



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

# **CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

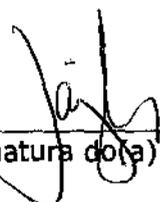
Monografia de Final de Curso

Aluno(a): Tatiana Meulman Leite da Silva

**Orientador(a): Prof. Dr. Jaime Aparecido Cury**

Ano de Conclusão do Curso: 2004



  
Assinatura do(a) Orientador(a)

**TATIANA MEULMAN LEITE DA SILVA**

**“ESTUDO DO BIOFILME DENTAL FORMADO NA PRESENÇA DE  
SACAROSE E GLICOSE + FRUTOSE E A SUA RELAÇÃO COM A  
DOENÇA CÁRIE”**

Monografia apresentada ao curso de Odontologia da  
Faculdade de Odontologia de Piracicaba – Unicamp,  
para obtenção do diploma de Cirurgião-Dentista.

Orientador: Prof. Dr. Jaime Aparecido Cury

**PIRACICABA**

**2004**

Dedico esse trabalho aos meu pais Jair e Geraldina,  
aos meus irmãos Talita e Renato, ao Rodrigo e aos  
meus amigos, pois vocês estiveram ao meu lado em  
todos os momentos, me dando muito amor e carinho.  
Obrigada por me ajudarem durante esses  
importantes anos da minha vida.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Jaime, pela ótima orientação ao meu trabalho e pelos conhecimentos que eu pude adquirir nesses 3 anos de pesquisa na área de Cariologia.

A Adriana, aluna de doutorado na área de Cariologia, que sempre me ajudou e me orientou, passando-me todo seu grande conhecimento e por ter despertado em mim o desejo de fazer Pós-Graduação, e mais importante que isso pela grande amizade conquistada.

A Prof. Cíntia pelo apoio e colaboração no laboratório de bioquímica e pelos seminários.

Aos amigos do laboratório de bioquímica pelo apoio e incentivo.

Às minhas amigas Carol, Mafê, Fer, Letícia, Tati, Marina, Ana Helena, Thaís e Camila pela amizade incondicional, pelo consolo nas horas difíceis e pela companhia nos momentos de alegria. Amo todas vocês do fundo do meu coração.

Ao meu namorado Rodrigo, pelo amor, carinho e compreensão durante esses anos em que a distância separou nossos corpos, mas não nossos corações. Te amo muito.

Aos meus pais e irmãos que me acompanharam nas importantes mudanças que ocorreram na minha vida, me apoiando acima de tudo, sem vocês eu não conseguiria. Me orgulho muito de ter uma família assim.

## **Sumário**

<b>1. RESUMO.....</b>	<b>6</b>
<b>2. Introdução.....</b>	<b>7</b>
<b>3. Revisão de Literatura.....</b>	<b>9</b>
3.1 Cárie Dental.....	9
3.2 Sacarose.....	13
3.3 Glicose + Frutose.....	16
<b>4. Conclusão.....</b>	<b>18</b>
<b>5. Referências.....</b>	<b>19</b>

## 1. RESUMO

Cárie dental é uma doença bacteriana dieta-dependente (Loesche, 1985), consequência de desequilíbrio entre os processos de desmineralização e remineralização (Cury, 1989), além de ser um processo dinâmico, dependente das condições prevalentes na interface dente-biofilme, quando da ingestão de carboidratos fermentáveis (Cury, 1993).

Entre os carboidratos fermentáveis, a sacarose é considerada o de maior potencial cariogênico, pois além de produzir ácido quando metabolizada no biofilme, ela serve de substrato para a síntese de polissacarídeos insolúveis, os glucanos extracelulares (Newbrun, 1967).

Quando comparada a seus monossacarídeos, glicose + frutose, percebemos que apesar das quedas de pH no biofilme dental ocorrerem nos mesmos intervalos de tempo quando glicose+frutose e sacarose foram fornecidas e ambas apresentarem concentrações inorgânicas similares, uma maior desmineralização ocorreu quando da exposição à sacarose.

Além disso, a concentração inorgânica do biofilme dental também é relevante em termos de desenvolvimento de cárie (Pearce, 1998; Nobre dos Santos *et al.*, 2002).

