

JOSÉ LUIS VIEIRA DA SILVA

Farmacêutico-Bioquímico

INCIDÊNCIA DE *Streptococcus mutans* EM PLACAS DENTAIS DE CRIANÇAS QUE CONSOMEM ÁGUA FLUORADA E SEM FLUOR

Orientador : **Dr. Pedro Bertolini**

Tese apresentada ao Departamento de Biologia e Patologia Buco-dental da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Odontologia, na Área de Microbiologia e Imunologia.

PIRACICABA - SP

1980

**UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL**

À minha esposa Neide,
pelo carinho e dedicação,

Aos meus filhos

DANIELA,
JUNIOR,
GUSTAVO,

DEDICO ESTE TRABALHO.

AGRADECIMENTO

AO PROFESSOR DR. PEDRO BERTOLINI, RESPONSÁVEL PELA
ÁREA DE MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA, DA FACULDADE DE O-
DONTOLOGIA DE PIRACICABA, DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
CAMPINAS, PELA ORIENTAÇÃO SEGURA E DEDICAÇÃO NA REALI-
ZAÇÃO DESTE TRABALHO.

À minha mãe Air Moreira, a quem devo minha
formação moral e profissional;

Ao meu pai Ciro Vieira
"in memoriam";

Ao meu sogro Juarez Macedo, pela
ajuda prestada.

O F E R E Ç O

Aos meus irmãos:

Dr.^a Maria Angela,
Dr. Marco Antonio,
 Maria Luiza,
 Maria Cecília,
 Maria de Fátima,
 João dos Reis,
 Wenceslau Antonio,
 Maria Edwiges,
 Maria Cristina,
 Crésio,

Pela amizade que sempre me dedicaram.

A G R A D E C I M E N T O S

- Ao Professor Dr. Antonio Carlos Neder, DD. Diretor da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, UNICAMP, pela oportunidade da execução deste trabalho;
- Ao Professor Dr. Hélio de Souza, DD. Diretor da Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas, MG, pelo apoio e confiança;
- Ao Professor Dr. Vinio B. Tamburini, Vice-Diretor da Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas, MG, pela sua atenção e auxílio;
- Ao Professor Dr. Antonio Carlos Ferraz Correa, Coordenador do Curso de Pós-Graduação de Biologia e Patologia Bucodental e Coordenador Geral dos Cursos de Pós - Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP;
- Ao Professor Dr. Eduardo Araujo dos Santos, Chefe do Departamento de Microbiologia e Parasitologia, da Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas, pelo incentivo e colaboração;
- À Professora Dr.^a Sonia Vieira, do Departamento de Odontologia Social, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, pela orientação proporcionada na execução da análise estatística;

Aos Professores Dr.^s Jaime Cury e Alcides Guimarães, pelas va
liosas sugestões;

À Senhora Ivany do Carmo Guidolin Gerola, pela revisão bi-
bliográfica;

E a todos os demais professores e funcionários da
Faculdade de Odontologia de Piracicaba da UNICAMP, pela amiza
de e colaboração.

Aos meus colegas do curso de Pós-Graduação, em particular:

Aguila Bernardes Martins,
Maria Landre D. Marçal,
Martha Helena Pereira,
Ondina de Souza Terra,
Selmo de Avila Lima,
Walter Rocha,

pela amizade e solidariedade.

I N D I C E

Pág.

I -	INTRODUÇÃO	1
	1.1 - Flúor e Cárie Dental	6
II -	PROPOSIÇÕES	15
III -	MATERIAL E MÉTODOS	17
	1 - Seleção de Pacientes	18
	2 - Colheita do Material de Placa Dental	18
	3 - Semeadura do Material	19
	4 - Identificação e Contagem de <i>Streptococ</i> <i>cus mutans</i>	19
	5 - Meios Usados na Diluição e Cultura do Material de Placa Dental	20
	5.1 - Salina com extrato de levedura ...	20
	5.2 - "Mitis - Salivarius Agar"	21
	5.3 - Meio básico para a fermentação de carboidratos ("Cystina - Tryp ticase - Agar" , BBL)	21
IV -	RESULTADOS	23
V -	DISCUSSÃO	33
VI -	CONCLUSÕES	40
VII -	RESUMO	42
VIII -	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

LISTA DE TABELAS

	Pág.
TABELA 1 - Número de colônias de <i>Streptococcus mutans</i> isoladas de crianças que não bebem água fluoretada	26
TABELA 2 - Número de colônias de <i>Streptococcus mutans</i> isoladas de crianças que bebem água fluoretada	27
TABELA 3 - Número médio de colônias de <i>Streptococcus mutans</i> em crianças que não bebem água fluoretada segundo o Índice CPDD	28
TABELA 4 - Número médio de colônias de <i>Streptococcus mutans</i> em crianças que bebem água fluoretada segundo o Índice CPDD	30
TABELA 5 - Média, variância, coeficiente de variação e de correlação do número médio de colônias de <i>Streptococcus mutans</i> de crianças que não bebem água fluoretada	32
TABELA 6 - Média, variância, coeficiente de variação e de correlação do número médio de colônias de <i>Streptococcus mutans</i> de crianças que bebem água fluoretada	32

LISTA DE FIGURAS

Pág.

FIGURA 1 - Gráfico de barras relativo à Tabela nº 3 ... 29

FIGURA 2 - Gráfico de barras relativo à Tabela nº 4 ... 31

I - INTRODUÇÃO

I - INTRODUÇÃO

Utilizando ratos gnotobiotos, alimentados com dieta cariogênica, ORLAND e col. (1955), demonstraram que a cárie dental experimental não ocorre na ausência de microrganismos.

Em roedores, ela é caracterizada por um componente infeccioso e transmissível (KEYES, 1960).

Em 1965, ZINNER e col., isolaram estreptococos de lesões humanas com características sorológicas e bioquímicas semelhantes às daquelas dos estreptococos cariogênicos isolados de roedores.

Estreptococos indutores de cárie foram isolados em cerca de 80% de grupos populacionais de moradores da Suécia por KRASSE e col. (1968). Em algumas pessoas os estreptococos indutores de cárie constituíam 80 a 90% dos estreptococos cultivados de amostras de placa, e em outras, eles estavam ausentes. Não foi encontrada nenhuma correlação entre a frequência de cárie e a ocorrência destes estreptococos. Ao contrário, em grupos selecionados, foi observada uma exata correlação entre a atividade de cárie e o número de estreptococos indutores da mesma.

Em 1967 e 1968, investigadores suíços e suecos, em estudos intensivos do estado taxonômico destes "estreptococos cariogênicos", confirmaram que os mesmos não eram espécies identificadas no Manual de Bergey.

Jã CARLSSON (1967) indicou ter verificado que estes estreptococos cariogênicos eram muito semelhantes às cepas isoladas de lesões cariosas profundas por CLARK em 1924 e propôs, para eles, o nome usado pelo próprio CLARK, ou seja *Streptococcus mutans*.

A presença de estreptococos indutores de cárie em material de placa tem sido bem estabelecido, (JORDAN e col. 1969). Apesar disto, é pouco conhecido, o relacionamento atual desses organismos com a ocorrência e distribuição da cárie dental em humanos.

Existem algumas informações indicando que estreptococos específicos indutores de cárie estão presentes em cultura de material de crianças e que a frequência de sua ocorrência nesse nicho, está relacionada, em alguns aspectos, ao estado da cárie dental das populações amostradas (LITTLETON e col., 1970).

Em estudos da placa dental humana, MYERS & HANDELMAN (1971), não detectaram trocas: (1) na prevalência de estreptococos totais em Mitis-Salivarius ágar; (2) em níveis de bactérias formadoras de polissacarídeo extracelular; ou (3) no número de bactérias armazenadoras de polissacarídeos intracelulares.

