Efeito da placa bacteriana de 4, 7 e 10 dias na desmineralização do esmalte dental *in situ* e possível relação com fatores salivares e microbiológicos

Livia Maria Andaló Tenuta

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Odontologia, área de Odontopediatria.

(Edição Revisada)

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo de Oliveira Lima

Bauru

2001

Tenuta, Livia Maria Andaló

T262e Efeito da placa bacteriana de 4, 7 e 10 dias na desmineralização do esmalte dental *in situ* e possível relação com fatores salivares e microbiológicos / Livia Maria Andaló Tenuta – Bauru, 2001.

136p.: il.; 29,7 cm

Dissertação. (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Bauru. USP.

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo de Oliveira Lima

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura do autor:

Data:

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Bauru - USP, em reunião de 25 de fevereiro de 1999, como apresentado no Anexo 1.

Dados Curriculares

Livia Maria Andaló Tenuta

Filiação	Luiz Gonzaga Tenuta
	Adriane Ribeiro Andaló Tenuta
Naturalidade	Bauru, SP
Nascimento	6 de agosto de 1976
1994-1997	Curso de graduação de Odontologia, na Faculdade de Odontologia de Bauru - USP
1997	Prêmios APCD e Prof. João Sampaio Doria, por ter se destacado como melhor aluna da 33ª turma do curso de Odontologia da Faculdade de Odontologia de Bauru - USP
1998-2001	Curso de Mestrado em Odontopediatria, na Faculdade de Odontologia de Bauru - USP
2000	Professora colaboradora do Curso de Odontologia da Universidade Estadual de Maringá, UEM, PR
Associações	Associação Paulista de Cirurgiões-Dentistas – APCD
	Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica – SBPqO
	International Association for Dental Research – IADR

"Nunca te é concedido um desejo sem que te seja concedida

também a faculdade de torná-lo realidade.

Entretanto, é possível que tenhas que lutar por ele."

Richard Bach

Aos meus pais, Adriane e Luiz,
meus irmãos, Cristiano e Laila,
minha avó Noely e ao Guilherme,
por terem sempre me
dado condições de lutar,
dedico este trabalho.

"Dê-me, Senhor,

agudeza para entender,

capacidade para reter,

método e faculdade para aprender,

sutileza para interpretar,

graça e abundância para falar.

Dê-me, Senhor,

acerto ao começar,

direção ao progredir

e perfeição ao concluir."

São Tomás de Aquino

A **Deus**, *que permeia meu caminhar,*

concedendo-me o valioso presente da vida.

AGRADECIMENTOS

"O que você fizer será mais
importante do que aquilo que conseguir.
E como você se sentir por isso será ainda
mais importante do que o que tiver feito."

Jerry Gilles

À **Ciça**, que foi muito mais que uma amiga, me acolheu em sua casa e sempre esteve disposta a escutar e discutir minhas dúvidas e incertezas durante a realização desta pesquisa. Exemplo de humildade e grande pesquisadora, nunca esquecerei seu desprendimento e amizade.

Às grandes amigas **Daniela Rios** e **Marina**, por compartilharem comigo sonhos, angústias e conquistas, pessoais e profissionais, e não medirem esforços em auxiliar-me nos momentos mais difíceis deste trabalho, minha eterna gratidão.

Às **Profas. Dras. Maria Fidela de Lima Navarro** e **Renata Corrêa Pascotto**, por terem guiado meus primeiros passos na vida científica, estimulando minha constante evolução. Especialmente à Profa. Fidela, agradeço a confiança e amizade, permitindo que eu superasse desafios e conquistasse vitórias até então apenas sonhadas.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. José Eduardo de Oliveira Lima**, admiro suas convicções e levarei sempre comigo aquilo que me ensinou. Espero ser uma multiplicadora de seus conhecimentos sobre a prevenção da cárie dentária.

À **Profa. Dra. Salete Moura Bonifácio da Silva**, por ser um exemplo de dedicação à Odontopediatria, sempre pronta a ajudar e transmitir suas experiências, e pela idéia original deste trabalho.

Aos demais professores do Departamento de Odontopediatria da FOB-USP, **Prof. Dr. Aymar Pavarini, Prof. Dr. Bernardo Gonzalez Vono, Profa. Dra. Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado, Profa. Dra. Maria Francisca Thereza Borro Bijella** e **Prof. Dr. Ruy César Camargo Abdo**, responsáveis por despertar em mim o interesse pela Odontopediatria.

Aos **Profs. Drs. Jaime Aparecido Cury** e **Cinthia Machado Tabchoury**, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, pela atenção com que me receberam no Laboratório de Bioquímica Oral e partilharam seus preciosos conhecimentos e experiências. Sinto-me honrada em ter trabalhado nesse laboratório, que contagia pela seriedade da produção científica.

Ao **Prof. Dr. Celso Luiz Cardoso**, do Departamento de Análises Clínicas da Universidade Estadual de Maringá, pela dedicação e ajuda na realização das análises bacteriológicas. A oportunidade de trabalhar com microbiologia sob sua orientação contribuiu muito para o entendimento que tenho hoje a respeito da cárie.

À **Universidade Estadual de Maringá**, à qual tenho me dedicado como docente, pela oportunidade de crescimento e de desenvolver nessa instituição grande parte da fase experimental deste trabalho.

"Você é como o profundo desejo que o impulsiona.

Tal como é o seu desejo, é a sua vontade.

Tal como é a sua vontade, são os seus atos.

Tal como são os seus atos, é o seu destino."

Brihadaranyaka Upanishad

Meus sinceros agradecimentos aos voluntários que participaram dessa pesquisa, **Aline, Bianca, Carina, Carlos, Christiano, Cínthia, Cláudia, Cristiana, Denis, Éricsson, Estela, Eduardo, Janiele, Joseane** e **Rodrigo**, pelo senso de cooperação, desprendimento e dedicação: sem vocês, este trabalho não poderia ser realizado.

Às alunas **Bianca, Carina, Cínthia** e **Janiele**, pela ajuda indispensável durante a fase experimental, especialmente com os testes bacteriológicos, meu muito obrigada.

Agradeço sinceramente

À **Faculdade de Odontologia de Bauru - USP**, meu lar nos anos de graduação e pós-graduação, na pessoa do senhor diretor, Prof. Dr. Aymar Pavarini, e do coordenador da pós-graduação, Prof. Dr. Luiz Fernando Pegoraro; onde quer que eu esteja, sempre levantarei a bandeira desta escola.

Aos colegas do mestrado, **Adriano, Ana Carla, Ana Luiza, Cleide, Dani, Fernanda, Marina, Patrícia** e **Paloma**, que tornaram inesquecíveis as lembranças desses anos, e do doutorado, **Fabiana, Sarah, Maria Lígia** e **Edmêr**, companheiros no estudo da metodologia deste trabalho.

À **Ana Carla**, que dividiu comigo as inúmeras dificuldades no início da pesquisa.

Às funcionárias do Departamento de Odontopediatria da FOB-USP, **Estela, Fátima, Kelle, D. Lia, Lidiane, Lilian, D. Wilma** e ao **Paulo**, pela atenção e amizade.

À **Profa. Dra. Altair Antoninha Del Bel Cury**, pela orientação na confecção dos dispositivos intrabucais utilizados neste trabalho.

Aos **alunos de graduação e pós-graduação** do Laboratório de Bioquímica Oral da FOP-UNICAMP, em especial à **Adriana**, pela enorme atenção e amizade e por estarem sempre prontos a me ajudar com minhas dúvidas.

Aos professores **José Roberto Pereira Lauris** (FOB-USP) e **Yoshiaki Fukushigue** (UEM) pela orientação e execução da análise estatística dos dados.

À **Aline**, aluna do 5º ano do curso de Farmácia da Universidade Estadual de Maringá, pela titulação do ácido utilizado no teste de capacidade tampão.

À **Byk Farmacêutica**, que gentilmente forneceu a bacitracina utilizada no preparo do meio de cultura para contagem de estreptococos mutans.

Aos funcionários dos laboratórios de Bioquímica Oral e Prótese Parcial Removível da FOP-UNICAMP, **Valdomiro, Alfredo, Mariza** e **D. Jose**, pela atenção e ajuda.

Aos funcionários do Departamento de Análises Clínicas da Universidade Estadual de Maringá-UEM, em especial à **Nilza** e ao **Márcio**, pelo auxílio nas análises bacteriológicas.

Ao **Departamento de Dentística** da FOB-USP, por ceder seus equipamentos e dependências para a realização deste trabalho, em especial ao funcionário **Nelson**.

Ao **Prof. Dr. José Mondelli**, pela obtenção dos dentes bovinos.

Aos **Profs. Drs. Marília Buzalaf** e **Mauro Granjeiro**, do Departamento de Bioquímica da FOB-USP, e funcionários **Ovídio** e **Thelma**, pela prontidão com que me atenderam em todas as solicitações.

À funcionária **Eloisa**, do Departamento de Odontologia da Universidade Estadual de Maringá, pela ajuda durante a moldagem dos voluntários.

Aos professores de Odontopediatria da Universidade Estadual de Maringá, **Carlos, Marina, Sandra** e **Conrado**, por terem me recebido de braços abertos como docente nessa instituição, sempre apoiando e incentivando minha evolução.