## 2. INTRODUÇÃO

Cárie dental é uma doença bacteriana dieta-dependente (Loesche, 1985), é consequência de um processo de desequilíbrio entre os fatores de desmineralização e remineralização (Cury, 1989). Além disso, a cárie dental é um processo dinâmico que depende das condições prevalentes na interface dente-biofilme, quando da ingestão de carboidratos fermentáveis (Cury, 1993).

Entre os carboidratos fermentáveis, a sacarose é considerada o de maior potencial cariogênico, pois além de produzir ácido quando metabolizada no biofilme, ela serve de substrato para a síntese de polissacarídeos insolúveis, os glucanos extracelulares (Newbrun, 1967).

A produção de glucanos acontece pelo aproveitamento de energia liberada pela hidrólise da sacarose através da enzima glicosiltransferase (Rölla, et al, 1985). A maior cariogenicidade da sacarose tem sido atribuída a porosidade da matriz da placa pela presença destes polissacarídeos (Dibdin & Shellis, 1988; Van Houte, 1994).

Entretanto, existem outros fatores a serem considerados. A concentração inorgânica da matriz do biofilme dental, especialmente em termos de íons cálcio, fósforo e fluoreto, pois define se haverá ou não desmineralização quando das quedas de pH (Moreno & Margolis, 1988; Margolis, et al, 1988, Tatevossian, 1990; Margolis et al, 1993). Além disso, foi demonstrado que a concentração inorgânica de fluoreto (F), cálcio (Ca) e fósforo inorgânico (Pi) na matriz da placa é menor quando da exposição à sacarose (Cury *et al.*, 1997). Pearce *et al.* (2002)

recentemente também demonstrou diminuição da concentração de Ca com o aumento da frequência de exposição à sacarose.

A concentração inorgânica da placa dental é relevante em termos de desenvolvimento de cárie (Pearce, 1998; Nobre dos Santos *et al.*, 2002), desde de que há uma relação inversa entre concentrações desses íons na placa dental e experiência de cárie (Ashley, 1972; Shaw *et al.*, 1993; Margolis *et al.*, 1988).

Até o momento, não há explicação para a simultânea queda de F, Ca, e Pi. Estudo realizado por Cury *et al.* (2000) avaliou se a presença desses íons na placa formada na presença de sacarose ou monossacarídeos (glicose+frutose) poderia estar relacionada a sua cariogenicidade. Apesar das quedas de pH na placa dental ocorrerem nos mesmos intervalos de tempo quando glicose+frutose e sacarose foram fornecidas e ambas apresentarem concentrações inorgânicas similares, uma maior desmineralização ocorreu quando da exposição à sacarose. Assim, o objetivo desse trabalho foi estudar a influência da sacarose e seus monossacarídeos (G+F) sobre o processo da cárie.

### **3. Revisão de Literatura**

#### **3.1 Cárie Dental**

Cárie dental é uma doença bacteriana dieta-dependente (Loesche, 1985), é consequência de um processo de desequilíbrio entre os fatores de desmineralização e remineralização e a presença de flúor nos fluidos da placa e esmalte pode controlar o desenvolvimento do processo de cárie por inibir o processo de desmineralização e ativar a remineralização (Cury, 1989).

A formação do biofilme dental é um processo dinâmico e complexo envolvendo três principais estágios:

- 1- Absorção específica de proteínas salivares sobre a superfície dental;
- 2- Adesão inicial de bactérias;
- 3- Proliferação e acúmulo da bactérias.

Essa desmineralização é causada pela produção de ácidos no biofilme dental e consequente queda de pH e a remineralização depende da capacidade tampão da saliva e da presença de íons como o flúor.

Além disso, a cárie dental é um processo dinâmico que depende das condições prevalentes na interface dente-biofilme, quando da ingestão de carboidratos fermentáveis (Cury, 1993).

Quando esses carboidratos estão presentes em excesso na dieta, eles são convertidos em polissacarídeos intracelulares, chamados glicogênio, os quais servem de reserva de energia em potencial para as bactérias presentes na microbiota oral.