De acordo com os estudos de HOERMAN e col. (1972) várias amostras de *Streptococcus mutans* de humanos são cariogênicos para animais monoinfectados. Esta evidência sugere, mas não necessariamente, a ação de *Streptococcus mutans*

como iniciador de cáries em dentes humanos. Tal fato foi estabelecido quando mostraram que *Streptococcus mutans*, em placa, estava significativamente associado com a detecção inicial de lesões, mas não estavam presentes em superfícies intactas.

Estudando o efeito da inoculação de *Streptococcus mutans* em ratos, em relação à cárie e ao conteúdo da placa, HUXLEY (1973), encontrou uma correlação positiva significativa entre cárie e o total de bactérias e de *Streptococcus mutans* isolados na placa.

Variações na incidência da cárie dental pode refletir diferentes graus de infecção (GIBBONS e col., 1974). Segundo os autores, *Streptococcus mutans* não são detectados na cavidade oral antes da erupção dos dentes.

De acordo com o que relatam ABRAMOVICH (1974), ABRAMOVICH & SABELLI (1976) *Streptococcus mutans* é um dos muitos microrganismos que foi identificado na flora oral normal, particularmente na placa. Estudos "in vivo" e "in vitro" mostraram que estes organismos tem uma ação destrutiva do esmalte.

Em 1975, BERKOWITZ relatou que a importância destes microrganismos na etiologia da cárie dentária, era em princípio recebido nessa época, mas ela jamais fora demonstrada diretamente até 1950.

A cárie dental em animais de laboratório tem característica de infecção e doença transmissível. Em siste-

mas experimentais relativamente simplificados a infecção pode ser completamente específica e envolve geralmente *Streptococcus mutans*. Amostras desta espécie, isolada de placa dental e lesões cariosas de indivíduos, exibem um alto nível de patogenicidade quando estudadas dentro de condições experimentais definidas.

De acordo com MIKKELSEN & POUKSEN (1976), no relacionamento entre cárie dental e a composição microbiana da placa dental existe uma correlação positiva entre o estado da cárie e a prevalência na placa de *Streptococcus mutans* e de microrganismos produzindo polissacarídeo intracelular.

Tais observações, quando analisadas em conexão com o fato de que *Streptococcus mutans* são capazes de produzir cárie rampante em animais experimentais, levaram a sugerir que tais microrganismos seriam primariamente responsáveis pela iniciação de lesões cariosas.

O potencial cariogênico de *Streptococcus mutans* tem sido claramente demonstrado em animais experimentais e o papel destes microrganismos na cárie dental no homem parece evidente (SVANBERG & LOESCHE, 1978).

Ainda em 1978, KOHLER & BRATTHALL, relataram que em populações com alta incidência de cárie dental, a maior parte delas parece abrigar este microrganismo (KRASSE e col., 1968; JORDAN e col., 1969; GRENIER e col., 1973).

Faltam dados concernentes a aquisição e transmissão de *Streptococcus mutans* no homem. Estudos sugerem que

o microrganismo não se implanta, inicialmente, no indivíduo adulto humano e que ele não é prontamente transmitido dentro de grupos familiares. A maneira com que os indivíduos são infectados com o organismo e a maneira com que a infecção é perpetuada dentro de populações, não está bem estabelecida.

Streptococcus mutans foram isolados de dentição primária pela época da erupção dos molares, e nestes casos, cáries de superfície lisa estão presentes. Além disso, o tempo para o aparecimento do *Streptococcus mutans* em relação à erupção e desenvolvimento dos dentes decíduos não está esclarecido.

1.1 - FLÚOR E CÁRIE DENTAL

No mundo todo, dezenas de estudos clínicos e levantamentos epidemiológicos, comprovaram o valor da água fluoretada no combate a cárie dental. Basicamente a resistência à cárie dental decorrente da ingestão da água fluoretada, está relacionada com a quantidade de flúor que se deposita na superfície do esmalte. Assim sendo, essa deposição de flúor no tecido está na dependência do espaço de tempo que o indivíduo ingere água fluoretada.

Em 1940, BIBBY & VAN KESTERN, mostraram que a inibição da cárie dental pelo flúor é o resultado de sua ação nas bactérias situadas na superfície do dente. Contudo ,

uma tentativa para demonstrar que o flúor produz trocas na flora oral de ratos, não foi conclusiva.

O fluoreto não possui acentuada capacidade como bactericida. O íon F manifesta atividade variável de acordo com o componente empregado ; alguns organismos demonstraram resistência à sua ação.

A capacidade do flúor para inibir a ação de enzimas celulares tem, recentemente, atraído muita atenção. A demonstração de que concentrações mínimas de flúor interferem com a fermentação de carboidratos é de particular interesse em relação com a cárie dental. De qualquer maneira, existem poucas informações do efeito do flúor sobre as enzimas bacterianas. Elas consistem de relatos sobre a limitação da atividade metabólica em concentrações não letais, da inibição da oxidação do ácido láctico e pirúvico em diluições de NaF , que não afetam a respiração, e a descoberta de que concentrações diferentes de NaF foram requeridas para evitar fermentação de sacarose por amostras comuns de bacilos e estreptococos intestinais.

Em 1942 , COX & LEVIM, já afirmavam que em meios contendo somente 0,1 ppm de flúor a produção de ácidos foi extraordinariamente inibida.

WRIGHT & JENKINS (1954) referiram que uma concentração tão pequena como 0,5 ppm inibe significativamente a produção de ácidos e evita trocas de pH em misturas de saliva e glicose incubadas a 37°C de 04 a 24 horas.

De acordo com LILIENTHAL (1956) a ação do flúor na prevenção da cárie dental é devida aos efeitos do íon flúor. Deste modo sua ação é explicada pela indução de maior resistência do esmalte dental às soluções ácidas pela ação do íon flúor durante a calcificação e erupção dos dentes. Por comparação de curvas de crescimento e de formação de ácidos, ficou evidente que o flúor tem seus efeitos somente quando o número de células alcança um máximo e o microrganismo já está na fase de declínio de crescimento.

Além da redução da solubilidade do esmalte pelo flúor, há evidência da ação anti-bacteriana ou anti-enzimática desse elemento, restando saber qual é a mínima concentração de flúor que pode inibir a produção de ácidos pelas bactérias na saliva (JENKINS; 1960).

Em 1962, BRUDEVOLD estudou a concentração do flúor na superfície do esmalte de indivíduos com 20 anos de idade em áreas cujo teor de flúor nas águas de consumo variava de 0,1 a 0,5 ppm, encontrando no esmalte uma concentração de 571 a 3.370 ppm.

Também em 1962, AST e col., relataram que onde o íon flúor foi descoberto naturalmente presente na água de abastecimento, na concentração de aproximadamente 1,0 ppm ocorreu redução de cárie dental em crianças em cerca de 60% quando comparadas com crianças que bebem água com deficiência de flúor.

Em 1965 , MOLLER, estudando regiões com flúor presente nas águas de abastecimento, observou que as pessoas que usavam estas águas possuíam dentes bem conservados.

Diversos autores, entre eles, WILLIAMS (1967), HANSLER e URBANS (1976) , referem-se ao fato de que microrganismos tem a capacidade de se adaptarem a condições de aumento de concentração de flúor, passando a crescer em altas taxas de halogênio.

Em estudos de ENGLANDER & KEYES (1967), em condições laboratoriais, foi possível proteger hamsters de cárie dental rampante por frequente aplicação tópica de fluoreto de sódio ou gel solúvel em água contendo cerca de 1% de íon flúor.

De acordo com as investigações de FITZGERALD & JORDAN (1968) é preciso haver uma grande quantidade de flúor para que o crescimento bacteriano "in vitro" seja inibido.