Aos colegas da graduação, em especial **Ana Luiza, Daniela Cefaly, Gisele, Luciana Lourenço, Luciana Reis** e **Eduardo** e à **Linda**, pela amizade que construímos e pela saudade dos bons tempos que ficarão na lembrança.

Ao **Dr. Ulisses, D. Regina, Natália, Thiago** e **Felipe**, que me acolheram como uma verdadeira filha e irmã e compartilharam as alegrias e dificuldades de minha caminhada.

Aos funcionários da biblioteca da FOB-USP, em especial **Cibele, Valéria, Vera** e **César**, pela dedicação e auxílio, desde a procura por artigos científicos até a formatação final do trabalho. Ao **Salvador, Joice** e **André**, pela prontidão na realização dos inúmeros xerox de artigos durante os anos de mestrado.

À **FAPESP**, pelo apoio financeiro voltado à busca do conhecimento.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para que este trabalho fosse concluído.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E EXPRESSÕES xiii
RESUMO xiv
1. INTRODUÇÃO 1
2. REVISÃO DE LITERATURA 4
2.1. Relação entre os fatores envolvidos na etiologia da cárie dentária 5
2.1.1. *Estreptococos mutans e cárie: breve histórico* 5
2.1.2. *Relação entre saliva, dieta, microorganismos e cárie* 7
2.1.3. *Microbiologia da placa bacteriana associada à cárie* 17
2.1.4. *Acúmulo de placa bacteriana e progressão da lesão de cárie* 29
2.2. Avaliação da perda mineral do esmalte 31
2.3. Estudos *in situ* 35
3. PROPOSIÇÃO 46
4. MATERIAL E MÉTODOS 48
4.1. Delineamento experimental 49
4.2. Preparo dos blocos de esmalte 49
4.3. Seleção dos voluntários 56
4.4. Avaliação do fluxo salivar estimulado 56
4.5. Avaliação da capacidade tampão da saliva estimulada 57
4.6. Contagem de estreptococos mutans na saliva estimulada 57
4.7. Preparo do dispositivo intrabucal palatino 60
4.8. Procedimentos intrabucais 60
4.9. Contagem de estreptococos mutans na placa bacteriana 62
4.10. Análise da perda de dureza superficial do esmalte 67
4.11. Análise estatística dos dados 67
5. RESULTADOS 69
5.1. Fluxo salivar, capacidade tampão da saliva e níveis salivares de estreptococos mutans 70
5.2. Microdureza do esmalte 72
5.3. Análise bacteriológica da placa bacteriana e relação com a perda de dureza do esmalte 80
6. DISCUSSÃO 87
7. CONCLUSÕES 107
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 109
ANEXOS 119
ABSTRACT 135

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E EXPRESSÕES

UFC = unidade formadora de colônia

MSB (ágar) = ágar mitis salivarius bacitracina

pH = potencial hidrogeniônico

H_2 = gás hidrogênio

CO_2 = gás carbônico

HCl = ácido clorídrico

N = normal, normalidade

KHz = quilo Hertz

ppm = parte por milhão

log = função logarítmica

rpm = rotações por minuto

p = nível de significância

D.P. = desvio padrão

p.a. = para análise

KHN = número de dureza Knoop

%PDS = porcentagem de perda de dureza superficial

CPOS = índice de superfícies dentárias permanentes cariadas, extraídas e restauradas

CPOD = índice de dentes permanentes cariados, extraídos e restaurados

ceos = índice de superfícies dentárias decíduas cariadas, extraídas e restauradas

ceod = índice de dentes decíduos cariados, extraídos e restaurados

in situ (latim) = em sítio, no local (no caso, a cavidade bucal)

in vivo (latim) = no ser humano

in vitro (latim) = em laboratório

RESUMO

RESUMO

Efeito da placa bacteriana de 4, 7 e 10 dias na desmineralização do esmalte dental *in situ* e possível relação com fatores salivares e microbiológicos

O objetivo deste trabalho foi avaliar a desmineralização do esmalte após períodos de 4, 7 e 10 dias de acúmulo de placa bacteriana *in situ*, além da influência de fatores salivares e microbiológicos no processo. Após a avaliação do fluxo salivar estimulado, capacidade tampão da saliva e níveis salivares de estreptococos do grupo mutans, 13 voluntários utilizaram dispositivos intrabucais palatinos contendo 4 blocos de esmalte bovino (4 X 4 X 2 mm) polidos, cobertos por uma tela plástica, durante 3 períodos cruzados de 4, 7 e 10 dias. Os voluntários utilizaram um dentifrício não fluoretado e gotejaram 10 vezes ao dia uma solução de sacarose a 20% sobre os blocos de esmalte. A microdureza superficial dos blocos foi determinada antes e após a desmineralização *in situ*, utilizando um penetrador Knoop e carga de 50 g por 5 s. Ao final de cada fase experimental, a placa bacteriana formada sobre os blocos foi coletada e a porcentagem de estreptococos mutans em relação ao número de bactérias totais foi determinada. Houve diferença estatisticamente significante, segundo o teste "t" pareado, entre a microdureza inicial e final nos três períodos estudados ($p<0,05$). A porcentagem de perda de dureza superficial (%PDS) foi em média de 13,8%, 19,3% e 48,3%, nos períodos de 4, 7 e 10 dias. Não houve diferença estatisticamente significante entre a %PDS com 4 e 7 dias, de acordo com a análise de variância e teste de Tukey ($p<0,05$). A correlação entre a %PDS e os fatores salivares e microbiológicos avaliados foi determinada por meio dos coeficientes de correlação de Pearson e Spearman, com $p<0,05$. Não foi encontrada correlação estatisticamente significante entre a %PDS e os fatores salivares avaliados inicialmente. Em aproximadamente metade das análises de placa bacteriana não foram detectados estreptococos mutans, embora tenha ocorrido desmineralização do esmalte. A porcentagem de estreptococos mutans na placa bacteriana não apresentou correlação com os níveis salivares dessas bactérias. Não foi encontrada correlação entre a %PDS e a porcentagem de estreptococos mutans na placa bacteriana formada sobre os blocos de esmalte. A %PDS nos blocos cobertos por placa bacteriana em que foram detectados estreptococos mutans foi estatisticamente maior do que nos blocos em que eles não foram detectados, apenas no período de 4 dias, de acordo com o teste de Mann-Whitney ($p<0,05$). Os resultados mostraram desmineralização do esmalte *in situ* após curtos períodos de acúmulo de placa bacteriana, não tendo sido encontrada relação com os fatores salivares avaliados ou com as contagens de estreptococos mutans na saliva e na placa.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Desde 1962, quando KEYES[54] utilizou um diagrama para esquematizar a complexa etiologia da cárie dentária, os pesquisadores vêm buscando respostas para numerosas dúvidas acerca do desenvolvimento e prevenção dessa doença. A aparente simplicidade na identificação dos fatores etiológicos envolvidos no desenvolvimento da cárie, segundo a tríade de KEYES, tem se mostrado envolta por mecanismos complexos, ainda não totalmente entendidos. Embora a cárie possa ser vista como o resultado da ação de microorganismos acidogênicos, alimentados por uma dieta rica em açúcares, sobre um hospedeiro susceptível[5, 23, 35, 54, 67, 94], outras abordagens do seu entendimento sugerem a alternância de períodos de desmineralização e remineralização, durante o contato íntimo do esmalte dentário com um biofilme bacteriano de natureza complexa, que sofre influência de fatores do ambiente bucal, como a dieta e a saliva[34, 35, 74, 102, 111].

O conhecimento dos mecanismos envolvidos na multifatoriedade da cárie pode ajudar no estabelecimento de medidas preventivas eficazes. Apesar do flúor vir sendo utilizado maciçamente nas últimas décadas, devido a sua comprovada ação anticariogênica, a ocorrência de cárie em indivíduos que têm acesso diário a este agente sugere que outras abordagens preventivas sejam desenvolvidas. A literatura é escassa em estudos que avaliem as alterações no esmalte alguns dias após o estabelecimento da placa bacteriana. O entendimento dos eventos que ocorrem nesses períodos curtos de tempo ajudaria a nortear o desenvolvimento de outros programas preventivos, principalmente os que se baseiam no controle da placa bacteriana.

A utilização de testes *in situ* permite a observação da influência dos fatores presentes na cavidade bucal no processo de desmineralização do esmalte, sem os empecilhos técnicos e éticos dos estudos *in vivo*[33, 59, 112]. Os fatores microbiológicos e salivares peculiares de cada indivíduo podem ser estudados, bem como sua relação com a severidade do ataque cariogênico. Além disso, a desmineralização inicial do esmalte, que

antecede as alterações macroscópicas, pode ser determinada através de métodos sensíveis de avaliação da perda mineral, mesmo em períodos curtos de tempo[59, 60, 72, 112].