Uma grande atenção tem se concentrado no papel desses polissacarídeos na patogenicidade dos microrganismos cariogênicos, pois em períodos do dia em que não há exposição a nenhum açúcar, eles podem ser usados como fonte de energia e os ácidos serão excretados.

Algumas bactérias orais também têm a capacidade de produzir polissacarídeos extracelulares a partir da sacarose, com auxílio das enzimas glicosiltransferase e frutossiltransferase. Essas enzimas extracelulares quebram a sacarose, há uma produção de energia e glicose e frutose são liberadas.

A glicose serve de substrato para a glicosiltransferase para a conversão extracelular em glucanos, que são altamente ramificados e insolúveis, pois possuem ligações  $\alpha(1-3)$ , e podem formar agregados fibrosos chamados atualmente de mutanos. Os outros glucanos formados apresentam predominantemente ligações  $\alpha(1-6)$ , formam cadeias flexíveis e quase sempre são solúveis, chamados de dextranos. A frutose é usada como substrato para a frutossiltransferase e é convertida em frutanos, que usualmente apresentam alto peso molecular, mas são bastante solúveis (Carlsson, 1986).

Na presença desses carboidratos e de seus produtos, ocorre uma modificação estrutural na matriz do biofilme, deixando-o mais poroso, como mostrado por Cury et al (1997).

Durante a formação do biofilme, reações altamente específicas ocorrem entre glicoproteínas salivares, superfícies dentais, bactérias e produtos bacterianos, resultando em uma progressão regular na composição bacteriana do biofilme.

A síntese de glucanos extracelulares pelos *Streptococcus mutans*, a partir da sacarose, parece ser um dos principais parâmetros que promovem o desenvolvimento do biofilme.

Ainda sobre a dinâmica de formação do biofilme, Rølla et al (1985), discutiram resultados que comprovam o conceito de que a enzima bacteriana glicosiltransferase tem um papel crucial na formação do biofilme induzida por sacarose.

Essa enzima é responsável pela quebra das moléculas de sacarose em glicose e frutose e pela produção de uma grande quantidade de energia. A partir dessa energia são produzidos os glucanos extracelulares, além disso a glicosiltransferase é responsável pela adesividade dos glucanos a superfícies sólidas, mais do que os glucanos por si só (Rølla et al, 1983).

A glicosiltransferase livre liga-se rapidamente a superfícies sólidas e pode então estar hábil a se ligar à bactéria diretamente ou através de interações entre as cadeias de glucanos com ligações  $\alpha(1-3)$  pela enzima adsorvida ou pelas enzimas na superfície da célula. Tais ligações estabelecem fortes ligações sacarose-dependente. Por isso, pode-se afirmar que a cárie é uma doença bacteriana dieta-dependente (Loesche, 1985), e que a sacarose tem um papel importante no desenvolvimento do processo de cárie.

Como exemplo podemos citar as lesões de cárie em superfícies lisas. Para que elas possam se desenvolver, o biofilme precisa aderir à superfície e isso é possível, não só pela adesão inicial das bactérias à película adquirida, mas também pela presença de glucanos insolúveis no biofilme (Carlsson, 1986).

Portanto, esses polissacarídeos insolúveis são componentes estruturais do biofilme, com efeito adesivo das bactérias ao dente, e entre si. Já os polissacarídeos solúveis presentes no biofilme, são degradáveis pela microbiota, mas podem funcionar como reservas transitórias de carboidratos fermentáveis, como foi dito anteriormente (Carlsson, 1986), prolongando dessa forma a duração da produção de ácidos.

Além disso, a concentração inorgânica da placa dental também é relevante em termos de desenvolvimento de cárie (Pearce, 1998; Nobre dos Santos *et al.*, 2002), desde de que há uma relação inversa entre concentrações desses íons na placa dental e experiência de cárie (Ashley, 1972; Shaw *et al.*, 1993; Margolis *et al.*, 1988).