De acordo com JENKINS (1967) o flúor tem um efeito na prevenção da cárie dental por meio de três mecanismos: (1) em pequenas concentrações na água ou alimentos ele é pouco efetivo se tomado durante a formação dos dentes, mas tem pouco efeito após a erupção e, ele também fornece muita proteção ao dente que tenha sido exposto primeiro ao flúor antes de ter erupcionado ; (2) por aplicação tópica ocasional de altas concentrações de flúor na condição de cerca de 2% de íon flúor ; e (3) pelo uso frequente de dentifrícios em lavagens da boca contendo alta concentração de flúor tal como 0,1%. Não existem razões para acreditar que o flúor age ne-

cessariamente através das mesmas vias nestes diferentes métodos, e a observação de que dentifrícios com flúor são efetivos em áreas com níveis de flúor ótimo na água sugere que eles podem atuar por diferentes mecanismos. Infelizmente não são possíveis conclusões finais, sobre seus mecanismos de ação.

O mesmo autor, em 1969, referiu que o crescimento bacteriano é inibido pela difusão para o meio, do flúor fixado na superfície do esmalte.

HARDWICH (1969) relatou que em regiões com respectivamente 0,1 e 2,1 ppm de fluoreto nas águas de abastecimento, o conteúdo de fluoreto da placa dental vai de 25 a 47 ppm.

Ainda em 1969, estudando o possível efeito da água fluoretada na composição bacteriana da placa dental, DE STOPELLAR e col., observaram uma menor ocorrência de *Streptococcus mutans* na cidade com 1,1 ppm de flúor nas águas de abastecimento, quando comparada com outra com 0,1 ppm; concluíram estes autores, que este fato dá uma indicação da influência da água fluoretada sobre a flora bacteriana da placa dental.

Em estudos sobre o conteúdo de flúor em placa dental, SINGER e col. (1970), verificaram que o mesmo é de 14,4 a 16,3 ppm.

Os estudos de SHERN e col. (1970) sobre a ação do flúor na formação de placa "in vitro" por *Streptococcus mutans*, evidenciaram que o flúor orgânico interfere, mesmo em pequenas quantidades, mas que o flúor inorgânico não é efetivo.

Em estudos da flora bacteriana de placa dental de crianças que vivem em regiões de altas concentrações de flúor nas águas de consumo (10 ppm), MIRANDA (1970) não isolou *Streptococcus mutans* em nenhuma oportunidade.

Jã MURRAY (1969, 1970), relatou que em 1945 sete milhões de americanos, que viviam em diversas comunidades dos Estados Unidos, já bebiam água com flúor naturalmente presente. Em 1970, cerca de 70% da população norte-americana consumia água adicionada de flúor.

Em 1970, MOREIRA, relatou que o "binômio flúor cárie dental" tem sido intensamente pesquisado, estudado e analisado nos últimos anos, sendo que atualmente o melhor método preventivo para a cárie dental é o da fluoretação da água de abastecimento público. Entre as vantagens que ele apresenta, citamos algumas: a redução, em média, da incidência de cárie, após dez anos de colocação contínua de sais de flúor na água de abastecimento, é de 60 a 65% em doses adequadas; não existe nenhuma contra-indicação; o preço "per-capita" é relativamente baixo; grande número de pessoas são beneficiadas, não necessitando de certas práticas da clínica odontológica e

nem de Educação Sanitária individual ; os efeitos produzidos na prevenção da cárie duram para toda a vida do indivíduo, é um método adequado, eficiente, prático, seguro, econômico e perene".

Embora o efeito anti-cárie do flúor esteja bem estabelecido, ele é por enquanto incerto, porque seu mecanismo de ação não é conclusivo (WOODS, 1971). Revisando a terapia do flúor, debateu dois possíveis mecanismos: primeiro, a influência bacteriostática sobre a flora oral, baseada no conhecimento das propriedades de inibição das enzimas para libertar íons flúor no esmalte ; segundo, a incorporação do flúor na hidroxi-apatita do esmalte, resultando em baixa solubilidade de cristais de apatita do esmalte em ácido orgânico fraco.

Em 1971, ROLLA verificou que o flúor inibe a adsorção de dextrano à hidroxiapatita.

Em seus estudos em quatro estudantes, BIRKELAND (1972) verificou que o conteúdo de flúor da placa era de 24 a 45 ppm, e que após o uso de dentifrício com flúor, passou para 42 a 229 ppm.

Estudos de CLARK e col. (1973) sugeriram alterações da flora bacteriana como o mecanismo de ação do flúor em cárie dental de animal roedor. Mostraram também que o flúor pode agir afetando a placa, bem como reduzir a capacidade de aderência de *Streptococcus mutans*, "in vitro".

Ainda em 1973 LOESCHE e col., relataram que a possibilidade do flúor em reduzir a cárie dentária tem sido a tribuída a trocas nas propriedades físicas e químicas do esmalte que aumentam a resistência da superfície do dente. O flúor pode exercer também um efeito diretamente nas bactérias da placa. Esse efeito pode determinar uma reduzida habilidade da flora da placa para formar ácido e polissacarídeo a partir de carboidratos ou uma troca na composição microbiana da placa.

HODGE & SCHNEIDER (1973), relataram o que flúor inibe a cárie dental, mas que o mecanismo de ação ainda não está completamente elucidado. O íon flúor aparentemente combina com o esmalte, e inibe muitos sistemas vitais de enzimas, incluindo aquelas responsáveis pela produção de polissacarídeo intracelular. Contudo, muitas cepas de estreptococos crescem em altos níveis de flúor.

De acordo com os relatos de BROUKAL & ZAJICEK (1974) em pacientes que consomem águas de abastecimento com teor de 0,2 ppm de flúor, a quantidade de polissacarídeo extracelular em placa dental é maior de que em áreas com 1,0 ppm. Explicaram que essa redução é feita não so pelo decrêscimo da síntese de polissacarídeos, mas também por um aumento de hidrólise ; um decrêscimo relativo (embora insignificante) da fração solúvel em água, observada sob influência de íons flúor, pode suportar essa hipótese.

Íons flúor podem ser adsorvidos na superfície do esmalte, dificultando a posterior adsorção de glicoproteínas salivares (película adquirida). Desse modo, os íons flúor, promovem uma inibição competitiva (ROLLA E MELSEN, 1975). Verificaram os autores ainda que *Streptococcus mutans*, adsorvidos à hidroxiapatita podem ser desadsorvidos por um mecanismo também competitivo.

MIRANDA & PIZSOLITTO (1979), relataram que muitas pesquisas foram necessárias para se chegar ao estabelecimento da proporção ideal de flúor (1,0 ppm) na prevenção da cárie dental. Esse elemento se incorpora à estrutura do cristal do esmalte, sob a forma de fluoroapatita, através de transformação química, levando o esmalte a adquirir uma maior resistência à cárie dental.

II - PROPOSIÇÕES

II - PROPOSIÇÕES

Diante das evidências apontadas pela consulta à bibliografia que indicam *Streptococcus mutans* como provável agente etiológico da cárie dental e da importância do flúor como método preventivo desse processo, propuzemo-nos:

- 1 - Determinar o Índice CPOD de escolares que bebem ou não água de abastecimento, fluoretada.
- 2 - Determinar o número médio de colônias de *Streptococcus mutans* de material de placa de crianças nas duas condições experimentais.
- 3 - Correlacionar o Índice CPOD com o número médio de colônias de *Streptococcus mutans*.