Este trabalho foi idealizado visando um maior entendimento do processo de desmineralização inicial do esmalte, buscando determinar o tempo necessário para que a placa bacteriana se torne cariogênica. Utilizando um modelo *in situ*, alguns fatores salivares e microbiológicos que interferem neste evento, como fluxo salivar, capacidade tampão da saliva e contagem de estreptococos mutans na saliva e na placa, também foram avaliados.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Relação entre os fatores envolvidos na etiologia da cárie dentária

2.1.1. Estreptococos mutans e cárie: breve histórico

O estudo da relação entre os estreptococos mutans e a cárie dentária teve início em 1924, quando CLARKE[16] isolou essas bactérias de lesões de cárie em humanos. O nome *Streptococcus mutans* se baseou no seu aspecto após a coloração de Gram, mais oval que redondo, como se fosse uma forma mutante de estreptococo. Outros pesquisadores não foram capazes de encontrar os *S. mutans* nas lesões de cárie, que acabaram esquecidos por várias décadas.

Nos anos 60 o papel etiológico de certos estreptococos no desenvolvimento de cárie e o caráter transmissível da doença foi estudado extensivamente. KEYES[53] determinou, em 1960, por meio de estudos com hamsters e ratos, que a cárie é uma doença infecciosa e transmissível, na qual está envolvida uma microbiota sensível à penicilina. Variando a dieta e os microorganismos aos quais esses animais eram expostos, KEYES encontrou respostas diferentes no desenvolvimento de cárie, diretamente relacionadas à aquisição de certos microorganismos pelo contato com animais ou fezes de animais com eles contaminados. FITZGERALD; KEYES[36], 1960, demonstraram que a cárie em hamsters era causada por certos estreptococos. Os autores inocularam em hamsters livres de cárie cepas de estreptococos, difteróides e lactobacilos e os alimentaram com uma dieta cariogênica por 35 a 70 dias. A inoculação de 4 ou 5 cepas de estreptococos em hamsters cárie inativos resultou no desenvolvimento amplo de cárie. Entretanto, nenhum dos animais infectados com culturas mistas de lactobacilos e difteróides mostrou evidência de cárie. Os autores também descobriram que a cárie poderia ser causada por uma única cepa desses estreptococos e concluíram que havia um grau considerável de espécies e cepas específicas capazes de causar cárie, mas, evidentemente, nem todos os microorganismos acidogênicos presentes na cavidade bucal estavam envolvidos em sua iniciação e desenvolvimento. Além disso, eles enfatizaram que a cárie é uma doença multifatorial.

Apenas no final da década de 60, os pesquisadores relacionaram os estreptococos

indutores de cárie dos estudos de FITZGERALD e KEYES com os *Streptococcus mutans* descritos por Clarke. EDWARDSSON[28], 1968, isolou estreptococos da placa bacteriana de 49 indivíduos e comparou suas características fisiológicas, morfologia colonial e celular e capacidade de induzir cárie em hamsters, com as características de outros estreptococos de referência, entre eles duas cepas de estreptococos indutores de cárie isoladas por outros pesquisadores (Ingbritt e 3720). Foram encontradas várias semelhanças entre as bactérias isoladas da placa e as cepas de referência. Além disso, os estreptococos apresentaram características semelhantes a uma cepa representativa dos *Streptococcus mutans* descritos por CLARKE, reisolada em 1965 e mantida no National Collection of Type Cultures em Londres.

O crescente interesse em pesquisar os *S. mutans* como agente etiológico da cárie exigiu a criação de métodos de isolamento mais precisos. Assim, em 1973, GOLD; JORDAN; VAN HOUTE[38] desenvolveram um meio seletivo para *S. mutans*. O ágar mitis salivarius foi utilizado como meio base, após a descoberta de que este meio, seletivo para estreptococos bucais, é nutricionalmente adequado e não inibe o crescimento dos *S. mutans*. Os autores testaram diversas concentrações de sacarose que inibiam o crescimento de outros estreptococos de amostras de placa bacteriana. A concentração de 20% inibia os *S. sanguis* e *S. mitis*, mas não os *S. salivarius*. A descoberta, alguns anos antes, de que os *S. mutans* eram resistentes ao antibiótico bacitracina, permitiu que diversas concentrações dessa substância fossem testadas no meio de cultura. A adição de 0,2 unidades de bacitracina por mililitro de meio foi suficiente para a completa eliminação dos *S. salivarius* e *S. mitis*, mas não dos *S. sanguis.* Nem a sacarose, nem a bacitracina, quando utilizadas nessas concentrações, interferiram no crescimento dos *S. mutans*. Assim, a combinação de sacarose a 20% e 0,2 unidades de bacitracina por mililitro de ágar mitis salivarius foi efetiva na seleção de *S. mutans* e este meio passou a ser denominado então de ágar mitis salivarius bacitracina (MSB). Apenas um pequeno número de enterococos e leveduras demonstrou crescimento nesse meio. Os pesquisadores passaram gradativamente a utilizar o ágar MSB em substituição ao ágar mitis salivarius, na determinação dos níveis de *S. mutans*.

Estudos mais precisos[17, 18] das características bioquímicas e genéticas das cepas de *Streptococcus mutans*, até então consideradas como diferentes subespécies, permitiram sua divisão em 6 espécies distintas: *S. mutans, S. sobrinus, S. cricetus, S. rattus, S. ferus* e *S. macacae*. O nome *S. mutans* foi dado à espécie semelhante à descrição original de CLARKE. Dessas espécies, as mais freqüentemente isoladas em humanos são os *S. mutans* e *S. sobrinus*. A partir dessa divisão, esse grupo de 6 espécies passou a ser

chamado de estreptococos do grupo mutans, ou simplesmente estreptococos mutans. Gradativamente os pesquisadores foram incorporando a nova classificação, passando a utilizar o termo estreptococos mutans nos casos onde a identificação da espécie não era realizada. Nos trabalhos anteriores a esta modificação, o termo *S. mutans* não foi exclusivamente utilizado para designar esta espécie, podendo englobar outras, como os *S. sobrinus*. Para não alterar a nomenclatura utilizada pelos autores em seus artigos, os termos *S. mutans* e estreptococos mutans foram mantidos nessa revisão de literatura conforme consta nos originais.

Em 1986, LOESCHE[67] fez uma extensa revisão a respeito do papel dos estreptococos mutans na cárie em humanos. Dentre as 200 a 300 espécies bacterianas presentes na cavidade bucal, apenas um pequeno número, entre ele os estreptococos mutans e lactobacilos, pode causar cárie, sustentando a teoria da placa específica. O papel dos lactobacilos no desenvolvimento de cárie é mais importante na progressão da lesão do que em sua iniciação. Já os estreptococos mutans são considerados os mais cariogênicos, pois produzem ácido lático em grande quantidade a partir da sacarose, são acidúricos, mantendo o metabolismo mesmo em pHs baixos e formam polissacarídeos intra e extracelulares de reserva, além do polissacarídeo extracelular insolúvel, responsável pela adesividade da placa bacteriana. As espécies de estreptococos mutans mais associadas com a cárie em humanos são os *S. mutans* e *S. sobrinus*. Para o autor, o tratamento visando diminuir a infecção por essas bactérias é o mais apropriado para reduzir a incidência de cárie.

Em 1988, uma nova espécie foi adicionada aos estreptococos do grupo mutans, chamada de *S. downei*[108]. Isolados de placa bacteriana de macacos, os *S. downei* eram anteriormente classificados como *S. mutans* sorotipo h, mas testes bioquímicos, imunológicos e análise de DNA permitiram classificá-los como uma nova espécie.

2.1.2. Relação entre saliva, dieta, microorganismos e cárie

Antes da identificação de certos estreptococos associados à cárie na década de 60, o que norteava as pesquisas sobre o assunto eram os estudos relacionando a queda do pH com a desmineralização dos dentes. Os lactobacilos eram considerados os principais agentes etiológicos da cárie, devido à sua conhecida acidogenicidade e aciduricidade, e uma grande importância era dada à capacidade da saliva em tamponar os ácidos produzidos por essas bactérias.

Em 1953 já era conhecida a capacidade tampão da saliva, principalmente pela ação do tampão bicarbonato. Neste ano, DREIZEN et al.[25] estudaram, entre outros parâmetros, a relação entre a capacidade tampão e o fluxo salivar. Eles coletaram a saliva estimulada de 80 pacientes durante 30 minutos e determinaram o fluxo salivar e a capacidade tampão, medida pela titulação de ácido lático 0,1 N em 5 mL de saliva. Os autores encontraram uma correlação estatisticamente significante entre a capacidade tampão e o fluxo salivar e entre a capacidade tampão e o nível de sódio na saliva. Concluíram que o ânion responsável pela capacidade tampão da saliva estimulada é o bicarbonato e o sódio é o cátion envolvido nesse processo.

ERICSSON[29], 1959, estabeleceu um método simplificado para avaliação da capacidade tampão da saliva, em substituição às técnicas de titulação até então empregadas. A capacidade tampão da saliva estimulada foi medida com um eletrodo de pH, após a mistura de 1 mL de saliva com 3 mL de ácido clorídrico a 0,005 N e um borbulhamento com ar por 20 minutos para a liberação do gás carbônico. A saliva não estimulada foi avaliada da mesma forma, diferindo apenas pela adição de 1 mL de saliva a 2 mL de ácido clorídrico a 0,005 N e 1 mL de água destilada. A variação diurna da capacidade tampão foi avaliada, tendo sido encontrado um alto valor ao acordar e uma tendência de aumento durante o dia. Houve um aumento também 15 minutos após as refeições e uma diminuição após meia ou uma hora. O autor sugeriu que a determinação da capacidade tampão seja feita em horários padronizados, pelo menos uma hora após as refeições. Na avaliação do efeito de dietas de uma semana na capacidade tampão, a alimentação com proteínas e vegetais aumentou seu valor e com carboidratos diminuiu.

