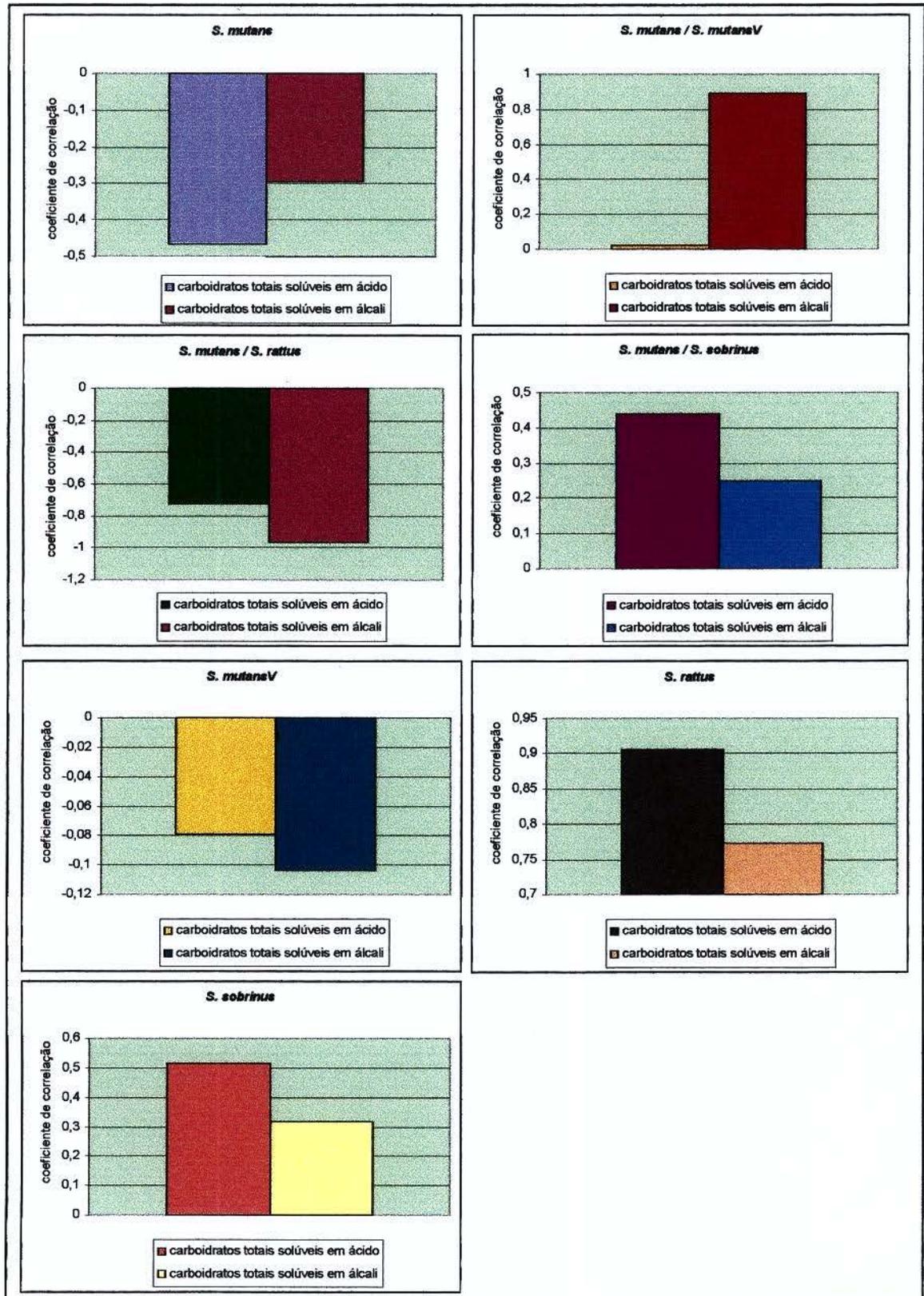


Figura VII – Coeficientes de correlação entre a produção de placa “*in vitro*” e de carboidratos totais solúveis em ácido e em álcali, por amostras de estreptococos grupo mutans cultivadas isoladas e em associação.

Tabela VII – Valores dos coeficientes de correlação entre o pH obtido em intervalos de tempos crescentes e a produção de carboidratos totais solúveis em ácido por amostras de estreptococos grupo mutans isoladas e em associação.

Espécies de estreptococos grupo mutans isoladas e em associação	coeficiente de correlação* / índice de significância** entre os valores de pH e a produção de carboidratos totais solúveis em ácido			
	6 h	12 h	24 h	48 h
<i>S. mutans</i>	-0,6880*	0,0560	0,1109	-0,3744
	0,0008**	0,8145	0,6415	0,1039
<i>S. mutans</i> / <i>S. mutans</i> V	0,0312	-0,4423	0,8110	-0,9428
	0,9085	0,0862	0,0001	0,0001
<i>S. mutans</i> / <i>S. rattus</i>	0,6603	0,7211	0,8206	0,8344
	0,0015	0,0003	0,0001	0,0001
<i>S. mutans</i> / <i>S. sobrinus</i>	0,4672	-0,1378	-0,0891	-0,3310
	0,0680	0,6106	0,7426	0,2103
<i>S. sobrinus</i>	-0,0387	0,5388	-0,6104	0,7153
	0,9049	0,0707	0,0350	0,0048
<i>S. mutans</i> V	0,1586	-0,4613	0,9108	0,8663
	0,5041	0,0406	0,0001	0,0001
<i>S. rattus</i>	-0,1212	0,8026	0,2083	-0,1063
	0,6107	0,0001	0,3781	0,6555

** índice de significância (<0,05).

Tabela VIII - Valores dos coeficientes de correlação entre o pH obtido em intervalos de tempos crescentes e a produção de carboidratos totais solúveis em álcali por amostras de estreptococos grupo mutans isoladas e em associação.