III - MATERIAL E MÉTODOS

III - MATERIAL E MÉTODOS

1 - Seleção de Pacientes

O material a ser examinado foi colhido de vinte crianças de 9 a 14 anos de idade, de ambos os sexos oriundas de nível sócio econômico de médio a elevado, de escolas públicas da rede escolar de Piracicaba, SP e de vinte crianças da mesma faixa etária residentes em localidade próxima a Piracicaba, onde não existe tratamento d'água de abastecimento público. Estas crianças, apresentavam índice CPOD variável e em alguns casos, ausência total do processo cariioso.

2 - Colheita do Material de Placa Dental

O material de placa dental foi colhido com uma colher de dentina previamente confeccionada e esterilizada para se obter a quantidade de 1 mg. A amostra foi obtida raspando-se as faces vestibulares dos molares superiores de cada criança examinada.

O material assim obtido era imediatamente transferido, próximo a uma lâmpada a álcool, para frascos contendo pérolas de vidro, e como diluente, 10 ml de solução salina com 0,05% de extrato de levedura.

A seguir era agitado manualmente por dois minutos, para desagregação de um maior número de células, possível. A seguir, eram feitas diluições decimais na mesma solução diluente, de modo a obter-se concentrações inicial de 10^{-4} prosseguindo-se até a diluição de 10^{-7} .

3 - Semeadura do Material

Foram feitas semeaduras em duplicata, usando-se como inóculo 0,1 ml da diluição 10^{-7} no meio de "Mitis - Salivarius Agar", (BBL) contendo sacarose na concentração final de 40% , distribuido em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, usando-se pipetas de 1 ml, estéreis.

A seguir, o material foi espalhado com alça de Drigalski, tendo-se os cuidados necessários para evitar contaminação. As placas foram incubadas em jarras tipo "GAS-PAK" (BBL) , a 37°C , por 48 horas.

4 - Identificação e Contagem de *Streptococcus mutans*

Após este tempo as placas foram examinadas com auxílio de microscópio estereoscópico com aumento 8 x e feita a contagem das colônias. Para as colônias com as características de *Streptococcus mutans* foi feita inicialmente a identificação morfológica através da coloração de Gram.

As colônias do referido germe no meio de MS-
 âgar apresentam-se finamente granuladas com aspecto rugoso ,
 como pequenas mórulas de tamanho entre 0,5 a 1,0 mm de diâme-
 tro, altamente convexas com bordos irregulares. À luz refle-
 tida, a coloração é de um cinza azulado e opaco.

5 - Meios Usados na Diluição e Cultura do Material de Placa Dental

5.1 - Salina com extrato de levedura

NaCl (Backer)	8,5 g
Extrato de levedo (Difco)	0,5 g
Água destilada	1.000 ml
O pH era acertado para 7,2 com	
solução de NaOH	1 N

A distribuição foi feita na quantidade de 9 ml
 por tubo de ensaio, para as diluições seriadas e 10 ml em fras-
 cos contendo pêrola de vidro, para coleta e homogeneização do
 material de placa dental.

Esterilização a 121°C por 15 minutos.

5.2 - "Mitis - Salivarius Agar"

Trypticase (BBL)	10,0 g
Peptona (BBL)	10,0 g
Glicose (Carlo Erba)	1,0 g
Açúcar comum (União)	400,0 g
K ₂ HPO ₄ (Merck)	4,0 g
Azul Trypan (Harleco)	0,075 g
Cristal violeta (Merck)	0,0008 g
Ágar-ágar (Oxoid)	20,0 g

Acertar o pH para 7,2 e esterilizar a 120^oC por 15 minutos adicionando, após o resfriamento a 50^oC, 1 ml de uma solução de telurito de potássio a 1% estéril.

Distribuir cerca de 25 ml do meio por placa de Petri de 9 cm de diâmetro.

5.3 - Meio básico para a fermentação de carboidratos ("Cystina - Trypticase - Ágar", BBL)

Cistina (Merck)	0,5 g
Trypticase (BBL)	20,0 g
Ágar - ágar (Oxoid nº 3)	2,5 g
Cloreto de sódio (Barcker)	5,0 g
Sulfito de sódio (Merck)	0,0017 g
Vermelho de fenol	0,0017 g
Água destilada	1.000 ml

Acertar o pH a 7,3 .

Aquecer a 100°C por cinco minutos, distribuir em porções de 3 ml em tubos de ensaio, e esterilizar a 118°C , por quinze minutos.

Para a confirmação do gênero e da espécie das colônias de *Streptococcus mutans* foi empregado o meio básico acima, para as provas de fermentação dos carboidratos: manito e sorbitol, adicionados ao meio, na concentração final de 1% .

IV - RESULTADOS

IV - RESULTADOS

Os números de colônias de *Streptococcus mutans* isolados de quarenta pacientes, estão expressas nas Tabelas 1 e 2, juntamente com o sexo e Índice CP O D.

Representam elas a média aritmética de contagens em placas semeadas em duplicada e devem ser multiplicadas por 10^9 para se obter o número de células por miligrama do material semeado.

Ainda são apresentados alguns gráficos para efeito de comparação entre os dados obtidos.

As Tabelas 1 e 2 indicam o sexo, Índice CP O D, e o número de colônias de *Streptococcus mutans* isolados de placas dentais de crianças que não bebem e as que consomem água fluoretada, respectivamente.

A Tabela 3 refere-se ao número médio de colônias de *Streptococcus mutans* isoladas de placas dentais de crianças que não bebem água fluoretada, segundo o Índice C.P. O.D.

A Figura 1 representa o gráfico de barras referente à Tabela 3.

A Tabela 4 refere-se ao número médio de colônias de *Streptococcus mutans* isoladas de placas dentais de crianças que bebem água fluoretada, de acordo com o Índice C. P.O.D.

A Figura 2 representa o gráfico de barras referente à Tabela 4.

As Tabelas 5 e 6 são relativas à média, variância, coeficiente de variação e coeficiente de correlação, do índice C.P.O.D. e do número de colônias de *Streptococcus mutans*, de crianças que bebem ou não, água fluoretada.

TABELA 1 - Número de colônias de *Streptococcus mutans* isoladas de placas dentais de crianças que não bebem água fluoretada em relação ao sexo e Índice C.P.O.D.

Pacientes	Sexo,	C P O D	Número de colônias (x 10 ⁹)
01	M	9	638
02	M	10	725
03	M	9	16
04	F	3	135
05	M	7	90
06	F	0	61
07	F	3	65
08	F	6	30
09	M	5	93
10	F	1	35
11	F	7	152
12	F	8	151
13	F	2	2
14	M	8	101
15	M	2	820
16	M	5	527
17	M	7	15
18	M	0	101
19	M	11	886
20	M	0	34

TABELA 2 - Número de colônias de *Streptococcus mutans* isoladas de placas dentais de crianças que bebem água fluoretada em relação ao sexo e índice C. P.O.D.

Pacientes	Sexo	C P O D	Número de colônias (x 10 ⁹)
21	M	0	231 *
22	F	0	2
23	F	3	1.081
24	M	1	81
25	F	0	36
26	F	5	284
27	F	2	96
28	F	2	750
29	M	6	22
30	M	2	627
31	F	4	2
32	F	6	16
33	M	0	12
34	M	8	4
35	M	0	42
36	M	0	13
37	F	6	4
38	F	4	19
39	F	8	2
40	F	4	2

TABELA 3 - Número médio de colônias de *Streptococcus mutans* de crianças que não bebem água fluoretada, segundo o índice C.P.O.D.