Em 1962, KEYES[54] estabeleceu o que mais tarde ficou conhecido como o "esquema de Keyes" ou "tríade de Keyes". O autor descreveu a natureza multifatorial da cárie, envolvendo um hospedeiro, uma dieta cariogênica e uma microbiota específica. A relação entre a dieta cariogênica e a microbiota específica e cárie foi constatada em estudos anteriores com ratos e hamsters. As diferenças entre a cárie nesses animais evidenciaram que fatores próprios do hospedeiro também estariam implicados na etiologia da cárie.

Após o entendimento da cárie como uma doença multifatorial, o diagnóstico de fatores etiológicos que pudessem determinar a atividade dessa doença, antes do aparecimento dos primeiros sinais de desmineralização, foi o alvo de inúmeras pesquisas científicas.

CROSSNER; HOLM[19], 1977, estudaram o fluxo salivar, capacidade tampão da saliva

e o índice de cárie em crianças suecas com 5 (n = 178) e 8 anos (n = 149) de idade, com o intuito de determinar se a saliva pode ser usada para prever o desenvolvimento de cárie. Saliva estimulada foi coletada durante 5 minutos e a capacidade tampão foi determinada como descrito por ERICSSON[29]. Foi encontrada uma correlação negativa estatisticamente significante entre a capacidade tampão e o índice de cárie nos dois grupos de crianças, mas a relação entre fluxo salivar e índice de cárie só apresentou correlação negativa estatisticamente significante nas crianças com 8 anos. Os autores sugeriram que a dificuldade de coleta da saliva nas crianças com 5 anos pode ter influenciado os resultados. Devido à variação encontrada, concluíram que os testes salivares não são adequados para determinar o prognóstico de desenvolvimento de cárie em uma criança, mas estão indicados no diagnóstico da atividade da doença.

Em 1977, KLOCK; KRASSE[55], avaliaram a relação entre os níveis salivares de *S. mutans* e lactobacilos, o fluxo salivar estimulado, o pH, a capacidade tampão da saliva e o índice de cárie em um grupo de 655 crianças de 9 a 12 anos. As amostras de saliva foram coletadas 2 vezes, com um intervalo de 2 semanas; se a diferença entre a contagem microbiológica na primeira e segunda determinações fosse maior que um fator de 10, uma terceira amostra era coletada. Os *S. mutans* foram avaliados no ágar mitis salivarius bacitracina (MSB) e os lactobacilos no ágar Rogosa. As placas de MSB foram contadas manualmente e as colônias com características morfológicas representativas foram isoladas e testadas por métodos bioquímicos. Os *S. mutans* foram detectados em 92,4% das crianças, sendo que 80% delas apresentavam níveis acima de 100.000 e 40% acima de 1.000.000 de unidades formadoras de colônia (UFC) por mililitro de saliva. A capacidade tampão variou entre 2,80 e 7,55 e o fluxo salivar estimulado entre 0,1 e 5,7 mL/min. Foi encontrada uma correlação positiva entre: (1) capacidade tampão e fluxo salivar; (2) níveis salivares de *S. mutans* e lesões de superfície lisa incipientes; (3) níveis salivares de *S. mutans* e todas e as lesões de cárie; e (4) níveis salivares de *S. mutans* e todas as superfícies restauradas e cariadas. Houve correlação negativa entre o fluxo salivar e os níveis salivares de *S. mutans*. A variação intra-individual, com relação às contagens bacterianas, foi baixa e em apenas 10% da amostra foi necessária uma terceira coleta da saliva. Não houve correlação entre o número de lactobacilos e as cáries incipientes de superfície lisa, sugerindo que os *S. mutans* são os maiores responsáveis pelo desenvolvimento inicial de cárie, enquanto os lactobacilos estão associados com a posterior progressão da lesão. Em continuidade a esse trabalho, KLOCK; KRASSE[56] avaliaram, em 1979, se alguns dos seguintes fatores poderia ser usado para prever a atividade de cárie: níveis salivares de *S. mutans* e lactobacilos, capacidade tampão da saliva, fluxo salivar, pH

salivar, quantidade de placa e freqüência de cárie. Eles estudaram 300 crianças de 9 e 12 anos e o incremento de cárie após 1 e 2 anos foi comparado com os fatores citados. A freqüência de cárie foi dividida em lesões de superfície lisa e lesões de fossas e fissuras. O número de novas lesões, após 1 e 2 anos, apresentou correlação significante com a freqüência de cárie, principalmente nas lesões de superfície lisa. No segundo ano, houve correlação significativa entre os níveis salivares de *S. mutans* e o incremento de cárie. Todas as correlações encontradas apresentaram um valor de r baixo, entre 0,2 e 0,4, mas devido ao tamanho da amostra elas foram estatisticamente significantes.

Os diferentes meios de diagnóstico da atividade de cárie, entre eles os testes salivares, foram revistos por ERICSSON; HARDWICK[30] em 1978. Eles relataram que o fluxo salivar e a capacidade tampão da saliva aumentam a neutralização dos ácidos formados na placa bacteriana, apresentando uma correlação negativa com a cárie. Propuseram parâmetros para classificar o fluxo salivar (normal: 1,0 a 3,0 mL/min; muito baixo: < 0,7 mL/min) e a capacidade tampão (normal: pH 5,75 a 6,50; muito baixa: pH < 4,0).

Em 1981, ABELSON; MANDEL[1] realizaram um experimento para avaliar a queda do pH da placa bacteriana em indivíduos cárie ativos e livres de cárie, relacionando-a com a ação da saliva. O pH da placa acumulada durante 3 dias foi medido *in vivo* após 5, 10, 20 e 45 minutos da aplicação de uma solução de sacarose a 10 %. Este protocolo foi realizado 3 vezes, variando-se o acesso à saliva: (a) placa bacteriana isolada do contato com a saliva; (b) placa bacteriana com acesso livre à saliva; (c) placa bacteriana com acesso livre à saliva estimulada por uma goma de mascar contendo sacarose. A maior queda do pH ocorreu quando a placa bacteriana foi isolada do contato com a saliva e a menor durante a estimulação salivar, nos dois grupos. Não houve diferença na queda do pH entre os dois grupos quando não foi permitido o acesso da saliva à placa bacteriana, mas os indivíduos livres de cárie apresentaram menor queda do pH nos protocolos "b" e "c", evidenciando o papel da saliva na diferença entre os dois grupos.

Em 1983, HEINTZE; BIRKHED; BJÖRN[44] estudaram em 629 adultos a relação entre fluxo salivar e capacidade tampão da saliva de acordo com o sexo e a idade dos indivíduos. O fluxo salivar estimulado foi menor para as mulheres (média de 1,40 mL/min) do que para os homens (média de 1,80 mL/min). O mesmo aconteceu com a capacidade tampão (homens = 4,55; mulheres = 4,05), sendo que 80% dos valores obtidos estavam abaixo do pH 4,0, considerado por ERICSSON; HARDWICK[30] como muito baixo. Provavelmente o menor tamanho das glândulas salivares nas mulheres seja responsável por este resultado. Independentemente do sexo, uma correlação estatisticamente significante foi encontrada

entre o fluxo salivar e a capacidade tampão da saliva estimulada (r = 0,43 para homens e r = 0,40 para mulheres).

A determinação do número de estreptococos mutans na saliva de 42 crianças com 6 anos e sua relação com os índices ceod, ceos, CPOD, CPOS e índice de higiene bucal foi realizada por CANTISANO et al.[14], 1983. Os autores estimularam a saliva das crianças através de um pedaço de borracha de 1 cm de comprimento; após as diluições, a saliva foi semeada em ágar MSB. A identificação das colônias foi feita através da análise dos tipos coloniais, esfregaço e coloração de Gram e provas de identificação. Um método colorimétrico para a detecção de estreptococos mutans na saliva, utilizando o caldo sacarose bacitracina, também foi empregado nas determinações, sendo capaz de identificar os indivíduos com altas contagens. A média de estreptococos mutans (entre eles *S. mutans* e *S. sobrinus*, segundo os sorotipos relatados) na saliva das crianças foi de 3.800.000 por mililitro. Houve correlação estatisticamente significante entre o número de estreptococos mutans na saliva e todos os índices avaliados. Não foi encontrada associação estatisticamente significante entre os níveis salivares de estreptococos mutans e o número de novas lesões nos primeiros molares permanentes após 6 meses (recém-irrompidos). Entretanto, após 1 ano, nenhuma criança do grupo com as menores contagens apresentaram cárie nos primeiros molares e todas as crianças no grupo com as maiores contagens apresentaram cárie nesses dentes.