Até o momento, não há explicação para a simultânea queda de F, Ca, e Pi. Estudo realizado por Cury *et al.* (2000) avaliou se a presença desses íons na placa formada na presença de sacarose ou monossacarídeos (glicose+frutose) poderia estar relacionada a sua cariogenicidade. Apesar das quedas de pH na placa dental ocorrerem nos mesmos intervalos de tempo quando glicose+frutose e sacarose foram fornecidas e ambas apresentarem concentrações inorgânicas similares, uma maior desmineralização ocorreu quando da exposição à sacarose.

## 3.2 Sacarose

A sacarose é um carboidrato do tipo dissacarídeo, formada pela união dos monossacarídeos glicose e frutose, através de uma ligação  $\alpha(1-2)$ . Ela é fermentável a ácidos pelo biofilme dental tanto quanto seus monossacarídeos componentes (G+F), entretanto ela é mais cariogênica.

Esta maior cariogenicidade deve estar ligada a matriz do biofilme formado na presença de sacarose em relação àquele formado na presença de G+F (Cury *et al.*, 2000). Segundo Newbrun (1967), essa maior cariogenicidade é atribuída ao fato da sacarose além de ser fermentável, ser transformada no biofilme dental em polissacarídeos extracelulares, insolúveis, que são os glucanos (Van Houte, 1994). A presença desses polissacarídeos extracelulares dá maior porosidade ao biofilme dental formado na presença de sacarose, contribuindo para a cariogenicidade desse carboidrato (Dibdin & Shellis, 1988). Além disso, foi demonstrado que a concentração inorgânica de fluoreto (F), cálcio (Ca) e fósforo inorgânico (Pi) na matriz da placa é menor quando da exposição à sacarose (Cury *et al.*, 1997). Pearce *et al.* (2002) recentemente também demonstrou diminuição da concentração de Ca com o aumento da frequência de exposição à sacarose.

Entre os carboidratos fermentáveis como sacarose, glicose e frutose, a sacarose é considerada de maior potencial cariogênico (Newbrun, 1967).

No biofilme dental quando a sacarose é quebrada pela enzima extracelular glicosiltransferase produzida pelos *Streptococcus mutans*, ou seja, quando a

ligação  $\alpha(1-2)$  da sacarose é quebrada, há uma grande produção de energia e liberação dos monossacarídeos glicose e frutose.

A glicose serve de substrato para a glicosiltransferase para a conversão extracelular em glucanos, que são altamente ramificados e insolúveis, pois possuem ligações  $\alpha(1-3)$ , e podem formar agregados fibrosos chamados atualmente de mutanos. Os outros glucanos formados apresentam predominantemente ligações  $\alpha(1-6)$ , formam cadeias flexíveis e quase sempre são solúveis, chamados de dextranos. A frutose é usada como substrato para a frutossiltransferase e é convertida em frutanos, que usualmente apresentam alto peso molecular, mas são bastante solúveis (Carlsson, 1986).

Segundo Rölla et al (1985), a enzima bacteriana glicosiltransferase tem um papel crucial na formação do biofilme induzida por sacarose. A sacarose possui um alto potencial de induzir cárie dental (Gustafsson et al, 1954), maior que a glicose e frutose, apesar do fato desses monossacarídeos originarem tanto quanto ou maior produção de ácidos no biofilme. Admite-se que a cariogenicidade da sacarose está associada a alta liberação de energia durante a hidrólise desse dissacarídeo, que pode ser utilizada pela bactéria para a síntese de glucanos. Além disso, a glicosiltransferase é responsável pela adesividade dos glucanos as superfícies sólidas, mais do que os glucanos por si só (Rölla et al, 1983).

A glicosiltransferase livre liga-se rapidamente a superfícies sólidas e pode então estar hábil a se ligar à bactéria diretamente ou através de interações entre as cadeias de glucanos com ligações  $\alpha(1-3)$  pela enzima adsorvida ou pelas

enzimas na superfície da célula. Tais ligações estabelecem fortes ligações sacarose-dependente.

Além disso, sabe-se que os glucanos insolúveis produzidos pelos estreptococos do grupo mutans, na presença de sacarose, são ricos em ligações do tipo  $\alpha(1-3)$  e a solubilidade dos glucanos depende da proporção de resíduos de glicose com ligação  $\alpha(1-3)$  em relação àqueles com ligações  $\alpha(1-6)$ .