C.P.O.D.	Número médio de colônias (x 10 ⁹)
0	65,33
1	35
2	411
3	100
4	---
5	310
6	30
7	85,66
8	126
9	325
10	725
11	886

Número médio de
colônias ($\times 10^9$)

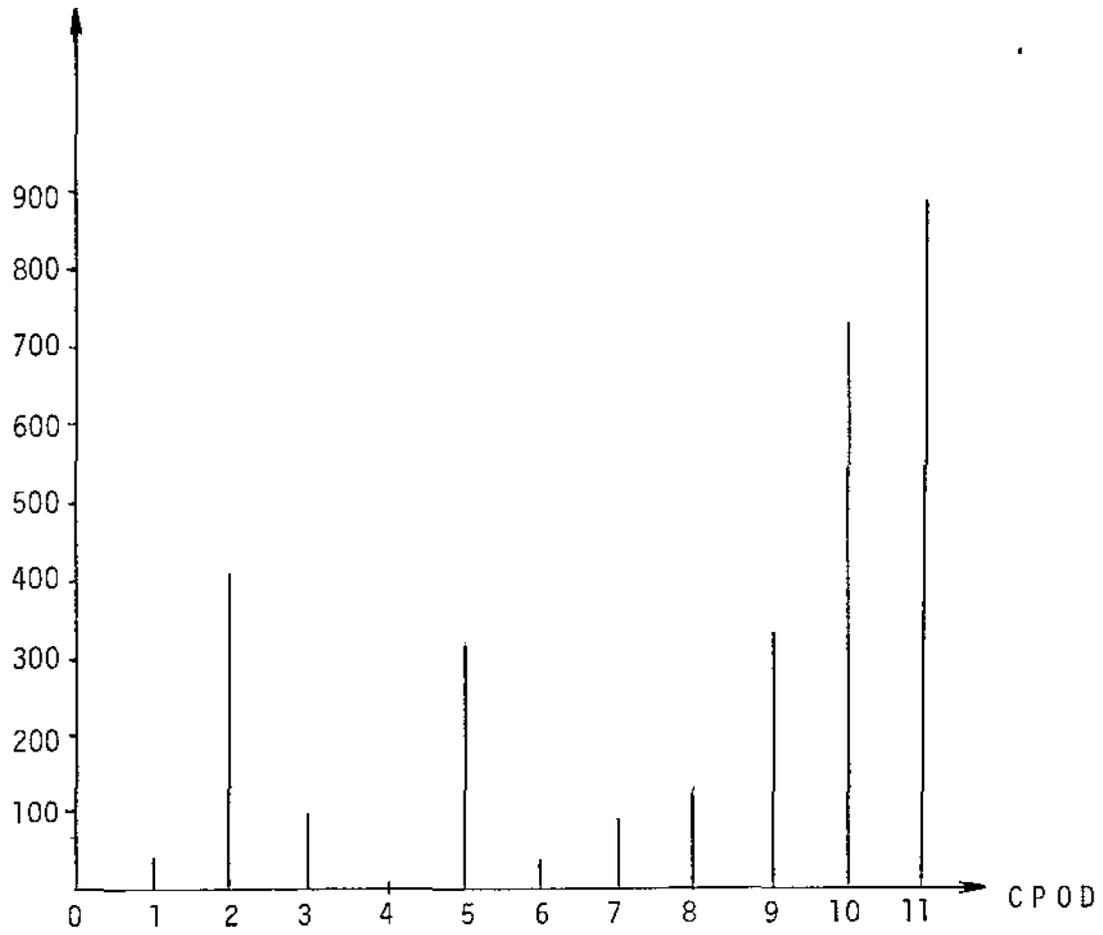


FIGURA 1 - Gráfico de barras relativo à Tabela 3

TABELA 4 - Número médio de colônias de *Streptococcus mutans* em crianças que bebem água fluoretada, segundo o índice C.P.O.D.

C.P.O.D.	Número médio de colônias (x 10 ⁹)
0	56
1	81
2	491
3	1.080
4	7,7
5	284
6	14
7	-
8	3

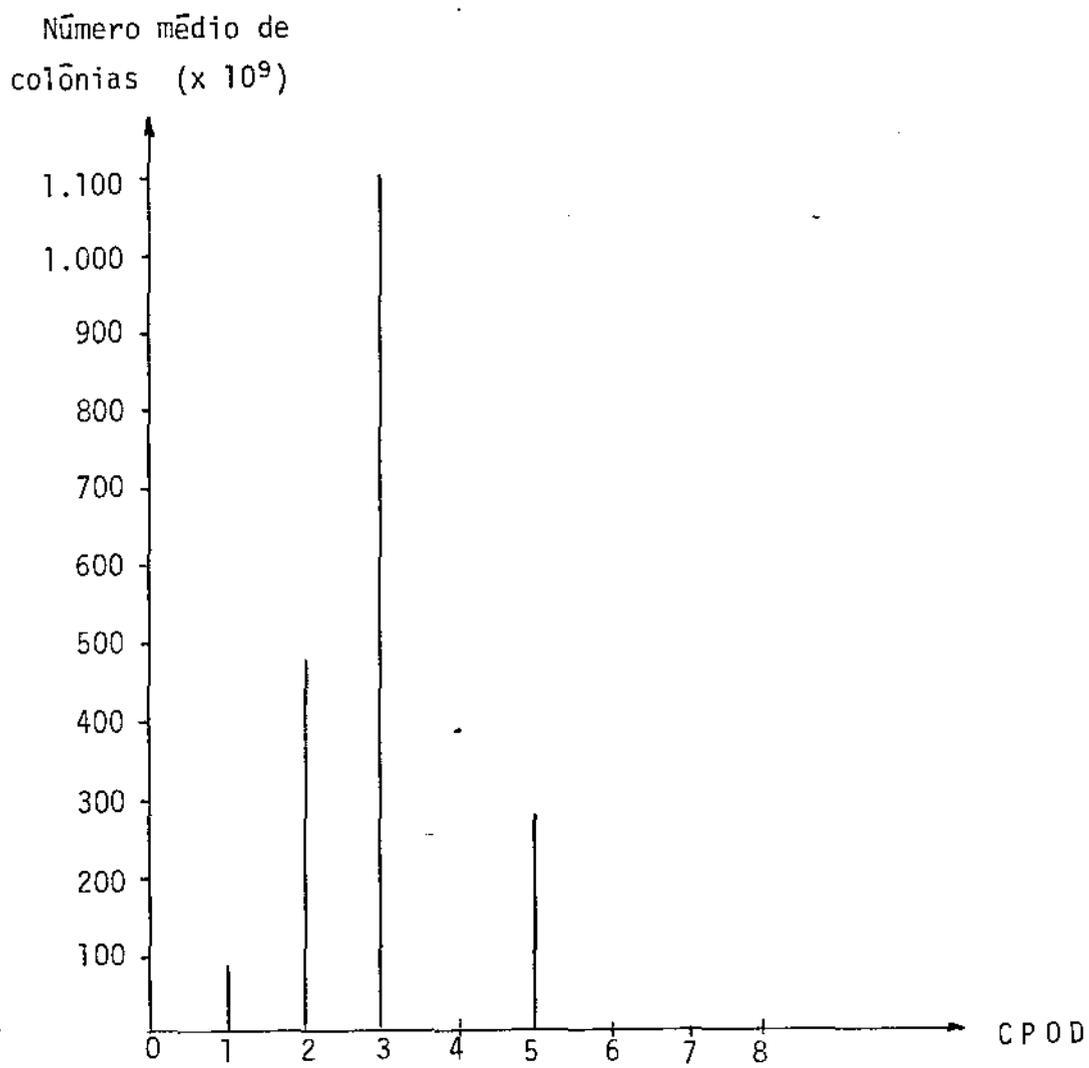


FIGURA 2 - Gráfico de barras relativo à Tabela 4

TABELA 5 - Média, variância, coeficiente de variação e coeficiente de correlação, do índice CP OD e do número de colônias de *Streptococcus mutans*, de 20 crianças que não bebem água fluoretada de região próxima a Piracicaba, SP