HONKALA et al.[50] estudaram em 1984 a relação entre capacidade tampão da saliva, níveis salivares de lactobacilos e índice de cárie em aproximadamente 100 crianças de 13 anos, na Finlândia. Os níveis salivares de estreptococos mutans não foram determinados pela ausência na época de um teste comercial para este fim. Houve uma correlação negativa entre a capacidade tampão e o número de dentes cariados, mas não estatisticamente significante. A contagem salivar de lactobacilos apresentou uma correlação estatisticamente significante fraca com o número de dentes cariados. O índice de cárie um ano antes, determinado no prontuário das crianças, apresentou a correlação mais forte com a prevalência de cárie na época da pesquisa. O consumo de açúcar e a freqüência de escovação, avaliados através de um questionário enviado pelo correio, apresentaram uma correlação muito fraca e não estatisticamente significante, com a prevalência de cárie na época e o CPOD um ano antes.

A relação entre os níveis salivares de *S. mutans*, avaliados através de um teste comercial, e a freqüência de cárie, ingestão de sacarose e fluxo salivar estimulado foi observada em 841 crianças de 13 anos por SEPPÄ; PÖLLÄNEN; HAUSEN[86], 1988. Os

índices CPOS e de superfícies cariadas (CS) aumentaram significantemente com o aumento na contagem de *S. mutans*. A correlação entre a ingestão de sacarose e a contagem de *S. mutans* foi fraca, mas as crianças com maior contagem apresentavam em média um maior consumo de açúcar. O fluxo salivar foi significantemente menor quanto maior a contagem de *S. mutans* encontrada nas crianças, com um coeficiente de correlação de Kendall de 0,11, estatisticamente significante.

Também em 1988, CURY; GIL[20] avaliaram o fluxo salivar e a capacidade tampão de 93 adultos. Trinta e um porcento dos voluntários apresentaram fluxo salivar abaixo de 1,0 mL/min e 40% apresentaram capacidade tampão abaixo de 4,5, considerados como valores baixos pelos autores. A correlação entre fluxo salivar e capacidade tampão foi de 0,54.

Em 1989, WILSON; ASHLEY[110] estudaram a possibilidade de utilização de parâmetros como capacidade tampão da saliva, níveis salivares de *S. mutans* e *Lactobacillus*, índice de cárie e consumo de açúcar, na previsão do incremento de cárie em 101 crianças de 11 e 12 anos em Londres. Após a coleta da saliva, foi realizado um exame clínico para determinar o índice de cárie e as crianças foram questionadas sobre a dieta no dia anterior. O exame clínico foi repetido anualmente durante 3 anos. Todos os fatores avaliados apresentaram uma relação estatisticamente significante com a ocorrência de cárie em dois anos; a experiência de cárie apresentou as associações mais fortes. Com três anos o mesmo padrão foi observado, mas a dieta, determinada através do questionário, não apresentou correlação estatística com a ocorrência de cárie. Os valores de r do coeficiente de correlação de Spearman foram negativos na avaliação entre capacidade tampão e incremento de cárie. Dividindo as crianças em alto e baixo risco de cárie com base nos índices observados com 2 e 3 anos, pôde-se observar uma diferença estatisticamente significante entre os dois grupos, com relação à capacidade tampão, níveis salivares de *Lactobacillus* e experiência de cárie. A diferença entre os dois grupos com relação aos níveis salivares de *S. mutans* só foi estatisticamente significante com 3 anos. A experiência de cárie apresentou o maior valor preditivo (70%); a combinação entre contagem de *S. mutans* e capacidade tampão apresentou um valor preditivo de 75%. A capacidade tampão apresentou uma alta sensibilidade (90%), mas uma baixa especificidade, com aproximadamente metade das crianças de baixo risco à cárie sendo classificadas como de alto. A repetição dos testes salivares após um ano demonstrou correlação estatisticamente significante com os valores iniciais.

Uma comparação entre o índice de cárie e os níveis salivares de estreptococos mutans e lactobacilos de 718 pacientes foi realizada por KLOCK; SVANBERG;

PETERSSON[57] em 1990. A saliva estimulada foi coletada duas vezes, com um intervalo de 2 semanas. Três por cento dos pacientes apresentaram fluxo salivar $\leq$ 0,5 mL/min. Os estreptococos mutans não foram detectados em 2% deles, mas 50% apresentavam contagens iguais ou superiores a 1.000.000 UFC/mL de saliva. A correlação entre as duas contagens de estreptococos mutans foi alta (r = 0,7). Os pacientes foram divididos em 4 grupos de acordo com a idade; o índice CPOS teve correlação significante, porém fraca, com os níveis salivares de estreptococos mutans dentro de todos os grupos. Entretanto, foram encontrados pacientes com índice CPOS baixo e alta contagem salivar de estreptococos mutans e lactobacilos.

SHIP; FOX; BAUM[87] estudaram em 1991 o valor mínimo do fluxo salivar que pode ser considerado normal. Amostras de saliva não estimulada e estimulada das glândulas parótida e submandibular foram coletadas de 102 pacientes. Eles responderam a um questionário contendo 4 questões específicas com relação à xerostomia. Além disso, a atividade de cárie (CPOD, número total de dentes, número de dentes cariados e número de dentes restaurados), as condições periodontais (placa, sangramento gengival, cálculo, recessão e bolsa periodontal) e da mucosa bucal foram determinadas. Cruzando os dados, os autores não puderam determinar o fluxo salivar mínimo para evitar que alterações bucais fossem clinicamente significantes. Para eles, é mais importante determinar o que é normal para cada indivíduo e avaliar o fluxo salivar longitudinalmente.

BRETZ et al.[11], 1992, estudaram a relação entre o número de estreptococos mutans e lactobacilos na saliva, fluxo salivar e número de superfícies dentais cariadas em 37 crianças de 3 a 6 anos da favela do Vidigal, no Rio de Janeiro. Trinta e uma, das 37 crianças, apresentavam pelo menos uma superfície cariada nos dentes decíduos. Os níveis salivares de estreptococos mutans e lactobacilos foram determinados através de testes comerciais. O índice de cárie foi estimado com base na porcentagem de superfícies cariadas entre as superfícies de risco de cada criança. Os níveis salivares de estreptococos mutans e lactobacilos apresentaram uma associação significante com a taxa de superfícies cariadas. Não foi encontrada correlação entre o fluxo salivar e cárie, embora o valor de r tenha sido negativo, indicando uma tendência de diminuição nas cáries com o aumento do fluxo.

Em 1992, MACPHERSON et al.[71] investigaram as diferenças no potencial cariogênico de cepas de *S. mutans* isoladas da placa bacteriana de 6 diferentes indivíduos. O potencial cariogênico das cepas, a contagem de bactérias na saliva, o fluxo salivar estimulado e a capacidade tampão foram comparadas com o índice CPOS e a

desmineralização *in situ* de cada indivíduo. Blocos de esmalte bovino foram imersos *in vitro* por 48 horas em uma solução de sacarose a 5% contendo *S. mutans* obtidos dos diferentes voluntários, sendo a solução trocada após 24 horas. Foram determinados o pH, os ânions ácidos e a concentração de cálcio na solução. Após 48 horas, os blocos de esmalte bovino foram seccionados e microrradiografados. A contagem de *S. mutans* e lactobacilos na saliva dos voluntários foi realizada em três diferentes ocasiões, bem como a determinação do fluxo salivar e da capacidade tampão. Após o teste *in vitro* e avaliação do CPOS, os voluntários iniciaram o uso de um dispositivo intrabucal para testar a desmineralização de fatias de esmalte *in situ* durante 3 semanas, também através da microrradiografia. Tanto o CPOS quanto a desmineralização *in situ* apresentaram uma correlação estatisticamente significante com a produção de ácidos, o pH mínimo e a concentração de cálcio na solução *in vitro*, evidenciando as diferenças no potencial cariogênico das diferentes cepas de *S. mutans*. Com relação à avaliação salivar, o CPOS dos voluntários não mostrou correlação estatisticamente significante com a contagem de *S. mutans*, lactobacilos, fluxo salivar estimulado e capacidade tampão da saliva, mas a correlação foi negativa na análise entre CPOS e fluxo salivar. A relação entre os fatores salivares e a desmineralização *in situ* não foi apresentada.

LARMAS[65], 1992, fez uma revisão a respeito dos testes salivares, entre eles contagem de estreptococos mutans, capacidade tampão e fluxo salivar, no diagnóstico de cárie. Os níveis de estreptococos mutans na saliva são indicativos de infecção por estes microorganismos, mas a cárie não é uma doença de infecção específica; existem pessoas com mutans na cavidade bucal sem sinais de cárie e esta pode ocorrer em pacientes sem infecção pelo mutans. Dessa forma, o valor diagnóstico do teste salivar é apenas relativo, servindo para revelar um dos fatores de risco. A capacidade tampão é um dos melhores indicadores da susceptibilidade à cárie, pois revela a resposta do hospedeiro. Já o fluxo salivar, por variar muito entre indivíduos, deve ser analisado com cuidado na determinação do que é normal ou anormal. O fluxo salivar não estimulado varia em média entre 0,3 e 0,4 mL/min e o fluxo estimulado, entre 1,0 e 2,0 mL/min.