Quando há um grande número de unidades de glicose com ligações  $\alpha(1-3)$ , o glucano terá baixa solubilidade em água e uma conformação estrutural que resulta em cadeias rígidas. Os polissacarídeos com ligação  $\alpha(1-6)$  contém uma ligação extra entre os resíduos, o que permite flexibilidade e rotação da molécula.

Quando comparamos essa cariogenicidade da sacarose, dada pela presença dessas cadeias de baixa solubilidade, e diferentes carboidratos como amido, maltose, lactose, frutose e glicose – observamos que a sacarose mais do que qualquer outro carboidrato induz mais lesões de superfície lisa (Carlsson, 1986).

Portanto, é possível afirmar o grande potencial cariogênico da sacarose e a sua relação direta com o desenvolvimento de cárie dental.

### 3.3 Glicose +Frutose

São carboidratos fermentáveis e quando unidos por uma ligação  $\alpha(1-2)$  formam a sacarose. Esses monossacarídeos têm características semelhantes as características da sacarose, ou seja, são fermentados na matriz do biofilme e produzem polissacarídeos quando metabolizados, mas não são considerados tão cariogênicos e relevantes em termos de cárie dental, pois não produzem os polissacarídeos extracelulares insolúveis.

Quando comparamos a glicose e a frutose com a sacarose, observamos que há um menor índice de placa e quantidade de biofilme com a glicose e a frutose, enquanto a maior quantidade de biofilme e índice de placa foi observada com a sacarose. Além disso, houve uma significativa redução na quantidade de polissacarídeos insolúveis quando da presença dos monossacarídeos (Scheinin & Mäkinen, 1971). Entretanto, nesse mesmo estudo não foram observadas diferenças estatísticas com os diferentes açúcares em relação à concentração inorgânica dos íons cálcio, fósforo inorgânico e fluoreto.

Em estudo realizado anteriormente, comparando-se uma dieta normal com ingestão de sacarose e uma dieta na qual a sacarose foi substituída por xarope de glicose, essa última dieta produziu um biofilme contendo significativamente mais carboidratos solúveis, mas não houve diferença em relação aos carboidratos totais insolúveis. Os níveis de cálcio foram similares nas duas dietas, mas na dieta com glicose houve maior concentração de fósforo inorgânico (Fry & Grenby, 1972).

Mas quando a glicose e a frutose estão presentes em grande quantidade na dieta elas permitem a produção de polissacarídeos intracelulares (glicogênio, por

exemplo) que podem ser metabolizados quando outras fontes de carboidratos estão ausentes, como entre as refeições (Jenkins, 1997).

Em uma dieta básica livre de carboidratos ou suplementada com glicose e frutose apresentou quantidade similar de biofilme. Quando a mesma dieta foi suplementada com sacarose houve um aumento no volume de biofilme. Os polissacarídeos insolúveis sintetizados pelos microrganismos do biofilme a partir da sacarose são importantes pois servem como reserva de energia e como constituintes do biofilme. Já os polissacarídeos intracelulares são produzidos como grânulos de reserva, por muitas espécies bacterianas a partir de vários carboidratos como glicose frutose e sacarose (Carlsson & Egelberg, 1965).

Entretanto, a principal diferença entre os monossacarídeos glicose+frutose e a sacarose está na capacidade que esse dissacarídeo tem de produzir, através da energia liberada com a sua hidrólise, os glucanos insolúveis os quais são tão relevantes em termos de cariogenicidade (Rölla et al, 1983). Já a glicose e a frutose, como dito anteriormente, produzem apenas polissacarídeos extracelulares solúveis ou polissacarídeos intracelulares.

Portanto, pode-se concluir que apesar dos monossacarídeos glicose+frutose originarem tanto quanto ou maior produção de ácidos pelos microrganismos do biofilme comparando com a sacarose, esta possui um maior potencial de induzir cárie do que seus monossacarídeos (Gustafsson et al, 1954).