Espécies de estreptococos grupo mutans isoladas e em associação	coeficiente de correlação [*] / índice de significância ^{**} entre os valores de pH e a produção de carboidratos totais solúveis em álcali			
	6 h	12 h	24 h	48 h
<i>S. mutans</i>	-0,5323* 0,0157**	0,1187 0,6182	-0,0459 0,8477	-0,5644 0,0095
<i>S. mutans / S. mutansV</i>	0,8097 0,0001	0,4396 0,0884	0,8921 0,0001	-0,2344 0,3822
<i>S. mutans / S. rattus</i>	0,8177 0,0001	0,8073 0,0001	0,7049 0,0005	0,5877 0,0064
<i>S. mutans / S. sobrinus</i>	0,6577 0,0056	-0,1964 0,4658	-0,0873 0,7477	-0,2769 0,2991
<i>S. sobrinus</i>	-0,0287 0,9158	0,2576 0,3353	0,4347 0,0924	-0,8459 0,0001
<i>S. mutansV</i>	0,2998 0,1989	-0,3481 0,1325	0,9664 0,0001	0,9119 0,0001
<i>S. rattus</i>	0,1172 0,6226	0,7427 0,0002	-0,2113 0,3710	-0,8459 0,0001

** índice de significância (<0,05).

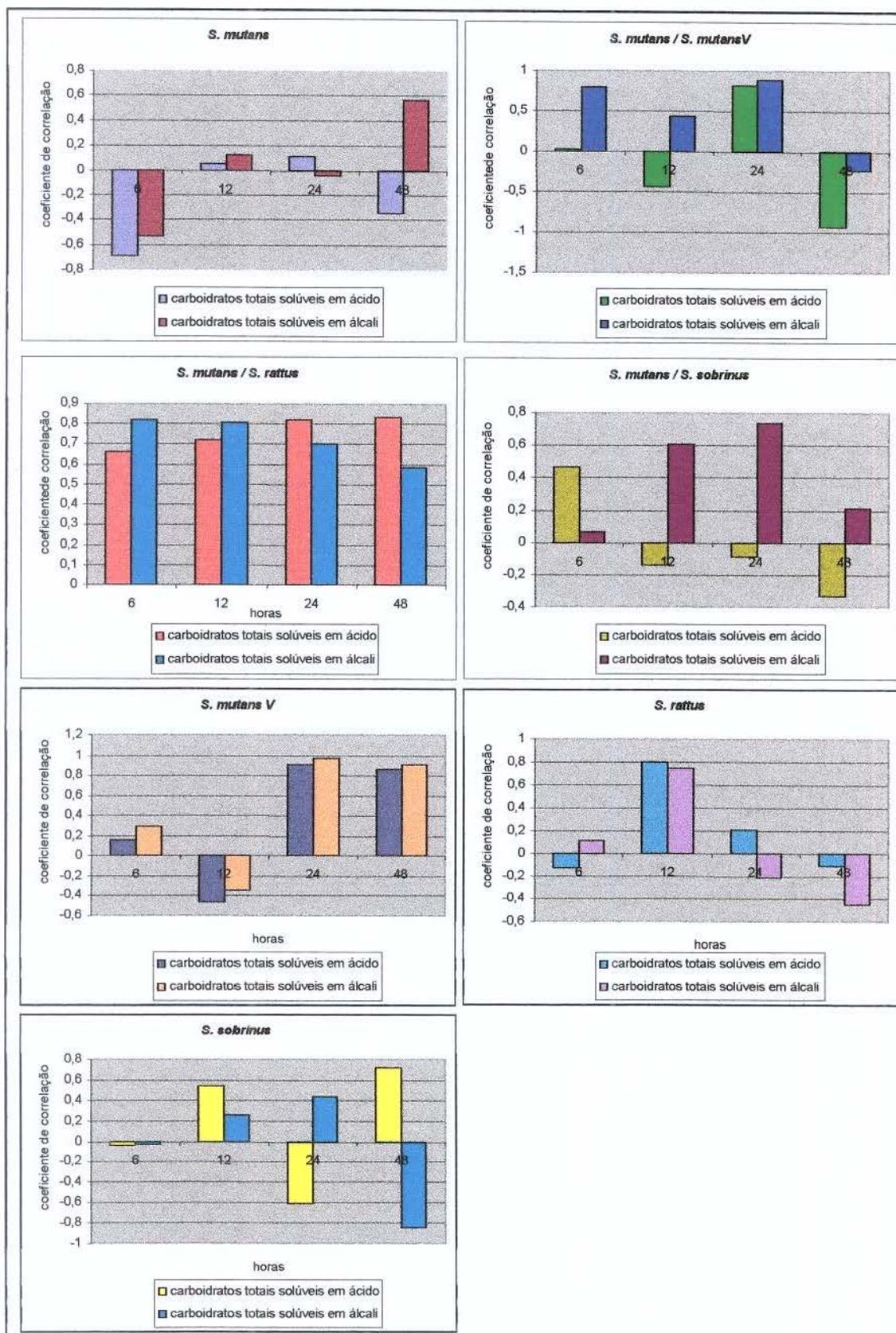


Figura VIII – Coeficientes de correlação entre a produção de carboidratos totais solúveis em ácido e em álcali, e os valores de pH em intervalos de tempo crescentes por amostras de estreptococos grupo mutans cultivadas isoladas e em associação.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

A adesão dos estreptococos grupo mutans às superfícies dentárias tem sido estudada desde que o seu isolamento na cavidade bucal foi correlacionado com a cárie dentária (FITZGERALD et al³³, 1960; KRASSE⁵⁹, 1966; BOWEN⁸, 1969; LOESCHE & SYED⁶², 1973). A observação da formação da placa bacteriana "*in vitro*", através da utilização de bastões-capilares ou lamínulas, mergulhados em meio sacarosado, se mostrou um recurso importante - como modelo experimental - nos estudos da capacidade de adesão destes microrganismos à superfícies lisas, como fator de virulência levados a efeito nas últimas décadas (OLIVEIRA⁷⁰, 1974; IKEDA et al⁴⁶, 1988).

A observação do crescimento bacteriano aderente ao bastão-capilar em meio de cultura sacarosado (5%), a partir de culturas recentes de estreptococos grupo mutans, isolados e em associação, foi feita objetivando-se estudar o desenvolvimento da placa dentária "*in vitro*", visualizada através dos depósitos bacterianos. Como se pode notar na Figura I, ao final do período de incubação, obteve-se diferentes formas de agregação bacteriana "*in vitro*", semelhantes aos modelos obtidos por JÜRGENSEN & ARAÚJO⁵¹ (1967) e OLIVEIRA⁷⁰ (1974) em pesquisas dessa natureza. Os resultados obtidos na quantificação da placa bacteriana, pelas espécies de estreptococos grupo mutans, isoladamente e em associação, demonstraram valores médios entre 7,11mg para a tripla associação *S. mutans* / *S. sobrinus* / *S. rattus* e 19,70 mg para a espécie *S. rattus*, descritos na Tabela I e Figura II. O valor encontrado