TUKIA-KULMALA; TENOVUO[99] estudaram, em 1993, a variação intra e interindividual entre fluxo salivar, capacidade tampão da saliva e níveis salivares de estreptococos mutans e lactobacilos, em 128 crianças de 11 e 12 anos durante 9 meses. Os resultados encontrados foram divididos em escores, em valores baixos, intermediários e altos. O número de estreptococos mutans teve correlação negativa com o fluxo salivar ($r = -0,26$); houve correlação positiva entre o fluxo salivar e a capacidade tampão ($r = 0,51$ para meninos e 0,60 para meninas). Uma baixa capacidade tampão não foi encontrada entre os

indivíduos com alto fluxo salivar, mas 10 indivíduos apresentaram uma alta capacidade tampão e um baixo fluxo salivar. A variação intraindividual no fluxo salivar foi maior para as meninas: 27% delas mantiveram o mesmo escore, contra 37% dos meninos. Com relação à capacidade tampão da saliva, 59% dos meninos e 42% das meninas mantiveram o mesmo escore. A variação nos níveis salivares de estreptococos mutans foi alta, sendo que 49% das avaliações realizadas com testes comerciais apresentaram os mesmos escores, contra 19%, quando a saliva era semeada em placas contendo ágar mitis salivarius bacitracina. A variação nos níveis de lactobacilos foi ainda maior. Os níveis salivares iniciais das bactérias tiveram correlação positiva com a experiência passada de cárie (avaliada através do CPOS) e com o incremento de cárie em um ano. O fluxo salivar e a capacidade tampão apresentaram relação inversa com esses índices.

Em 1994, EDGAR; HIGHAM; MANNING[27] escreveram a respeito da estimulação salivar na prevenção das cáries. A utilização de gomas de mascar diminui a queda do pH da placa e potencializa a remineralização, pois com o aumento do fluxo salivar, aumenta-se a capacidade de lavagem da saliva, a capacidade tampão e o grau de saturação com relação ao cálcio e fosfato. Embora a importância da saliva na homeostasia da cavidade bucal seja conhecida, os autores colocam que a relação entre fluxo salivar e experiência de cárie individual é inconclusiva.

Também em 1994, os fatores protetores da saliva contra a cárie foram descritos por LAGERLÖF; OLIVEBY[64]. Os autores focalizaram essa revisão em dois fatores principais: fluxo salivar e concentração de flúor na saliva. Ressaltaram que a cárie é uma doença multifatorial, fruto de uma complexa interação entre placa bacteriana, saliva e dieta nos processos de des e remineralização. O fluxo salivar é responsável pela diluição e eliminação do açúcar da cavidade bucal; quanto maior o fluxo salivar, mais rápida é a lavagem. Indivíduos com fluxo salivar diminuído, por doenças ou medicamentos, apresentam um alto índice de cárie, ao contrário daqueles com fluxo salivar normal; nos últimos, no entanto, a correlação entre fluxo salivar e cárie é fraca. Após tecer considerações sobre a concentração de cálcio e fósforo na saliva, os autores descreveram o sistema tampão salivar, que na saliva estimulada é representado pelo sistema ácido carbônico/bicarbonato. Segundo eles, alguns autores descreveram uma correlação negativa entre capacidade tampão e diferentes aspectos da cárie, mas o uso desse teste, como preditivo da ocorrência da doença, não fornece resultados precisos.

HALL et al.[40], 1997, avaliaram o papel da saliva na alteração no pH da placa, em resposta a estímulos com sacarose e sorbitol. Seis voluntários utilizaram um dispositivo

intrabucal inferior removível, contendo blocos de esmalte humano durante 3 semanas, para permitir o acúmulo de placa bacteriana. Após este período, o dispositivo foi removido da boca e o pH da placa foi medido durante 20 minutos após exposição a: 100 µL de solução de sacarose a 10%; 100 µL de solução de sacarose a 10%, sendo que após 10 minutos a placa passou a ser banhada por saliva estimulada; mesma solução anterior, sendo a placa posteriormente banhada por água deionizada; 100 µL de solução de sorbitol extraída de goma de mascar, sendo a placa bacteriana posteriormente banhada por saliva. Cada teste foi feito com um intervalo de 24 horas. Após o início do banho com saliva, o pH da placa subiu, o que não ocorreu após o banho com água deionizada. Isso demonstrou que a ação da saliva não é apenas de lavagem, mas sua capacidade tampão é importante para evitar a queda do pH. Nas placas expostas ao sorbitol, o pH não caiu abaixo de 6.

Em 1997, TENOVUO[96] apresentou uma revisão de literatura a respeito dos fatores salivares que podem ser utilizados para avaliar a atividade de cárie em indivíduos e populações. Embora não exista associação linear entre o fluxo salivar e a atividade de cárie, além dos valores de normalidade variarem entre indivíduos, o monitoramento do fluxo salivar de um paciente pode auxiliar na avaliação da susceptibilidade à cárie. Para o autor, o fluxo salivar estimulado normal é em média de 2,0 mL/min, variando de 1,0 a 3,0 mL/min. Valores entre 0,7 e 1,0 mL/min são considerados baixos e abaixo de 0,7 mL/min, anormais. Ao nível populacional também há uma associação negativa entre capacidade tampão e cárie, o que não se comprova com o mesmo efeito a nível individual. O autor concluiu que, embora exista evidência de que vários parâmetros salivares não-microbiológicos afetem o processo de cárie, ao nível individual ou populacional, eles oferecem apenas um pequeno valor diagnóstico ou preditivo.

DOWD[24] escreveu em 1999 que a lavagem da superfície dentária e das bactérias, a capacidade tampão da saliva e o controle da desmineralização e remineralização por meio de sua saturação com os minerais do esmalte, além de suas funções bacterianas, tornam a saliva um fluido essencial no controle da cárie.

SREEBNY[89] também teceu considerações a respeito da saliva em 2000. Para ele, esse fluido é totalmente ignorado pelos fisiologistas e considerada como menos importante pelos dentistas. Entretanto, seu papel na homeostasia da cavidade bucal é imprescindível. Segundo o autor, embora a velocidade do fluxo salivar normal ainda não tenha sido totalmente definida, pode-se considerar que o fluxo salivar estimulado varia 1,0 e 2,0 mL/min e valores abaixo de 0,5 mL/min devem ser considerados anormais.

2.1.3. Microbiologia da placa bacteriana associada à cárie

A microbiologia da placa bacteriana associada à cárie foi estudada extensivamente nas últimas décadas. Em algumas pesquisas, a microbiota da placa, focalizando principalmente os microorganismos considerados cariogênicos, foi relacionada a fatores como dieta e atividade de cárie. Outras procuraram investigar a relação entre a contagem de bactérias cariogênicas na saliva e na placa. Além disso, alguns pesquisadores se aprofundaram no estudo de propriedades da placa, além da contagem de microorganismos, que a tornam mais cariogênica.

Com o propósito de avaliar o efeito dos níveis de sacarose da dieta na composição microbiológica da placa bacteriana com 4 e 12 dias, STAAT et al.[90], em 1975, submeteram 8 voluntários a dois períodos sem higiene bucal, variando o consumo de sacarose na dieta: alta ou baixa quantidade. O número de bactérias totais, nas amostras de placa, foi determinado após semeadura em ágar sangue, de estreptococos totais no ágar mitis salivarius e de lactobacilos no ágar Rogosa. Os estreptococos foram identificados de acordo com a morfologia colonial e a capacidade de fermentar manitol e sorbitol entre *S. mutans*, *S. sanguis* e *S. salivarius*. A quantidade de placa formada não foi afetada pela quantidade de sacarose ingerida, mas a placa obtida após a dieta rica em sacarose continha, significantemente, mais microorganismos. A placa de 12 dias apresentou menor densidade bacteriana em relação à placa de 4 dias, em ambas as dietas. Houve uma grande flutuação, em cada indivíduo, na porcentagem de *S. sanguis* e *S. mutans* em relação ao total de estreptococos, durante o período do estudo. Na placa de 4 dias, a porcentagem de *S. mutans*, em relação ao total de estreptococos, foi estatisticamente diferente nas duas dietas, com média de 2,1% e 0,7% nas dietas com alta e baixa quantidade de sacarose, respectivamente; com 12 dias, a porcentagem de *S. mutans* foi em média de 1,6% e 0,5% respectivamente, nas dietas com alta e baixa quantidade de sacarose, sem diferença estatística entre elas. Quando os *S. mutans* se apresentavam em níveis detectáveis na placa bacteriana, a porcentagem de *S. sanguis* era reduzida. Os lactobacilos tiveram um aumento significante na placa de 4 dias no período de dieta rica em sacarose e a placa de 12 dias apresentou a mesma tendência. Os resultados sugerem que o efeito da sacarose da dieta na composição microbiológica ocorre em função da idade da placa, sendo que o aumento do número de microorganismos associados à cárie ocorre principalmente nos períodos iniciais de maturação. Além disso, a composição microbiológica da placa de 4 dias variou mais entre os voluntários, sendo que, aos 12 dias, as diferenças entre eles não foram tão evidentes.