#### **4. Conclusão**

Após esse estudo podemos afirmar que a cárie dental é uma doença bacteriana dieta-dependente (Loesche, 1985), consequência de um processo dinâmico, que depende das condições da interface dente-biofilme e que resulta de um desequilíbrio entre os fatores de desmineralização e remineralização (Cury, 1989, 1993).

A presença e metabolização de carboidratos fermentáveis no biofilme dental provoca alterações em sua matriz, deixando-a mais porosa e contribuindo para sua carigenicidade. (Cury, 1997).

A sacarose é o carboidrato responsável por esse caráter cariogênico do biofilme, pois é responsável pela produção de polissacarídeos extracelulares insolúveis (glucanos), que dão porosidade à matriz do biofilme.

Já a glicose e a frutose também são carboidratos fermentáveis metabolizados pelas bactérias no biofilme, mas eles não tem a capacidade de sintetizar os polissacarídeos extracelulares, eles produzem apenas os polissacarídeos de reserva ou intracelulares.

Portanto, podemos afirmar que apesar dos monossacarídeos glicose e frutose serem metabolizados no biofilme dental, assim como a sacarose, esta possui um maior potencial de induzir cárie do que seus monossacarídeos componentes.

## 5. Referências Bibliográficas

1. ASHLEY, F. P. Calcium and phosphorus concentrations of dental plaque related to dental caries in 11 – to – 14 year-old male subjects *Caries Res.*, 9: 351-362, 1975.
2. ASHLEY, F. P. Effects of single exposure to sugar on calcium and phosphorus concentration of dental plaque. *J. Dent. Res.*, 55: 1015-1018, 1975.
3. ASHLEY, F. P. Relationship between dietary sugar intake, parotid saliva, plaque calcium, and phosphorus concentration and caries. *J. Dent. Res.*, 50: 1212, 1975.
4. ASHLEY, F. P. Relationship of diet, saliva, plaque and caries. *J. Dent. Res.*, 51: 1234, 1972.
5. ASHLEY, F. P., WILSON, R.F. Dental plaque and caries. A 3 – year longitudinal study in children. *Brit. Dent. J.*, 142: 85-91, 1977.
6. ASHLEY, F. P., WILSON, R.F. The relationship between dietary sugar experience and the quantity and biochemical composition of dental plaque in man. *Archs. Oral Biol.*, 22: 409-414, 1977.
7. ASHLEY, F. P., WILSON, R.F. The relationship between calcium and phosphorus concentration of human saliva and dental plaque. *Archs. Oral Biol.*, 23: 69-73, 1978.
8. CARLSSON, J., SUNDSTRÖM, B. Variations in composition of early dental plaque following ingestion of sucrose and glucose. *Odonto. Revy*, 19: 161-168, 1968.

9. CARLSSON, J., EGELBERG, J. Effect of diet on early plaque formation in man. *Odont. Rev.*, 16: 112-125, 1965.
10. CURY, J.A. Fluoride therapy In: BARATIERI, L.N. et. al. *Advanced Operative Dentistry.*, 43-67, 1993.
11. CURY, J.A., REBELLO, M.A .B., DEL BEL CURY, A, A, In situ relationship between sucrose exposure and composition of dental plaque. *Caries Res.*, 31: 356-360, 1997.
12. CURY, J.A.; REBELLO, M.A.B.; DEL BEL CURY, A.A; DERBYSHIRE, M.T.V.C.; TABCHOURY, C.P.M. Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in the presence of sucrose or glucose and fructose. *Caries Res*, v. 34, p. 491-497, 2000.
13. DIBDIN, G.H.; SHELLIS, R.P. Physical and biochemical studies of *Streptococcus mutans* sediments suggest new factors linking the cariogenicity of plaque with its extracellular polysaccharide content. *J Dent Res*, v.67, n.6, p.890-895, 1988.
14. FRY, A .J., GRENBY, T.H. The effect of reduced sucrose intake on formation and composition of dental plaque in a group of men in Antarctic. *Archs Oral Biol.*, 17: 873-882, 1972.
15. GUSTAFSSON, B.E., et. al. The Vipeholm Dental Caries Study. The effect of different levels of carbohydrate intake on caries activity in 436 individuals observed for five years. *Acta Odont. Sacnd.*, 11: 232-364, 1954.
16. JENKINS, G. N. *The physiology and biochemistry of the mouth*, 4 ed., 360-413, 1978.
17. JENKINS, G. N. EDGARD, W. M. Distribution and forms of F in saliva and