para a espécie *S. rattus* (19,70 mg) isoladamente, se mostrou estatisticamente superior às demais espécies, demonstrando, através desse parâmetro de avaliação, uma maior capacidade de adesão quando comparado às outras amostras estudadas. As espécies *S. mutans* e *S. sobrinus* quando testadas em conjunto, também demonstraram valores elevados (10,32 mg de placa "in vitro") em relação às demais amostras analisadas, o que sugere um maior potencial cariogênico dessas espécies, devido a maior capacidade de adesão à superfícies lisas quando cultivadas em associação. Tais resultados confirmam - de certa forma - os estudos "in vitro" e "in vivo" levados a efeito por SCHEININ⁷⁷ (1970), GAWRONSKI et al³⁵. (1975), SKINNER et al⁷⁹. (1982), IKEDA et al⁴⁷. (1990), LINDQUIST & EMILSON⁶⁰ (1991), HIROSE et al⁴⁵. (1993) e LOESCHE⁶¹ (1993). As espécies *S. mutans* e *S. sobrinus*, isoladamente, produziram menor quantidade de placa bacteriana, comparando-se com a produção dessas mesmas espécies quando cultivadas em associação, confirmando também, os dados de EMILSON²⁸ (1983), DAVEY & ROGERS¹⁹ (1984), KÖHLER & BJARNASON⁵⁶ (1987), AZEVEDO³ (1988) e TORRES⁶⁴ (1991), os quais demonstraram uma associação positiva entre essas duas espécies. Esses autores, afirmam ainda, que o índice de cárie foi maior em crianças que possuíam a combinação *S. mutans* / *S. sobrinus*, quando comparado com o índice de crianças que possuíam apenas *S. mutans*. Em contraposição a essas afirmações, IKEDA et al⁴⁶. (1988) demonstraram, através de experimentos "in vitro", que após 18 horas da inoculação de quantidades iguais de *S. mutans* e *S. sobrinus*, as células da espécie *S. sobrinus* estavam completamente mortas. Em complemento, o *S. mutans* inibiu

a formação da placa "in vitro" pelo *S. sobrinus* quando inoculados ao mesmo tempo, e eliminou a placa "in vitro" pré-formada pelo *S. sobrinus* quando inoculado após 24 horas. Os autores consideram que os *S. mutans* produzem substâncias antibacterianas específicas capazes de invadir a placa dental e inibir o desenvolvimento de outras espécies do grupo mutans, o que justificaria, em parte, um maior potencial cariogênico desses microrganismos e de certa forma, a sua prevalência na placa dentária quando comparada à presença de outras espécies. Esses dados, não invalidam, no entanto, a sugestão da existência de uma associação positiva entre as espécies *S. mutans* e *S. sobrinus*, mas com maior benefício favorecendo ao *S. mutans*, quando se analisam os vários experimentos "in vivo" e "in vitro" relatados na literatura (LINDQUIST & EMILSON⁶⁰, 1991; HIROSE et al⁴⁵., 1993; BABAAHMADY et al⁴., 1998).

Várias pesquisas tem sido realizadas visando um maior conhecimento do papel dos polissacarídeos extracelulares, produzidos pelos estreptococos grupo mutans, como fator de virulência desses microrganismos (CRITCHLEY et al¹⁷., 1967; GIBBONS & VAN HOUTE³⁹, 1973; VAN HOUTE et al⁸⁶., 1977; BRECX et al¹⁰., 1981; MARGOLIS et al⁶⁷., 1993). Os dados obtidos em nossas investigações, em relação a produção de carboidratos totais solúveis em ácido e em álcali expressos na Tabelas II e III, demonstram que as espécies *S. mutans* e *S. sobrinus*, isoladamente, são os principais produtores desses polímeros, tanto solúveis em ácido como em álcali. Do ponto de vista da estrutura da placa e por conseguinte suas propriedades, os componentes mais importantes são os solúveis em álcali, que representam os

polissacarídeos estruturais da placa dental. Os resultados encontrados na presente pesquisa, mostram valores de 6,62 $\mu\text{g}/\text{mg}$ e 3,44 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de placa bacteriana para as espécies *S. mutans* e *S. sobrinus*, respectivamente, em relação a produção de carboidratos totais solúveis em álcali, demonstrando dessa forma, uma maior capacidade de produção desses componentes "in vitro", o que sugere um maior potencial cariogênico desses microrganismos, comparando-se às demais espécies do grupo mutans analisadas. FU et al³⁴. (1991) afirmam que a maior concentração de polissacarídeos solúveis em álcali levaria como consequência à uma placa dental mais cariogênica, já que quedas mais acentuadas de pH ocorreriam na interface dente-placa. Nessa linha de investigação, DIBDIN & SHELLIS²¹ (1988) e VAN HOUTE et al⁸⁵. (1989), citados por MARGOLIS et al⁶⁷. (1993), mostram que o potencial cariogênico da placa "in vivo" pode também ser influenciado pelos polímeros que constituem parte da matriz da placa. Os polissacarídeos extracelulares produzidos pelos estreptococos grupo mutans - a partir da sacarose - podem aumentar a porosidade da placa dental e em consequência a distância interbacteriana, determinando a difusão do substrato e dos ácidos produzidos por esses microrganismos. Esse mecanismo pode, portanto, ampliar a acidogênese bacteriana.

A associação *S. mutans* / *S. sobrinus*, produziu uma pequena quantidade de carboidratos totais solúveis em álcali (2,76 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de placa bacteriana). Os dados obtidos por HIROSE et al⁴⁵. (1993) e BABAAHMADY et al⁴.(1998), demonstraram uma correlação positiva entre a presença desses microrganismos juntos e o aumento dos índices de cárie, através da

identificação das espécies mais prevalentes e do exame clínico oral nas populações estudadas. É possível que as associações entre esses microrganismos com o ambiente "*in vivo*" na presença de substrato (sacarose), envolvam mecanismos mais complexos de interação microbiana com o hospedeiro, que não possam ser detectados "*in vitro*", o que justificaria, de certa forma, os achados desses autores, em contraposição aos dados por nós obtidos.

Os dados analisados referentes a capacidade "*in vitro*" das amostras de estreptococos grupo mutans, em reduzir o pH do meio onde foram cultivadas, demonstraram que a espécie *S. mutans* promoveu maior queda de pH nas medições, 6 horas após a inoculação (4,67) e ao final do período de incubação (3,86). Para os períodos de 12 e 24 horas após a inoculação, as espécies que determinaram maior queda do pH do meio foram *S. sobrinus* (4,34) e *S. mutans* V (3,58), respectivamente. Esses valores tem uma importância significativa, em relação ao potencial cariogênico de cada uma dessas espécies, isoladas e em associação, considerando-se as afirmações de CURY¹⁸ (1992) o qual mostra que o pH 5,5 na cavidade oral, é crítico, pois até este limite o produto iônico das concentrações de cálcio e fósforo na placa dental da maioria dos indivíduos é maior do que a dos íons em equilíbrio de uma suspensão de hidroxiapatita. O autor ainda ressalta, que a presença de microrganismos - como estreptococos - capazes de induzir a um pH menor que 5,5, faz com que a composição da placa dental em cálcio e fósforo torne-se inferior em relação ao produto de solubilidade da hidroxiapatita, e, deste modo, a tendência físico-química é o esmalte perder cálcio e fósforo para o meio