Variável	x	s	C. V.	r
C.P.O.D.	5,15	3,56	69,09	39,64%
Número de colônias	233,85	297,98	127,42	

TABELA 6 - Média, variância, coeficiente de variação e coeficiente de correlação, do índice CP OD e do número de colônias de *Streptococcus mutans*, de 20 crianças que bebem água fluoretada da cidade de Piracicaba, SP

Variável	x	s	C. V.	r
C.P.O.D.	3,05	2,76	90,56	13,15%
Número de colônias	166,25	301,19	181,17	

V - DISCUSSÃO

V - DISCUSSÃO

Uma análise dos resultados obtidos leva-nos a tecer uma série de considerações prévias. Assim, é preciso que se lembre, que a semelhança dos achados da maioria dos autores, que a prevalência em material de placa dental de *Streptococcus mutans* é variável, em função de diversos fatores. São influentes os hábitos alimentares e sobretudo os de higiene inerentes a cada criança examinada. Por outro lado, essas variações ocorrem em função do dente e da superfície do mesmo de onde é coletado o material de placa (SOCRANSKY & MANGANIELLO, 1971). Para justificar essa afirmação, lembramos o trabalho de JORDAN e col. (1968), que em colheitas subsequentes de placa dental de um mesmo paciente encontraram variações nas contagens de *Streptococcus mutans* de 10% a 17% nos segundos e terceiros exames.

Em 20 crianças examinadas, da cidade de Piracicaba, SP, pudemos isolar *Streptococcus mutans* de placa dental de faces lisas (vestibulares) de molares superiores. Esses resultados confirmam aqueles de IKEDA e col. (1973). Esses autores também conseguiram isolar de faces lisas de dentes de dez crianças, em quatro oportunidades com intervalos de três meses, *Streptococcus mutans*, cuja prevalência expressa em mēdia de porcentagem total foi de 2,9%, 4,8%, 7,7% e 11,1%.

Outros autores, no entanto, não conseguiram encontrá-los em determinadas faces dos dentes (ROGERS, 1973).

Embora alguns pesquisadores (SCKLAIR e col. , 1974) tenham referido que sua incidência nas faces bucal e lingual é baixa, MIRANDA (1977), encontrou resultados, nestas faces, que variavam de 40,5% nas crianças com dentição permanente a 59,4% nas de dentição mista.

Evidentemente, a idade das crianças influe de maneira significativa nos resultados, pois ao lado de outros fatores, nas crianças menores a prática de higiene bucal geralmente é deficiente. Em 1968 KRASSE e col. empregando nas suas pesquisas crianças de 7 a 13 anos, encontraram uma frequência de *Streptococcus mutans* de 87% e PRATES e col. (1975), em crianças de 7 a 14 anos, encontraram uma frequência de 52%. A faixa etária de nossas crianças estava situada entre 9 e 14 anos e a prevalência não foi determinada pelo fato de que excluimos do nosso trabalho as contagens do total de microrganismos, pelo fato de termos empregado o meio de MS-ágar com sacarose a 40% que não permite o crescimento das demais espécies de estreptococos, como *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus salivarius* e *Streptococcus mitis*.

Por outro lado, considerando-se o índice de cárie, e os números de colônias de *Streptococcus mutans*, não nos foi possível estabelecer uma correlação entre esses valores, pelo fato de que existe uma alta variabilidade dos dados que encontramos, tanto para o índice CPDD como para o número médio de colônias. Esses resultados estão expressos nas

Tabelas 3 e 4 , e nas Figuras 1 e 2 , com os gráficos de barras correspondentes às referidas tabelas. A essas mesmas conclusões chegaram alguns autores como KRASSE e col. (1968) e GAFFAR e col (1973). Também MIRANDA (1977) refere-se a resultados semelhantes, justificando-os pelo fato de que teriam sido estudadas apenas as faces dentais lisas, longe de fôssulas e não comprometidas com processos de cárie.

Ocorre, porém, que essas foram as condições estabelecidas na realização da presente investigação (coleta de placa) das faces vestibulares lisas de molares superiores).

No entanto, um número considerável de autores refere-se ao isolamento de um maior número de *Streptococcus mutans* de indivíduos com CPOD elevado (IKEDA e col. 1973) ; SHKLAIR e col. (1974). Acontece, por vezes que alguns investigadores encontraram número maior de *Streptococcus mutans* em pacientes com elevado índice de cárie (SCHAMSCHULA & BARNES, 1970) e posteriormente, não relataram diferenças em contagens subsequentes , (SCHAMSCHULA & CHARLTON, 1971).

O emprego do fluoreto tem sido intensamente estudado no sentido de reduzir a incidência da cárie dental. As técnicas de sua utilização, ou seja, as diversas vias e ainda as diferentes soluções de fluoreto tem proporcionado resultados apreciáveis ao lado de custos econômicos. É o caso de seu emprego nas águas de abastecimento cujas vantagens foram indicadas por muitos autores (ZELANTE, 1969 ; VERTUAN & MIRANDA , 1975).

Os mecanismos pelos quais o flúor age são explicados de diversas maneiras pelos inúmeros autores que se ocuparam do assunto.

Essas hipóteses, no entanto, são controvertidas encontrando defensores e críticos. Parece que *Streptococcus mutans* tem o seu desenvolvimento inibido "in vitro", por concentrações de 70 ppm de fluoreto (BOWEN & HEWITT, 1974).

Segundo as pesquisas de CHARLTON & SCHAMSCHULA (1974) nas cidades com 1,0 ppm de flúor nas águas de abastecimento seus usuários teriam uma concentração de flúor na superfície do esmalte de 813 ppm. Quando o teor de fluoreto na água de regiões diversas variar de 0,1 a 0,5 ppm, no esmalte, a concentração varia de 571 a 3.370 ppm (BRUDEVOLD, 1962).

Esse flúor fixado na superfície do esmalte poderia inibir o crescimento de microrganismo da placa, pela sua difusão do dente para a intimidade daquela estrutura.

A ocorrência de *Streptococcus mutans* e sua relação com a cárie dental foi também estudada em amostras de placas dentais de crianças de Piracicaba que consomem água fluoretada cedida à população, na concentração de aproximadamente 0,9 ppm.

Os nossos resultados estão contidos na Tabela 4 com uma distribuição sob a forma de gráfico de barras, na Figura 2, para melhor visualização. Na Tabela 4 para o índice CPDD igual a três encontrado em um único paciente

(número 23, conforme Tabela 2), verifica-se que o número médio de colônias é praticamente discrepante dos resultados.

Esses resultados foram comparados com os obtidos em vinte crianças também de 9 a 14 anos com índice CPDD variável de local próximo de Piracicaba, a cuja água de consumo não é adicionado flúoreto. Calculou-se a média, variância, coeficiente de variação e coeficiente de correlação do índice CPDD e do número de colônias de *Streptococcus mutans* dessas crianças que bebem água com e sem flúor. Esses dados estão contidos nas Tabelas 5 e 6.

Como se pode concluir, a média do número de colônias de *Streptococcus mutans* encontrada nas diversas crianças que consomem água fluoretada (166,25) é bem menor que naquelas que não o usam (233,85). Esses resultados discordam em parte, daqueles encontrados por BIRAL e col. (1973); esses autores verificaram, estudando placas dentais de crianças de Piracicaba, após 2 e 10 meses do começo da fluoretação da água de abastecimento, que inicialmente houve uma redução do número de *Streptococcus mutans*, valores que posteriormente voltaram ao normal.

Alguns autores encontraram resultados semelhantes aos de BIRAL e col. (1973) procurando explicar o fato através de uma adaptação ao flúor, o que lhes permitira crescer em elevadas concentrações desse elemento.