- plaque. *Caries Res.*, 11: 226-237, 1977.
18. LOESCHE, W.J. The rationale for caries prevention through the use of sugar substitutes. *Int Dent J*, London,35: 1-8, 1985.
19. MÄKINEN, K.K., SODERLING, E., HURTTIA, H. Biochemical microbiologic, and clinical comparasion between two dentifrices that contain different mixtures of sugar alcohols. *J. Am. Dent. Ass.*, 111: 745-751, 1985.
20. MARGOLIS, HC; DUCKWORTH, JH; MORENO, EC. Composition of pooled resting plaque fluid from caries-free and caries-susceptible individuals. *J Dent Res*, 67: 1468-1475, 1988.
21. MARGOLIS, H.C. Na assessment of recent advances in the study of chemistry and biochemistry of dental plaque fluid. *J. Dent. Res.*, 69: 1337-1342, 1990.
22. MARGOLIS, H.C., MORENO, E.C. Composition of pooled plaque fluid from Caries-free and caries-positive individuals following sucrose exposure. *J. Dent. Res.*, 71: 1776-1784, 1992.
23. 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.*, 27: 467-473, 1993.
24. MORENO, E.C., MARGOLIS, H.C. Composition of human plaque fluid. *J. Dent. Res.*, 67: 1181-1189, 1988.
25. NEWBRUN, E. Sucrose, the arch criminal of dental caries. *Odontol Revy*, v. 18: 373-386, 1967.
26. NOBRE DOS SANTOS, M.; MELO DOS SANTOS, L.; FRANCISCO, S.B.; CURY, J.A. Relationship among dental plaque composition, daily sugar exposure and caries in the primary dentition. *Caries Res*, 36: 347-352, 2002.

27. PEARCE, E. Plaque minerals and dental caries. *N Z Dent J*, 94: 12-15, 1998.
28. PEARCE, E.I.F.; SISSONS, C.H.; COLEMAN, M.; WANG, X.; ANDERSON, S.A.; WONG, L. The effect of sucrose application frequency and basal nutrient conditions on the calcium and phosphate content of experimental dental plaque. *Caries Res*, 36: 87-92, 2002.
29. RÖLLA, G. High amounts of lipoteichoic acid in sucrose-induced plaque in vivo. *Caries Res.*, 14: 235-238, 1980.
30. RÖLLA, G. Why is sucrose so cariogenic? The role of glucosyltransferase and polysaccharides. *Scand. J. Dent. Res.*, 97: 115-119, 1989.
31. RÖLLA, G., SCHEIE, A A, CIARD, J.E. Role of sucrose in plaque formation. *Scand. J. Dent. Res.*, 93: 105-111, 1985.
32. RÖLLA, G., CIARD, J.E., SCHULTZ, A S. Adsorption of glucosyltransferase to saliva coated hydroxyapatite- Possible mechanism for sucrose dependent bacterial colonization of teeth. *Scand. J. Dent. Res.*, 91: 112-117, 1983.
33. SCHEININ, A, MÄKINEN, K.K. The effect of various sugars on the formation and chemical composition of dental plaque. *Int. Dent. J.*, 21: 302-321, 1971.
34. SHAM, L. et. al. Calcium and phosphorus content of plaque and saliva in relation to dental caries. *Caries Res.*, 17: 543-548, 1983.
35. TATEVOSSIAN, A . Facts and artefacts in research on human dental plaque fluid. *J. Dent. Res.*, 69: 1309-1315, 1990.
36. TATEVOSSIAN, A . Fluoride in dental plaque and its effects. *J. Dent. Res.*, 69: 645-683, 1990.

37. VAN HOUTE, J. Role of micro-organisms in caries etiology. *J Dent Res*, 73: 672-681,1994.