bucal tentando atingir um novo estado de equilíbrio em função do pH alcançado, ocorrendo como consequência a dissolução do esmalte. De acordo com os nossos dados, as amostras de estreptococos grupo mutans, isoladas e em associação, apresentaram momentos distintos em que promoveram as suas maiores quedas de pH, ao longo do período de incubação em meio sacarosado à 5%. Como pode-se notar na Tabela IV, a espécie *S. mutans* apresentou as maiores quedas de pH nos intervalos de tempo inicial (6 horas) e final (48 horas), e nos intervalos intermediários (12 horas / 24 horas), as maiores quedas de pH pertenceram às espécies *S. sobrinus* e *S. mutans* V. Esses experimentos "in vitro" quando associados àqueles obtidos por SPOLIDORIO⁸⁰ (1997), no qual foi demonstrado que escolares, entre 6 e 9 anos, de diferentes categorias sócio-econômicas, multicolonizadas por estreptococos grupo mutans, apresentaram maiores índices de cárie dental quando comparadas às crianças portadoras de apenas uma espécie, permite considerar que a associação de diferentes espécies pode favorecer a manutenção do pH abaixo dos níveis críticos por longos períodos de tempo, resultando assim, em maiores índices de cárie dental. STEPHAN⁸¹ (1944), citado por LOESCHE⁶¹ (1993), num estudo "in vivo", realizou medições comparativas de pH entre superfícies dentárias íntegras e cariadas. Os dados obtidos por esse autor, indicaram que as lesões cariosas possuíam valores de pH mais baixos que as superfícies íntegras, mostrando que a rapidez e quantidade de ácidos produzidos na placa, devem ser maiores que a capacidade tampão da saliva, impedindo assim, a neutralização dos ácidos formados na placa. MANDEL & ELLISON⁶⁵ (1981), pesquisando o papel da

saliva em relação às cáries dentárias, demonstraram que sua principal função na prevenção das lesões cariosas, deve-se a capacidade de tamponamento dos ácidos e sua ação remineralizante. Além disso, a menor velocidade do fluxo salivar e a capacidade tampão levariam à seleção - na placa dental - de espécies melhor adaptadas ao pH ácido, como o *S. mutans*, que é um dos principais microrganismos cariogênicos.

De modo geral, a saliva exerce um importante papel em relação à acidogenicidade da placa bacteriana. Nesse sentido, a neutralização dos ácidos produzidos pelos estreptococos através da capacidade tampão da saliva, reduz o potencial cariogênico desses microrganismos, mas sua atuação varia de acordo com fatores como a dieta e o fluxo salivar. Os valores de pH do meio de cultura, determinados pelas espécies de estreptococos grupo *mutans* isoladas e em associação, expressos na Tabela IV e Figura V, demonstraram quedas acentuadas do pH nas primeiras horas (24 horas) e a sua posterior tendência de restauração a valores normais (48 horas). Esses resultados "*in vitro*", se devem, provavelmente, a saturação do meio de cultura, morte celular e a diminuição de seus nutrientes ao longo do período de incubação. LOESCHE⁶¹ (1993) em seus estudos sobre este evento "*in vivo*", demonstra que o pH salivar, após o consumo de sacarose, tende a se restabelecer aos valores normais (próximos a neutralidade), devido a ação de fatores inerentes ao ambiente bucal como o fluxo e capacidade tampão da saliva, não permitindo portanto, análise comparativa entre os resultados "*in vitro*" e "*in vivo*".

A análise estatística de correlação entre os fatores de virulência das amostras de estreptococos, como a produção de placa bacteriana, produção de ácidos e polissacarídeos extracelulares, apresentou em nossos estudos, resultados variáveis e dependentes de fatores, como o tempo de incubação e as amostras analisadas. Os coeficientes de correlação entre a produção de placa bacteriana "*in vitro*" e as quedas de pH do meio de cultura, expressos na Tabela V e Figura VI, demonstram valores positivos e negativos, de acordo com a espécie - isolada ou em associação - e o intervalo de tempo, demonstrando que esses fatores não seguiram um padrão constante de correlação e proporcionalidade ao longo do período de incubação em relação ao modelo experimental usado em nossos estudos. De acordo com os autores JORDAN & KEYES⁵⁰ (1966), MACPHERSON & DAWES⁶³ (1991) e LOESCHE⁶¹ (1993), a partir de uma dieta rica em sacarose, a formação da placa bacteriana ocasiona diretamente a queda do pH da cavidade bucal pela produção de ácidos, demonstrando assim, uma correlação positiva entre esses fatores de virulência. Esses estudos, em concordância com nossos resultados, revelam o importante significado da sacarose como principal substrato utilizado pelos microrganismos da placa bacteriana na produção de ácidos.

Os dados referentes a correlação estatística entre a produção de placa bacteriana "*in vitro*" e carboidratos totais, expressos na Tabela VI e Figura VII, mostram também que os valores dos coeficientes são diversificados e variam de acordo com a amostra analisada. Como pode-se observar, esta correlação sempre apresenta uma mesma tendência entre carboidratos totais solúveis em ácido e os solúveis em álcali, mostrando uma correlação positiva

ou negativa, de acordo com a amostra. Esses resultados demonstram que a quantidade de formação da placa bacteriana após o período de 48 horas de incubação é dependente das amostras de estreptococos estudadas, isoladas e em associação, à semelhança das avaliações anteriores, não seguindo um padrão estatístico direto de correlação entre a formação de placa bacteriana e a produção de carboidratos totais, sugerindo que esses mecanismos "*in vivo*" estão sujeitos a fatores endógenos e / ou exógenos mais complexos, moduladores e determinantes do processo cariogênico. O metabolismo da sacarose da dieta pelos microrganismos bucais, com produção de ácidos e de polissacarídeos intra e extracelulares, tem uma influência específica na composição microbiana, nas atividades metabólicas e na massa da placa coronal (MENAKER⁶⁹, 1984). É possível que esses fatores não possam ser detectados "*in vitro*", o que justificaria, de certa forma, os dados obtidos nesse estudo.