Outros pesquisadores afirmam não ter observado inibição de *Streptococcus mutans* (JORDAN e col., 1969; HOD-

DGE & SCHENEIDER, 1973).

Concordantes com os nossos achados são aqueles de DESTOPPELAAR e col. (1969) e de MIRANDA (1970).

Os primeiros investigadores observaram uma incidência menor de *Streptococcus mutans* em uma cidade com 1,1 ppm de fluoreto nas águas de abastecimento, enquanto que na concentração de 10 ppm, MIRANDA (1970) não conseguiu isolar o referido microrganismo de placa dental, em nenhuma oportunidade.

Ainda com base nos dados dessas Tabelas, verifica-se que o índice CP OD é em média maior para escolares que não bebem água fluorada (5,15) do que para aqueles que não o fazem (3,05). Os coeficientes de variação são muito altos mostrando baixa precisão relativa.

Os nossos resultados diferem dos achados mais recentes de KILIAN e col. (1979), que ao estudarem a flora de placa dental de crianças da Tanzânia que bebiam quantidades pequenas de fluoreto, 0,3 ppm ou maiores, 3 a 21 ppm, não encontraram diferenças na flora sob as duas condições.

Como consequência, sugere-se para estudos futuros amostras de maior tamanho, utilizando escolares mais homogêneos com relação às variáveis a serem analisadas.

VI - CONCLUSÕES

VI - CONCLUSÕES

Considerando os resultados obtidos mediante a metodologia empregada nesta investigação, podemos concluir:

- 1 - O índice CPOD é, em média, maior para escolares que não bebem água fluoretada.
- 2 - O número médio de colônias de *Streptococcus mutans* isoladas de placa dental é em média maior para escolares que não bebem água fluoretada.
- 3 - Não se comprovou correlação entre os índices CPOD e o número de colônias.
- 4 - Existe uma alta variabilidade dos dados, tanto para o índice CPOD como para o número de colônias isoladas.

VII - RESUMO

VII - RESUMO

Foi realizado um trabalho para estudar a incidência de *Streptococcus mutans* em crianças que bebem água fluoretada da cidade de Piracicaba e as que não o consomem em região vizinha.

Material de placa foi colhido das faces vestibulares (lisas) de molares superiores, de crianças entre 9 e 14 anos. Após homogeneização e diluições até 10^{-7} , alíquotas desta última foram semeadas em superfície de meio de Mitis-Salivarius-ágar com açúcar comum na concentração final de 40% , para o isolamento de colônias de *Streptococcus mutans*.

Seguindo-se a incubação das placas, foram identificadas as colônias do referido microrganismo, pela morfologia e provas de fermentação de carboidratos. As contagens finais foram comparadas com o uso ou não de fluoreto e o índice CPOD das crianças.

Concluiu-se que o índice CPOD e o número médio de colônias do germe pesquisado são maiores para as crianças que não bebem água fluoretada. Ainda mais, não se verificou correlação entre esses valores investigados; encontrou-se alta variação do número de colônias isoladas e do índice CPOD.

VIII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VIII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAMOVICH, A. & SABELLI, C. A. Action of *Streptococcus mutans* on fluorotic dental enamel. J. dent. Res., 55(2): 315, mar./apr., 1976.
- & ----- . Action of *Streptococcus mutans* on dental enamel previously treated with stannous fluoride. J. dent. Res., 53(1): 94-7, jan./fev., 1974.
- AST, D. B. & FITZGERALD, B. Effectiveness of water fluoridation. J. Am. dent. Ass., 65: 581-7, nov. 1962.
- BERKOWITZ, R. J. *Streptococcus mutans* - Establishment and transmission in infants. Archs oral Biol., 20: 171, 1975.
- BIBBY, B. G. & KESTEREN, M. V. The effect of fluorine on mouth bacteria. J. dent. Res., 19: 391-401. 1940.
- BIRAL, R. R. ; USBERTI, A. C. ; PIEDADE, E. F. Verificação do efeito inibitivo induzido a flora da placa dental através da fluoretação de água potável. Rev. Bras. Odont., 184: 231-234. 1973.
- BIRKELAND, J. M. Fluoride content of dental plaque after brushing with a fluoride dentifrice. Scand. J. dent. Res., 80: 80-7, 1972.a.
- BOWEN, W. H. & HEWITT, M. J. Effect of fluoride on extracellular polysaccharide production by *Streptococcus mutans*. J. dent. Res., 53: 627-29. 1974.

- BROUKAL, Z. & ZAJICEK, O. Amount and distribution of extracellular polysaccharides in dental microbial plaque. Caries Res., 8: 97-104, 1974.
- BRUDEWOLD, F. Chemical composition of the teeth in relation to caries. In: SOGNAES, R. F. Chemistry and Prevention of Caries, Illinois, C. C. Thomas, 1962. p. 32-88.
- CARLSSON, J. Presence of various types of non-haemolytic Streptococci in dental plaque and other sites in the oral cavity in man. Odont. Revy, 18: 55-74. 1967.
- CHARLTON, G. & SCHAMSHULA, R. G. Associations between dental plaque and fluoride in human surface enamel. Arch. oral Biol., 19: 139-143. 1974.
- CLARK, J. K. On the bacterial factor in the etiology of dental caries. Br. J. exp. Path., 5: 141-7. 1924.
- CLARK, W. B. ; HOWELL, T. H. ; KREITZMAN, S. N. ; KORNNAN, K. S. Effects of fluoride on adherence of Streptococci to hydroxyapatite. I. dent. Res., 52(sp. iss.): 87, feb. , 1973. (Abst. n^o 116).
- COX, G. J. & LEVIN, M. M. Fluorine and dental health. A. A. Adv. Sci., n^o 19: 68. 1942.
- DE STOPPELAAR, J. D. ; HOUTE, J. VAN. The relationship between extracellular polysaccharide producing streptococci and smooth surface caries in 13 year children. Caries Res., 3: 190-9, 1969.

- ENGLANDER, H. R. & KEYES, P. H. Residual anticaries effects of tropical sodium fluoride application in the syrian hamster. J. dent. Res., 46: 264-267. 1967.
- FITZGERALD, R. J. & JORDAN, H. V. Polysaccharide producing bacteria and caries. In: HARRIS, R. S. Art. and Science of Dental Caries Research. London, Academic Press, 1968. p. 79-86.
- GAFFAR, E. e col. Distribution of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis*, in plaques from caries resistant and caries active subjects. J. Dent. Res., 52: (sp. Iss.) 173. 1973.
- GIBBONS, R. J. ; DEPAOLA, P. F. ; SPINELL, D. M. Interdental localization of *Streptococcus mutans* as related to dental caries experience. Infect Immunity, 9: 481-88. 1974.
- GRENIER, E. M. ; EVELAND, W. C. ; LOESCHE, W. J. Identification of *Streptococcus mutans* serotypes in dental plaque by fluorescent antibody technique. Archs Oral Biol., 18: 707-15, 1973.
- HAMLER, J. & URBAN, T. Effect of prolonged use of three mouthwashes on the oral flora. J. Dent. Res., 55 (sp. iss. B): 317, 1976.
- HARDWICK, J. L. Associations between plaque fluoride concentration and other parameters. In: MCHUCH, W. D. Dental plaque. Dundee University, 1969. p. 171-7.