Em 1978, DUCHIN; VAN HOUTE[26] coletaram amostras de placa presente sobre manchas brancas, lesões já cavitadas e a estrutura dentária sadia adjacente às lesões incipientes e avaliaram o número de *S. mutans* e lactobacilos. As placas sobre lesões de cárie apresentaram maior proporção de *S. mutans*, em relação às bactérias totais, do que aquelas sobre superfícies hígidas. Em um grupo de pacientes, os *S. mutans* foram isolados de 92 das 95 amostras de placa obtidas de áreas cariadas, mas não foram detectados em 15 das 97 amostras de placa obtidas de superfícies hígidas. Houve uma grande variação na proporção de *S. mutans* em amostras obtidas da mesma lesão, mostrando a natureza localizada da colonização da placa por essas bactérias. Os lactobacilos não foram detectados em lesões de cárie incipiente, aparecendo apenas, em baixo número, em algumas amostras de placa de áreas sadias, o que sugere que eles tenham um papel mínimo na iniciação da cárie em superfícies lisas. Segundo os autores, os *S. mutans* normalmente constituem menos de 1% da microbiota total da placa bacteriana associada à cárie. Isso sugere que outras bactérias possam estar envolvidas no seu desenvolvimento, mas não se pode concluir que proporções baixas desses microorganismos sejam insuficientes para causar cárie. Um outro objetivo deste trabalho foi testar o ágar MSB, com ou sem a adição de telurito de potássio, em comparação com o ágar mitis salivarius sem telurito, na seleção e identificação dos *S. mutans*, em resposta às críticas que este meio de cultura vinha recebendo por parte de outros pesquisadores. A adição de telurito de potássio ao ágar MSB não afetou o isolamento dos *S. mutans* da placa em comparação ao mesmo meio sem telurito e facilitou o procedimento de contagem das colônias, pois inibiu o crescimento de outros microorganismos.

VAN HOUTE[100] descreveu, em 1980, uma relação direta entre dieta e composição bacteriológica da placa: uma maior ingestão de carboidratos leva a um aumento da acidez e da síntese de polissacarídeos extracelulares, selecionando bactérias acidogênicas e acidúricas, que aumentam o potencial de queda do pH, favorecendo a desmineralização. Além da dieta, fatores salivares também estão envolvidos na atividade de cárie, embora o papel das diferenças individuais nesses fatores ainda necessite ser esclarecido. Para ele, os estreptococos pertencentes ao grupo mutans podem ser considerados como agentes etiológicos importantes, em vista de sua acidogenicidade e aciduricidade, sua capacidade de causar cárie em modelos animais, sua correlação positiva com o desenvolvimento de cárie em humanos e sua presença em praticamente todas, senão todas as superfícies com cárie ativa, não havendo evidências do envolvimento de outros microorganismos, como *S. mitis*, *S. sanguis* ou *S. salivarius*, na iniciação do processo de cárie.

Em 1984, HARPER; LOESCHE[42] compararam a acidogenicidade, capacidade de

crescimento e taxa de produção de ácido lático de 30 cepas bacterianas, em diferentes pHs. Todas as cepas de *S. mutans* e os *Lactobacillus casei* testados apresentaram crescimento em caldos com pH 7,0, 5,5 e 5,0, sendo esse crescimento maior no caldo com pH 7,0. O crescimento de cepas de *S. sanguis*, *S. salivarius* e *S. mitis* no pH 5,5 foi consideravelmente menor do que a da maioria das cepas de *S. mutans* e foi completamente inibida no pH 5,0. Nos caldos com pH inicial 7,0, o pH final ficou abaixo de 5,0 em todas as cepas estudadas, mas os *S. mutans* demonstraram em média um pH final 0,2 unidades mais baixo do que a média dos outros estreptococos. Nos caldos com pH 5,5 e 5,0, novamente os *S. mutans* apresentaram uma maior capacidade de baixar o pH. Os *Lactobacillus casei* apresentaram um pH final baixo, principalmente nos caldos com pH inicial 5,5 e 5,0. Com relação à produção de ácido lático, os *S. mutans* cepa Ingbritt produziram mais ácido lático no pH 5,0 do que nos pHs 6,5, 4,5 e 4,0. Duas cepas de *S. sanguis* produziram mais ácido lático no pH 6,5 do que os *S. mutans* cepa Ingbritt, sendo essa produção diminuída progressivamente nos pHs mais baixos.

TOGELIUS et al.[98], em 1984, avaliaram as diferenças na contagem de *S. mutans* de amostras de saliva coletadas com poucas horas ou com um dia de diferença. Investigaram também se uma alteração no padrão de higiene bucal aumentaria a contagem de *S. mutans* na saliva, bem como a relação entre o nível salivar dessas bactérias e sua contagem na língua, áreas oclusais e interproximais. A saliva estimulada de aproximadamente 70 voluntários foi coletada às 8:30h, 15:30h e 8:30h do dia seguinte e semeada em ágar mitis salivarius bacitracina. Os voluntários foram divididos em três classes de acordo com a quantidade de *S. mutans*. Em quase 90% dos voluntários as contagens realizadas pela manhã e à tarde diferiram por um fator menor que 10 e as contagens em dias consecutivos diferiram em um fator maior que 10, em apenas 6% dos voluntários. Dos 24 voluntários que ficaram uma semana sem escovar os dentes, 15 apresentaram aumento na contagem e 9, uma diminuição, mas as alterações não foram estatisticamente significantes. A contagem de *S. mutans* na saliva, realizada pela técnica da espátula, apresentou uma correlação positiva com a contagem da superfície da língua e de placa interproximal.

O efeito de uma dieta rica em sacarose, na composição microbiológica e acidogenicidade da placa bacteriana, foi testado por SCHEIE et al.[85] em 1984. Quatro voluntários foram instruídos a não higienizar as superfícies vestibulares dos dentes posteriores inferiores direitos. Durante 3 semanas eles ingeriram uma dieta com baixa quantidade de sacarose (dieta 1) e em 3 semanas subseqüentes, uma dieta com alta quantidade de sacarose (dieta 2), que incluía a aplicação de 1 mililitro de uma solução desse açúcar a 60%, na área estudada, 8 vezes ao dia. A contagem de *S. mutans* na saliva

e a análise microbiológica da placa foram realizadas semanalmente, sendo sua acidogenicidade determinada ao final das 3 semanas. Os níveis salivares de *S. mutans* não foram afetados sistematicamente por nenhuma das dietas. Da mesma maneira, o número de superfícies dentárias infectadas com esta bactéria não foi diferente nas duas dietas, mas a freqüência de detecção em cada superfície foi maior durante a dieta 2. Ela também provocou uma maior queda do pH nos voluntários A, B e C. O voluntário D apresentou os valores mais baixos de pH, embora não tenham sido detectados *S. mutans* em suas amostras de placa. Apesar da dieta ter afetado a acidogenicidade da placa, seus efeitos sobre os parâmetros microbiológicos não foram tão uniformes. Houve uma tendência das placas contendo mais de 0,1% de *S. mutans* demonstrarem maior queda do pH. Dois voluntários (A e C) apresentaram mancha branca após a dieta 2, mas a placa no local onde ocorreram não demonstrou características peculiares quanto à microbiota e à acidogenicidade da placa. Níveis salivares altos de *S. mutans* foram mais freqüentes nos voluntários A e B, que também apresentaram o maior número de sítios dentários infectados. Entretanto, o voluntário D possuía níveis salivares de *S. mutans* mais altos que o voluntário C (5.000 e 500 UFC/mL, respectivamente), mas não demonstrou crescimento dessa bactéria em suas amostras de placa.

Os métodos de avaliação da quantidade de *S. mutans* na saliva e na placa bacteriana, com o intuito de revelar o grau de infecção dos indivíduos, foram revisados por KEENE[52] em 1986. Dentre os pontos abordados pelo autor, está a variável composição microbiana da placa de acordo com sua espessura, que pode levar a erros de contagem se as amostras não forem coletadas de maneira similar. Além disso, existe diferença de até 100 vezes na concentração de *S. mutans* na mesma área, o que demonstra a variação microbiana na placa e como a metodologia da coleta pode ser crítica. O autor também mostra que os níveis de *S. mutans* na saliva refletem adequadamente a quantidade desses microorganismos na placa bacteriana total presente na cavidade bucal de um indivíduo.

ZERO; VAN HOUTE; RUSSO[113], em 1986, avaliaram o papel do polissacarídeo intracelular de reserva produzido pelos microorganismos cariogênicos na desmineralização do esmalte *in situ.* Cepas de *S. mutans* (Ingbritt-1600), *S. sanguis*, *S. mitis*, *S. salivarius* e *A. viscosus* foram cultivadas por 18 horas em caldos com duas concentrações diferentes de glicose: 0,25% e 2,2%. Massas bacterianas dessas culturas foram obtidas por centrifugação e colocadas sobre blocos de esmalte bovino, montados em um dispositivo intrabucal palatino utilizado por 3 voluntários. O dispositivo intrabucal foi utilizado por 45 minutos, sendo realizado um bochecho com solução de sacarose ou glicose a 10%, no primeiro minuto de uso. As placas de *S. mutans* que tinham sido cultivadas com glicose a 2,2%

exibiram a maior desmineralização do esmalte e queda do pH, independentemente da realização do bochecho ou não. Isso comprova que a produção de ácidos pelas bactérias da placa, a partir de fontes endógenas de açúcar, pode ser importante na etiologia da cárie. O mesmo efeito foi observado com os *S. sanguis* e *S. mitis*, mas em menor grau. Os *S. salivarius* não causaram desmineralização independente da concentração de glicose no caldo de cultivo ou da realização ou não do bochecho.