Muitos pesquisadores tem estudado a associação entre os polímeros produzidos na placa dental e a cárie dentária (GUGGENHEIM & SCHROEDER⁴¹, 1962; GIBBONS & BANGHART³⁷, 1971; GIBBONS & VAN HOUTE³⁹, 1973), indicando uma correlação positiva entre a produção de placa dental e de polissacarídeos extracelulares. ASHLEY & WILSON² (1977), em suas investigações, também demonstraram uma correlação positiva entre a concentração de carboidratos da placa e a quantidade de açúcar na dieta, o que indica, ser a sacarose, o principal substrato para produção desses polímeros. Em concordância, MARGOLIS et al.⁶⁷ (1993) também sugerem que o potencial cariogênico da placa "*in vivo*" é influenciado pelos seus polímeros

constituintes, confirmando o importante papel dessas substâncias na etiologia das cáries dentárias. Nossos resultados não demonstraram uma correlação constante e direta entre a formação de placa bacteriana e a produção de carboidratos totais ao longo do experimento. Os dados obtidos em nossas investigações, mostram a existência de diferenças no metabolismo da sacarose entre as espécies de estreptococos grupo mutans, isoladas e em associação quando comparadas, demonstrando mais uma vez, a dificuldade de se estabelecer uma correlação estatística direta entre esses processos "*in vitro*".

Os resultados expressos na Figura VIII, mostram os coeficientes de correlação entre os valores de pH e a produção de carboidratos totais solúveis em ácido e em álcali, como dependentes da amostra de estreptococos grupo mutans e variáveis em cada intervalo de tempo. Esses dados mostram diferenças detectáveis entre as espécies de estreptococos grupo mutans analisadas, em relação a sua ação metabólica sobre a sacarose ao longo do período de incubação, à semelhança das correlações anteriores descritas acima, afetando diretamente o potencial cariogênico desses microrganismos quando analisados individualmente ou em associação. De acordo com a análise estatística, a produção de polissacarídeos não revelou uma correlação direta com os valores de pH obtidos nos intervalos de tempo determinados, quando todas as amostras foram testadas para esses fatores. Segundo GEDDES et al³⁶.(1978) e LOESCHE⁶¹ (1993), no entanto, há uma correlação positiva entre a produção de polissacarídeos e a manutenção das condições ácidas da placa dental. Mais uma vez, esses fatores devem

envolver mecanismos mais complexos de interação microbiana *"in vivo"*, o que justificaria, em parte, os resultados *"in vitro"* obtidos nessa pesquisa.

Os resultados obtidos da análise conjunta dos diversos fatores de virulência dos estreptococos grupo mutans estudadas, tais como a produção de placa bacteriana, ácidos e polissacarídeos extracelulares, mostram que esses determinantes são dependentes da amostra estudada, individualmente ou em associação, não apresentando assim, uma correlação estatística constante ao longo do período de incubação. Um melhor entendimento de questões dessa natureza, dependem ainda, de estudos comparativos *"in vitro"* e *"in vivo"* levados a efeito concomitantemente e que possam esclarecer melhor a correlação desses fatores, no sentido de se entender, adequadamente, os mecanismos de colonização das superfícies dentárias e as interações bacterianas entre as espécies de estreptococos grupo mutans, motivo de investigações futuras de nossa parte, dando continuidade aos estudos com ênfase ao potencial cariogênico desses microrganismos e o seu significado em relação à cárie dental.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

O conjunto de dados obtidos nesse trabalho, permitiram concluir que:

1. A espécie de estreptococos grupo mutans *S. rattus*, isoladamente, produz quantidades, estatisticamente superiores, de placa bacteriana "in vitro", quando comparada às outras amostras.
2. A associação *S. mutans* / *S. sobrinus* produz quantidades elevadas de placa bacteriana, embora sem diferença estatisticamente significativa em relação às demais amostras analisadas isoladas ou em associação.
3. As espécies *S. mutans* e *S. sobrinus*, isoladamente, produzem concentrações mais elevadas de carboidratos totais solúveis em ácido, embora não estatisticamente significativa, em relação às demais amostras.
4. A produção de carboidratos totais solúveis em álcali pelo *S. mutans*, é mais elevada embora só difira de modo significativo da produção pela associação *S. mutans* / *S. sobrinus* / *S. rattus*.

5. As amostras de estreptococos grupo mutans, isoladas e em associação, se comportam de modo diversificado, ao longo do período de incubação, apresentando momentos distintos de maior abaixamento do pH do meio de cultura.

6. A análise estatística de correlação entre a formação de placa bacteriana "*in vitro*", produção de ácidos e de carboidratos totais solúveis em ácidos e em álcali mostra resultados variáveis e dependentes do período de incubação e das amostras estudadas, isoladas ou em associação.

APÊNDICE

7. APÊNDICE

7.1 Fermentação de carboidratos (manitol):

B.H.I. (Difco)	3,7 g
Extrato de levedura (Difco)	0,5 g
Água destilada	100 mL
Manitol (Inlab)	1 g

7.2 Solução alcoólica de bromocresol:

Púrpura de bromocresol (Merck)	0,016 g
Álcool etílico (Ecibra)	1,0 mL

Para cada 100 mL do meio base de B.H.I. a 1,0% de Manitol serão adicionados 0,1 mL de solução alcoólica de bromocresol (0,0016%).

7.3 Produção de Peróxido de Hidrogênio:

Extrato de carne (Difco)	0,5 g
Extrato de levedura (Difco)	0,5 g
Tween 80 (Difco)	0,05 g
Sulfato de Manganês (Merck)	0,01 g
Ágar (Difco)	1,5 g
Água destilada q.s.p.	90,0 mL

7.4 Formação de placa bacteriana “*in vitro*”:

B.H.I. (Difco)	3,7 g
Extrato de levedura (Difco)	0,5 g
Água destilada	100 mL
Sacarose (ACS-QM)	5,0 g

7.5 Determinação da concentração de carboidratos totais solúveis em ácido e em álcali (DUBOIS et al., 1956):

HCl (Ecibra)	0,5 M
NaOH (Synth)	1,0 M

SUMMARY

8. SUMMARY

In order to analyze the cariogenic potential of some group mutans streptococci species, isolated and in association, by formation of "in vitro" bacterial plaque, production of extracellular polysaccharides and acid production capacity, strains of those microorganisms belonging to the microbial collection of Microbiology and Immunology Laboratory, Dental School of Piracicaba - UNICAMP, were isolated from saliva samples of students aged 6 - 9 years old from different socioeconomic categories and biochemically identified. One hundred fifty strains of *S. mutans*, 27 of *S. sobrinus*, 15 of *S. rattus*, 09 of *S. mutans V* and just one of *S. cricetus*, *S. ferus* and *S. downei* totalizing 204 samples, were analyzed. The quantifications of "in vitro" production of bacterial plaque, for the isolated and in association streptococci, were done by inoculation of similar amounts of recent cultures from each sample previously standardized by tube 2 of Mc Farland's scale, in tubes with BHI medium supplied with 5% of sucrose and incubated for 48 hours (37° C / 10% CO₂). In each pre-weighed tube a stick-capillary was added facilitating, by this way, the determination of "in vitro" plaque production. The acid production capacity for the samples of group mutans streptococci - isolated and in association - was demonstrated by continuous mensurations of BHI - 5% sucrose culture medium pH, in increasing intervals of time (6, 12, 24 and 48 hours after inoculation). The production of extracellular polysaccharides was determined by dosage method of total acid and alkali soluble carbohydrates. The results showed that among the analyzed samples, *S. rattus* (19.70 mg)