- HODGE, W. R. & SCHNEIDER, L. E. Effects of fluoride on streptococcal growth and intracellular polysaccharid production. J. dent. Res., 52 (sp.iss.); 87, fev. 1973. (Abst. n^o 114).
- HOERMAN, K. C. ; KEENE, H. J. ; SHKLAIR, I. L. & BURMEISTER, J. A. The association of *Streptococcus mutans* with early carious lesions in human teeth. J.A.D.A., vol. 85: 1349, dez. 1972.
- HUXLEY, H. G. The effect of inoculating strains of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis* upon incidence and bacterial content of plaque in rates. Archs Oral Biol., 18: 1215-26, 1973.
- IKEDA, T. ; SANDHAM, J. J. & BRADLEY, E. L. Changes in *Streptococcus mutans* and lactobacilli in plaque in relation to initiation of dental caries in negro children. Archs. Oral Biol., 18: 555-65. 1973.
- JENKINS, G. N. The effect of fluorine on oral bacteria. J. dent. Res., 39(6): 1115, nov./dec., 1960.
- . The mechanism of action of fluoride in reducing caries incidence. Int. Dent. J., 17: 552-63. 1967.
- JORDAN, H. V. ; KRASSE, B. & MOLLER, A. A method of sampling human dental plaque for certain "caries inducing" Streptococci. Archs. Oral Biol., 13: 919-27. 1968.
- ; ENGLANDER, H. R. e LIM, S. Pontentially cariogenic streptococci in selected population groups in the Wester hemisphere. J. Am. dent. Ass., 78: 1331-35, 1969.

- KEYES, P. H. The infections and transmissible nature of experimental dental caries. Archs. Oral Biol., 1: 304-20, 1960.
- KOHLER, B. & BRATTHALL, D. Intrafamilial levels of *Streptococcus mutans*, and some aspects of the bacterial transmission. Sacand. J. Dent. Res., 86: 35-42, 1978.
- KRASSE, B. ; JORDAN, H. V. ; EDWARDSSON, S. ; SVENSSON, I. & TRELL, L. The occurrence of certain "caries-inducing" streptococci in human dental plaque material. Archs oral Biol., 13: 911-18. 1968.
- LILLIETHAL, B. The effect of fluoride on acid formation by salivary sediment. J. dent. Res., April, 1956.b.
- LITTLETON, N. W. ; KAKEHASHI, S. ; FITZGERALD, R. J. Short communication - Recovery of specific "caries-inducing" streptococci from carious lesions in the teeth of children. Archs oral Biol., 15: 461-3, 1970.
- LOESCHE, W. J. ; MURRAY, R. J. ; MELLBERG, J. R. The effect of topical acidulated fluoride on percentage of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis* in inter-proximal plaque samples. Caries Res., 7: 283-93, 1973.
- MIKKELSEN, L. & POUSEN, S. Microbiological studies on plaque in relation to development of dental caries in man. Caries Res., 10: 178-88, 1976.
- MIRANDA, V. C. Verificação da flora bacteriana de placas dentais de crianças com fluorese. Revta. Fac. Farm. Odont. Araraquara, 4(1): 117-24, jan./jun. 1970.

MIRANDA, V. C. Verificação de estreptococos em placa dental, suco gengival e língua de criança com dentição mista e permanente. Suas relações com o índice de cárie e flúor. Fac. Cien. Farm., Araraquara (Tese), 1977.

----- & PIZSOLITTO; A. C. Influência do fluor na redução de estreptococcus orais em crianças. Rev. Ass. Paul. Cirurg. Dent., 33(2): 179-183, Mar./abr., 1979.

MOLLER, I. J. Apud: BIRKELAND, J. M. Effect of fluoride on the amount of dental plaque in children. Scand. J. Res., 80: 82-4, 1965.

MOREIRA, B. W. Estudo sobre os efeitos de bochechos com solução de fluoreto de sódio a 0,1% na prevenção da cárie dental. Piracicaba, 1970. (Tese - Doutorado). Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

MURRAY, J. Caries experience of five - year - old children from fluoride and non fluoride communities. Br. Dent. J., 126(3): 352-4, abr. 1969.

----- Fluoridation studies and dental caries. Review Br. Dent. J., 126(17): 467, 1970.

MYERS, M. & HANDELMAN, S. L. Effect of dairly application of fluoride in a custom fitted mouthpiece on plaque flora associated with dental decay. J. dent. Res., 50: 597-9, 1971.

ORLAND, F. J. ; BLAYNEY, J. R. ; HARVISON, R. W. ; REYNIERS, J. A. ; TREXLER, P. C. ; ERVIN, R. F. ; GORDON, H. A. & WAGNER, M. Experimental caries in germ free rats inoculated with enterococci. J. Am. dent. Ass., 50: 259-72, 1955.

- PRATES, M. E. P. N. ; OLIVEIRA, C. M. ; ARAUJO, W. C. Microbiota da placa dental de crianças com dentição mista. Arg. Cent. Est. Cur. Odont., 12: 169-187. 1975.
- ROGERS, A. H. The occurrence of *Streptococcus mutans* in the dental plaque of a group of central australian aborigines. Aust. dent. J., 2: 156-9, 1973.
- ROLLA, G. Adsorption of dextran to saliva-treated hydroxyapatite. Archs Oral Biol., 16: 527-33, 1971.
- & MELSEN, B. Description of protein and bacteria from hydroxyapatite by fluoride and monofluorophosphate. Caries Res., 9: 66-73, 1975.
- SCHAMSCHULA, R. G. & BARMES, D. E. A study of the streptococcal flora of plaque in caries free and caries active primitive peoples. Aust. dent. J., 45: 376-83. 1980.
- & CHARLTON, G. Study of caries aetiology in New South Wales schoolchildren. Aust. Dent. J., 2: 77-82. 1971.
- SHERN, R. ; SWING, K. W. ; GRANFORD, J. J. Prevention of plaque formation by organic fluorides. J. Oral Med., 25: 93-7, 1970.
- SHKLAIR, I. ; KEENE, H. J. ; CULLEN, P. The distribution of *Streptococcus mutans* on the teeth of two groups of naval recruits. Arch. Oral. Biol., 19: 199-202. 1974.
- SINGER, L. ; JARVEY, B. A. ; VENKATESWARLU, P. & ARMSTRONG, W. D. Fluoride in plaque. J. Dent. Res., 49: 454-5. 1970.

- SOCRANSKI, S. S. ; MANGANIELLO, S. D. The oral microbiota of man from birth to senility. J. Periodont., 42: 485-96, 1971.
- SVANBERG, M. L. ; LOESCHE, W. J. Intraoral spread of *Streptococcus mutans* in man. Archs Oral Biol., 23: 557-61. 1978.
- VAN HOUTE, J. & PEEBLES, T. C. *Streptococcus mutans* in plaque and saliva of children receiving fluoride supplements from birth. J. Dent. Res., 55 (sp. iss. B): 267, 1976.
- VERTUAN, V. & MIRANDA, V. C. Importância da fluoretação das águas de abastecimento na redução da cárie dental. Revta. Fac. Farm. Odont., Araraquara, 9(2): 157-66, Jul./dez. 1975.
- WILLIAMS, R. A. D. The growth of Lancefield Group D Streptococci in the presence of sodium fluoride. Archs. Oral Biol., 12: 109-17. 1967.
- WOODS, R. The short-term effect of topical fluoride applications on the concentrations of *Streptococcus mutans* in dental plaque. Aust. Dent. J., 22: 152-5, 1971.
- WRIGHT, D. E. & JENKINS, G. N. The effect of fluoride on the acid production of saliva - glucose mixtures. Br. Dent. J. 96: 30-3, 1954.
- ZELANTE, F. Estudos sobre a prevalência de cárie dental em diferentes grupos populacionais de Jacupiranga (Estado de São Paulo) e sua possível relação com o teor de flúor naturalmente presente na água. São Paulo. Facul. Odont. Universidade de São Paulo. (Tese). 1969.

ZINNER, D. D. ; JABLON, J. M. ; ARAN, A. P. & SASLAW, M. S.
Experimental caries induced in animals by streptococci of
human origem. Proc. Soc. Exp. Biol. Mec., 118: 766-70 .
1965.