followed by *S. mutans* / *S. sobrinus* association (10.32 mg) produced larger amounts of "in vitro" bacterial plaque, demonstrating by this parameter, great cariogenic potential. The *S. mutans* species (6.89 $\mu\text{g}/\text{mg}$) and *S. sobrinus* species (5.12 $\mu\text{g}/\text{mg}$), separately, presented the largest production of acid soluble carbohydrates per mg of "in vitro" bacterial plaque. In relation to the production of alkali soluble carbohydrate, the *S. mutans* (6.62 $\mu\text{g}/\text{mg}$) was statistically superior to the other species, isolated and in association. Those data confirm the high cariogenic potential of this species when considering the important role of those components in the bacterial plaque formation. The determination of acid production by streptococci strains, revealed accentuated pH falls in the intervals of initial and final time, with values of 4.67 (for 6 hours) and 3.86 (for 48 hours) respectively, for the *S. mutans* species. For the period of 12 hours, the *S. sobrinus* species produced the greatest pH fall (4.34), and for 24 hours the smallest value found belonged to *S. mutans* V species (3.58). This condition favors the prolonged maintenance of pH below the critical levels (pH 5.0), corroborating the suggestion that multicolonized individuals present higher indexes of dental decay. The statistical analysis of correlation among the several studied virulence factors demonstrated variable correlations depending on the incubation period and on the group mutans streptococci strains (isolated or in association). Such fact does not indicate, according with the conditions of this research, a constant and uniform correlation among those factors.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. AHMADY, K. et al. Distribution of *S. mutans* and *S. sobrinus* at sub-sites in human approximal dental plaque. **Caries Res.**, Basel, v.27, n.2, p.135-139, 1993.
2. ASHLEY, F.P., WILSON, R.F. The relationship between dietary sugar experience and the quantity and biochemical composition of plaque in man. **Archs. oral Biol.**, Oxford, v.22, n.7, p.409-414, 1977.
3. AZEVEDO, R.V.P. **O emprego da bacteriocinotipagem (mutacinotipagem) no rastreamento epidemiológico de estreptococos do "grupo mutans"**. Tese (Doutoramento) – Instituto de Ciências Biológicas- Universidade de São Paulo, 1988. 110p.
4. BABA AHMADY, K.G. et al. Ecological study of *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* and *Lactobacillus* spp. at sub-sites from approximal dental plaque. **Caries Res.**, Basel, v.32, n.1, p.51-58, 1998.
5. BEIGHTON, D., RIPPON, H.R., THOMAS, H.E.C. The distribution of *S. mutans* serotypes and dental caries in a group of 5 to 8 year old Hampshire schoolchildren. **Br. dent. J.**, London, v.162, n.3, p.103-106, Feb. 1987.

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

6. BEIGHTON, D., RUSSEL, R.R.B., WHILEY, R.A. A sample biochemical scheme for the differentiation of *S. mutans* and *S. sobrinus*. **Caries Res.**, Basel, v.25, n.3, p.174-178, 1991.
7. _____. et al. *S. macacae* sp nov from dental plaque of monkeys. **Int. J. syst. Bact.**, Washington, v.34, p.332-335, 1984.
8. BOWEN, W.H. The induction of rampant dental caries in monkeys (*Macaca irus*). **Caries Res.**, Basel, v.3, n.3, p.227-237, 1969.
9. BRATTHALL, D. Demonstration of five serological groups of streptococcal strain resembling *S. mutans*. **Odont. Revy.**, Malmo, v.21, n.2, p.143-152, 1970.
10. BRECX, M., THEILADE, J., ATTSTROM, 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, n.2, p.157-164, Apr. 1981.
11. CARLSSON, J. Metabolic activities of oral bacteria. In: THYLSTRUP, A., FEJERSKOV, O. **Textbook of Cariology**, Copenhagen: Munksgaard, 1986. p.74-98.
12. _____. A numerical taxonomic study of human oral streptococci. **Odont. Revy.**, Malmo, v.19, n.2, p.137-160, 1968.

13. CLARK, W.B., BAMMANN, L., GIBBONS, R.J. Ability of *Streptococcus mutans* and a glucosyltransferase defective mutant to colonize rodents and attach to hydroxiapatite surfaces. **Infect. Immun.**, Washington, v.21, n.2, p.681-684, Aug. 1978.
14. COYKENDALL, A.L. Base composition of deoxyribonucleic acid isolated from cariogenic streptococci. **Archs. oral Biol.**, Oxford, v.15, n.4, p.365, Apr. 1970.
15. _____. Four types of *S. mutans* based on their genetic, antigenic and biochemical characteristics. **J. Gen. Microbiol.**, Cambridge, v.83, n.2, p.327-238, Aug. 1974.
16. _____. Proposal to elevate the subspecies of *S. mutans* to species status based on their molecular composition. **Int. J. syst. Bact.**, Washington, v.27, p.26-30, 1977.
17. CRITCHLEY, P. et al. The polymerization of dietary sugars by dental plaque. **Caries Res.**, Basel, v.1, p.112-129, 1967.
18. CURY, J.A. Uso do Fluor. In: BARATIERI, L.N. **Dentistica: procedimentos preventivos e restauradores**. 2.ed. Sao Paulo: Santos, 1992. 509p.
19. DAVEY, A.L., ROGERS, A.H. Multiple types of the bacterium *Streptococcus mutans* in the human mouth and their intra-family transmission. **Archs. oral Biol.**, Oxford, v.29, n.6, p.453-460, 1984.

20. DE SOET, J.J. et al. Differences in cariogenicity between fresh isolates of *Streptococcus sobrinus* and *Streptococcus mutans*. **Caries Res.**, Basel, v.25, n.2, p.116-122, 1991.
21. DIBDIN, G.H., SHELLIS, R.P. Analysis of the buffering systems in dental plaque. **J. dent. Res.**, Washington, v.67, p.438-446, 1988. *Apud* Op. cit Ref. 67.
22. _____, DAWES, C., MACPHERSON, L.M.D. Computer modeling of the effects of chewing sugar-free and sucrose-containing gums on the pH changes in dental plaque associated with a cariogenic challenge at different intra-oral sites. **J. dent. Res.**, Washington, v.74, n.8, p.1482-1488, Aug. 1995.
23. DRUCKER, D.B., MELVILLE, T.H. The classification of some oral streptococci of human or rat origin. **Archs. oral Biol.**, Oxford, v.16, n.8, p.845-853, Aug. 1971.
24. DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determinations of sugars and related substances. **Analyt. Chem.**, Washington, v.29, p.350-356, 1956.
25. DUNNY, G.M., BIRCH, G.H.N., CLEWELL, D.B. Isolation and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid from *S. mutans*. **J. Bacteriol.**, Washington, v.114, n.3, p.1362-1364, june 1973.

26. EDWARDSSON, S. Characteristics of caries-inducing human streptococci resembling *Streptococcus mutans*. **Archs. oral Biol.**, Oxford, v.13, n.6, p.637-646, June 1968.
27. _____, KRASSE, B. Human streptococci and caries in hamsters fed diets with sucrose or glucose. **Archs. oral Biol.**, Oxford, v.12, n.8, p.1015-1016, Aug. 1967.
28. EMILSON, C.G. Prevalence of *S. mutans* with different colonial morphologies in human plaque and saliva. **Scand. J. dent. Res.**, Copenhagen, v.91, n.1, p.26-32, Feb. 1983.
29. FACKLAM, R.R. Recognition of group D streptococcal species of human origin by biochemical and physiological tests. **Appl. Microbiol.**, v.23, n.6, p.1131-1139, June 1972.
30. FITZGERALD, R.J. Dental caries research in gnotobiotic animals. **Caries Res.**, Basel, v.2, p.139-146, 1968.
31. _____, KEYES, P.H. Demonstration of the etiologic role of streptococci in experimental caries in the hamster. **J. Amer. dent. Ass.**, Chicago, v.61, p.9-19, 1960.
32. _____, _____. Ecologic factors in dental caries. The fate of antibiotic-resistant cariogenic streptococci in hamsters. **Amer. J. Pathol.**, Bethesda, v.42, p.759-772, 1963.

33. FITZGERALD, R.J., JORDAN, H.V., STANLEY, HR. Experimental caries and gingival pathologic changes in the gnotobiotic rat. **J. dent. Res.**, Washington, v.39, 923-935, 1960.
34. FU, J. et al. Effect of plaque thickness on glucose retention and acid productions. **J. dent. Res.**, Washington, v.70, 1991. [Abstract, 1815]
35. GAWRONSKI, T.H. et al. Effects of dietary sucrose levels on extracellular polysaccharide metabolism of human dental plaque. **J. dent. Res.**, Washington, v.54, n.4, p.881-890, July/Aug. 1975.
36. GEDDES, D.A.M. et al. The effect of frequent sucrose mouthrinsing on the induction *in vivo* of caries-like changes in human dental enamel. **Archs. oral Biol.**, Oxford, v.23, n.8, p.663-665, 1978.
37. GIBBONS, R.J., BANGHART, S.B. Synthesis of extracellular dextran by cariogenic bacteria and its presence in human dental plaque. **Archs. oral Biol.**, Oxford, v.12, p.11-23, 1971.
38. _____, NYGAARD, M. Synthesis of insoluble dextran and its significance in the formation of gelatinous deposits by plaque-forming streptococci. **Archs. oral Biol.**, Oxford, v.13, n.10, p.1249-1262, Oct. 1968.
39. _____, VAN HOUTE, J. On the formation of dental plaque. **J. Periodont.**, Chicago, v.44, n.6, p.347-360, June 1973.

40. GIBBONS, R.J. et al. Dental caries and alveolar bone loss in gnotobiotic rats infected with capsule forming streptococci of human origin. **Archs. oral Biol.**, Oxford, v.11, n.6, p.549-560, June 1966.
41. GUGGENHEIM, B., SCHROEDER, H.E. Biochemical and morphological aspects of extracellular polysaccharides produced by cariogenic streptococci. **Helv. odontol. Acta.**, v.11, p.131-152, 1962.
42. _____, KONIG, K.G., MUHLEMANN, H.R. Modifications of the oral bacterial flora and their influence on dental caries in rat. The effects of inoculating 4 labelled strains of streptococci. **Helv. Odontol. Acta.**, v.9, p.121-129, 1965.
43. _____ et al. The cariogenicity of different dietary carbohydrates tested in rats in relative gnotobiosis with a streptococcus producing extracellular polysaccharide. **Helv. Odont. Acta.**, v.10, n.2, p.101-113, Oct. 1966.
44. HARDIE, J.M. Oral streptococci. In: SNEATH, P.H.A. et al. **Bergey's Manual Systematic Bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986. v.2, p.337-368.
45. HIROSE, H. et al. Close association between *Streptococcus sobrinus* in the saliva of young children and smooth-surface caries increment. **Caries Res.**, Basel, v.27, n.4, p.292-297, 1993.

46. IKEDA, T., KURITA, T., HIRASAWA, M. Supression of *Streptococcus sobrinus* 6715(9) in plaques by *Streptococcus mutans* 32K(c). **J. oral Path.**, Copenhagen, v.17, n.9/10, p.471-474, Nov. 1988.
47. _____ et al. Low-cariogenicity of the tetrasaccharide nystose. **Gen. Pharmac.**, Exeter, v.21, n.2, p.175-179, 1990.
48. IMFELD, T., HIRSCH, R.S., MUHLEMANN, H.R. Telemetric recording of interdental plaque pH during different meal patterns. **Br. Dent. J.**, London, v.144, n.2, p.40-45, Jan. 1978.
49. JENKINS, G.N. **Pellicle, plaque and calculus. The phisiology and biochemistry of the mouth.** 4.ed. Oxford: Blackwell, 1978. p.360-413.
50. JORDAN, H.V., KEYES, P.H. "*In vitro*" methods for the study of plaque formation and carious lesions. **Archs. oral Biol.**, Oxford, v.11, n.8, p.793-801, Aug. 1966.
51. JÜRGENSEN, C.A., ARAUJO, W.C. Formação de placa bacteriana "*in vitro*". **Arq. Cent. Est. Fac. Odont.**, Belo Horizonte, v.4, n.1, p.87-93, jan./jun. 1967.
52. KEYES, P.H. The infectious and transmissible nature of experimental dental caries. Findings and implications. **Archs. oral Biol.**, Oxford, v.1, p.304-320, 1960.

53. KEYES, P.H. Research in dental caries. **J. Amer. Dent. Ass.**, Chicago, v.76, n.6, p.1357-1373, June 1968.
54. _____, FITZGERALD, R.J. Dental caries in the Syrian hamster IX. **Archs oral Biol.**, Oxford, v.7, p.267-278, 1962.
55. _____, _____. Dental caries in the Syrian hamster X. The natural history of the disease in a single family. **Int. dent. J.**, Surrey, v.13, p.86-109. 1963.
56. KÖHLER, B., BJARNASON, S. Mutans streptococci, lactobacilli and caries prevalence in the 11 and 12 year old Iceland children. **Community Dent. oral Epidemiol.**, Copenhagen, v.15, n.6, p.332-335, Dec. 1987.
57. KRASSE, B. The effect of the diet on the implantation of caries-inducing streptococci in hamsters. **Archs. oral Biol.**, Oxford, v.10, p.215-221, 1965.
58. _____. Effects of dietaries on oral microbiology. In: HARRIS, R.S. **Art and Science of Dental Caries Research**. New York: Academic Press, 1968. p.111-120.
59. _____. Human streptococci and experimental caries in hamsters. **Archs. oral Biol.**, Oxford, v.2, n.4, p.429-436, Apr. 1966.

60. LINDQUIST, B., EMILSON, C.G. Dental location of *S. mutans* and *S. sobrinus* in humans harboring both species. **Caries Res.**, Basel, v.25, n.2, p.146-152,1991.
61. LOESCHE, W.J. **Cárie Dental. Uma infecção tratável.** Rio de Janeiro: Cultura Médica, 1993. 349p.
62. _____, SYED, S.A. The predominant cultivable flora of carious plaque and carious dentine. **Caries Res.**, Basel, v.7, n.3, p.201-216, 1973.
63. MACPHERSON, L.M.D., DAWES, C. Effects of salivary film velocity on pH changes in an artificial plaque containing *Streptococcus oralis*, after exposure to sucrose. **J. dent. Res.**, Washington, v.70, n.9, p.1230-1234,Sept. 1991.
64. MANDEL, I.D. Relation of saliva and plaque to caries. **J. dent. Res.**, Washington, v.53, n.2, p.246-271, Mar./Apr. 1974.
65. _____, ELLISON, S.A. Naturally occurring diffuse mechanisms in saliva. In: TANZER, J.M. **Animals models in cariology.** Washington: Information Retrieval, 1981. p.367-370.
66. MARGOLIS, H.C. An assessment of recent advances in the study of the chemistry and biochemistry of dental fluid. **J. dent. Res.**, Washington, v.69, n.6, p.1337-1342, June 1990.

67. 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, n.6, p.467-473, 1993.
68. Mc DOUGALL, W.A. Studies on the dental plaque. Levans and the dental plaque. **Aust. dent. J.**, Saint Leonards, v.67, p.1-5, 1964.
69. MENAKER, L. **Caries Dentárias: bases biológicas**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1984. 461p.
70. OLIVEIRA, C.M. **Isolamento e caracterização de streptococcus de placa dental**. Tese (Doutoramento) - Instituto de Microbiologia - Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1974. 291p.
71. OLSSON, J., VAN DER HIJDE, Y., HOLMBERG, K. Plaque formation in vivo and bacterial attachment in vitro on permanently hydrophobic and hydrophilic surfaces. **Caries Res.**, Basel, v.26, n.6, p.428-433, 1992.
72. ORLAND, F.J. et al. Experimental caries in germfree rats inoculated with enterococci. **J. Amer. dent. Ass.**, Chicago, v.50, p.259-272, 1955.
73. PERCH, B., KJEMS, E., RAVIN, T. Biochemical and serological properties of *S. mutans* from various human and animal sources. **Acta Pathol. Microbiol. Scand. [B] Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v.82, n.3, p.357-370, 1974.

74. REBELO, M.A.B. **Estudo *in situ* da composição bioquímica da placa dental em função da frequência diária do uso de sacarose.** Tese (Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba - Universidade Estadual de Campinas, 1994. 103p.
75. RÓLLA, G., SHEIK, A.A., CIARDI, J.E. Role of sucrose in plaque formation. **Scand. J. dent. Res.**, Copenhagen, v.93, n.2, p.105-111, Apr. 1985.
76. RUSSEL, R.R.B. Control of specific plaque bacteria. **Adv. Dent. Res.**, Washington, v.8, p.285-290, 1994.
77. SCHEININ, A. The effect of various sugar on the formation and chemical composition of dental plaque. **Int. Dent. J.**, Surrey, v.21, n.3, p.302-321, Sept. 1971.
78. SHKLAIR, I. L., KEENE, H.J. A biochemical scheme for the separation of the five varieties of *S. mutans*. **Archs. oral Biol.**, Oxford, v.19, n.11, p.1079-1081, Nov. 1974.
79. SKINNER, A., CONNOLLY, P., NAYLOR, M.N. The influence of the replacement of dietary sucrose by maltose on the formation and biochemistry of human dental plaque. **Archs. oral Biol.**, Oxford, v.27, n.7, p.603-608, 1982.

80. SPOLIDORIO, D.M.P. **Biotipos de Streptococcus grupo mutans e avaliação de parâmetros clínicos e microbiológicos entre escolares de diferentes classes sócio-econômicas.** Tese (Doutoramento) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba – Universidade Estadual de Campinas, 1997. 131p.
81. STEPHAN, R.M. Intraoral hydrogen-ion concentrations associated with dental caries activity. **J. dent. Res.**, Washington, v.23, p.257-266, 1944.
82. TENOVUO, J. et al. Antimicrobial factors of saliva in relation to dental caries and salivary levels of mutans streptococci. **J. Biol. Buccale**, Paris, v.20, n.2, p.85-90, June 1992.
83. THYLSTRUP, A., FEJERSKOV, O. **Cariologia Clínica.** 2.ed. São Paulo: Santos, 1995. 421p.
84. TORRES, S.A. **Avaliação do agar SB-20 e MSB na contagem de estreptococos do grupo mutans na saliva e na placa dental de adolescentes.** Tese (Doutoramento) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – Universidade Estadual de São Paulo, 1991. 124p.

85. VAN HOUTE, J., RUSSO, J., PROSTAK, K.S. Increased pH-lowering ability of *Streptococcus mutans* cell masses associated with extracellular glucan-rich matrix material and the mechanisms involved. **J. dent. Res.**, Washington, v.68, p.451-459, 1989. *Apud* Op. cit Ref. 67.
86. _____, UPESLACIS, V.N., EDELSTEIN, S. Decreased oral colonization of *Streptococcus mutans* during aging of Sprague-Dawley rats. **Infect. Immun.**, Washington, v.16, n.1, p.203-212, Apr. 1977.
87. WHILEY, R.A. et al. *Streptococcus downei* sp. nov. for strains previously described as *S. mutans* serotype h. **Int. J. syst. Bact.**, Washington, v.38, p.25-29, 1988.
88. WHITTENBURY, R. Hydrogen peroxide formation and catalase activity in the lactic acid bacteria. **J. Gen. Microbiol.**, Cambridge, v.35, p.13-26, 1964.
89. ZINNER, D. O., JABLON, J.M. Human streptococcal strains in experimental caries. In: HARRIS, R.S. **The art and science of dental caries research**. London: Academic Press, 1968.