Em continuidade ao trabalho anterior, os pesquisadores avaliaram o papel da matriz extracelular na desmineralização do esmalte[114]. *S. mutans*, cepa Ingbritt-1600, foram cultivados em um caldo contendo até 4% de sacarose (glicose tinha sido utilizada no trabalho anterior), por 18 horas. A produção de ácidos das massas bacterianas, obtidas por centrifugação desses cultivos, foi avaliada *in vitro* e a desmineralização do esmalte foi determinada *in situ*, como descrito no artigo anterior. Placas artificiais também foram preparadas e testadas *in situ* e *in vitro*, a partir de cepas de *S. mitis*, *S. sanguis* e *S. salivarius*, cultivadas sem sacarose, com 2% de sacarose, ou misturadas com matriz extracelular produzida por *S. mutans*. Análise de DNA revelou que as placas obtidas de culturas de *S. mutans*, realizadas com 2% de sacarose, apresentavam uma densidade celular 20 vezes menor do que as amostras de culturas sem sacarose, indicando que a matriz extracelular compreendia aproximadamente 95% dessa placa. Além disso, no teste *in situ*, essa placa causou desmineralização marcante, sendo que a placa cultivada sem sacarose não causou desmineralização. Com o aumento da concentração de sacarose no meio de cultivo, houve diminuição na produção de ácidos *in vitro*, mas um aumento na proporção de matriz extracelular e na desmineralização do esmalte *in situ*. Ao contrário do encontrado no trabalho anterior, quando a placa cultivada com 2% de sacarose não foi exposta a nenhum carboidrato, não houve queda do pH *in vitro*, nem desmineralização *in situ*. A explicação dada pelos autores para este achado foi que a quantidade de matriz extracelular, produzida a partir da sacarose, criou um espaço entre as células, que produziram ácido a partir do açúcar intracelular em quantidade insuficiente à ocorrência de desmineralização, ou que a cepa utilizada não produz reserva intracelular a partir da sacarose. Os *S. sanguis* e *S. salivarius* produziram matriz extracelular, mas os *S. mitis* não. A presença de matriz extracelular produzida por eles ou obtida de *S. mutans*, também aumentou seu potencial de desmineralização, mas de maneira menos pronunciada. Os resultados do estudo mostraram que, apesar das placas bacterianas obtidas de culturas de *S. mutans* suplementadas com sacarose apresentarem menor quantidade de células e menor capacidade de diminuir o pH *in vitro*, elas levam a uma maior desmineralização do esmalte *in situ*, devido provavelmente à presença da matriz extracelular, constituída em sua

maior parte de glucanos. Estes atuariam como barreiras de difusão, limitando a saída dos ácidos e o acesso dos tampões salivares a camadas profundas da placa.

Seguindo a mesma linha do trabalho anterior, VAN HOUTE, RUSSO, PROSTAK[103] avaliaram, em 1989, a diferença na queda do pH *in situ*, *in vitro* e a capacidade tampão de massas bacterianas formadas por *S. mutans* cepa Ingbritt-1600, cultivados na presença ou ausência de sacarose. A queda do pH *in situ* foi determinada durante 45 minutos, após bochecho com solução de glicose a 10%. Além disso, os autores mediram a porosidade dessas placas artificiais. A observação, no microscópio eletrônico de transmissão, mostrou que as placas obtidas de *S. mutans*, cultivados em caldo com 2% de sacarose, apresentavam células espaçadas e alta quantidade de matriz extracelular, ao contrário das placas obtidas de células cultivadas sem adição de sacarose, nas quais a concentração celular e a sua proximidade foi muito maior. Placas com maior conteúdo de matriz extracelular e menor quantidade de células levaram a um pH mínimo mais baixo e uma queda do pH mais prolongada no teste *in situ*, pelo metabolismo da glicose na solução de bochecho e não das fontes endógenas de carboidratos ou da matriz extracelular. Além disso, as placas bacterianas obtidas de culturas sem adição de sacarose tiveram uma capacidade tampão maior do que aquelas cultivadas com 2% de sacarose, devido à maior densidade celular e à baixa capacidade tampão da matriz extracelular. A porosidade das placas contendo alta quantidade de matriz extracelular foi maior do que a das placas sem matriz extracelular. Os autores sugeriram que, nas placas com baixa quantidade de matriz extracelular, apenas as bactérias da periferia da placa metabolizam a glicose do bochecho; já na placa rica em matriz extracelular, a glicose é utilizada também pelas bactérias da camada mais interna, visto que o substrato penetra com maior facilidade e há menor quantidade de bactérias para metabolizá-lo.

Em 1989, BOYAR et al.[10] analisaram a composição bacteriológica da placa formada *in vivo*, em pré-molares com indicação de extração, por períodos de 1, 2, 4, 8 ou 14 dias. Onze adolescentes participaram da pesquisa. Os pré-molares foram bandados, deixando um espaço de 0,8 mm entre a banda e a superfície vestibular para promover o acúmulo de placa bacteriana. Após a extração dos dentes, a banda foi delicadamente recortada e a placa bacteriana foi coletada e analisada quanto ao número de bactérias totais e de alguns gêneros bacterianos, além dos estreptococos mutans. Houve uma grande variação entre os pacientes, com relação ao número de bactérias totais e estreptococos mutans nas amostras de placa, em todos os períodos. Houve uma tendência de diminuição do número de bactérias na placa, com o passar dos dias. Todas as amostras de placas apresentaram *S. mutans* com 14 dias. Um voluntário apresentou, mesmo com um dia de acúmulo, uma

porcentagem de *S. mutans* da ordem de 24% das bactérias totais. Oitenta e cinco porcento das cepas isoladas eram *S. mutans* e 15% eram *S. sobrinus*. A avaliação dos dentes em microscopia eletrônica de varredura e microscopia de luz polarizada revelou a ocorrência de dissolução mesmo em algumas áreas onde os estreptococos mutans não foram detectados. Assim, não foi detectada uma associação estatisticamente significante entre o número de estreptococos mutans e a dissolução do esmalte; no entanto, sua freqüência de isolamento foi estatisticamente associada com a ocorrência de alteração no esmalte. Como a presença de estreptococos mutans na saliva não foi avaliada, não se pôde prever se a colonização dos dentes teve relação com seus níveis salivares. Para os pesquisadores, apesar do acúmulo de placa bacteriana através da bandagem não representar uma situação natural, a formação de placa nesse local pode ser associada com à da área interproximal.

Também em 1989, TANZER[94] escreveu sobre os mecanismos envolvidos na formação da placa bacteriana cariogênica, entre eles as características fenotípicas dos estreptococos mutans relacionadas à sua virulência e a relação entre microbiota, saliva, dieta e dente. A saliva tem um importante papel na des e remineralização dos dentes, limpeza de restos alimentares e bactérias e na diluição e neutralização dos produtos metabólicos da placa. A ocorrência de cárie severa, em pacientes com função salivar diminuída, representa bem a importância desse fluido na química da placa bacteriana cariogênica. Dentre os fatores que tornam os estreptococos mutans as bactérias mais cariogênicas estão: a. capacidade de sintetizar polissacarídeos a partir da sacarose; b. adesão à estrutura dentária, extremamente facilitada na presença de sacarose, devido à produção do polissacarídeo extracelular insolúvel; c. acidogenicidade a partir de uma variedade de açúcares simples; d. produção de ácido lático; e. aciduricidade; f. transporte de sacarose e outros açúcares simples por processos energéticos; g. formação e degradação de polissacarídeos intracelulares de reserva; h. adsorção a dentes cobertos pela película adquirida e a outras bactérias. A maioria desses fatores de virulência fornecem aos estreptococos mutans uma vantagem ecológica nas superfícies dentárias e uma aparente vantagem competitiva sobre as outras bactérias que colonizam os dentes.

A correlação entre o número de estreptococos mutans e lactobacilos na saliva e na placa bacteriana foi investigada por MUNDORFF et al.[78] em 1990. A saliva estimulada e as amostras de placa, coletadas de pelo menos cinco sítios diferentes das faces vestibulares e proximais dos molares e pré-molares inferiores, foram obtidas de 120 jovens, entre 12 e 15 anos. As amostras foram semeadas em ágar MSB para contagem de estreptococos mutans, ágar Rogosa para contagem de lactobacilos e ágar sangue para a contagem de bactérias totais. Os números de estreptococos mutans e lactobacilos, nas amostras de placa e de

saliva, apresentaram correlação estatisticamente significante (r = 0,56 e 0,42, respectivamente). Em 24 indivíduos, os estreptococos mutans e lactobacilos não foram detectados na placa e saliva. Em 3 indivíduos, as amostras de placa não apresentaram estreptococos mutans, mas a saliva sim.

VAN HOUTE et al.[104] avaliaram em 1991 o potencial acidogênico e o número de estreptococos mutans na placa bacteriana de manchas brancas e superfícies hígidas de 12 indivíduos cárie ativos. Após 48 horas sem higiene, duas amostras de placa, uma de superfície hígida e outra de mancha branca, foram coletadas de superfícies vestibulares e linguais dos dentes. A queda do pH foi avaliada após acréscimo de 10 µL de uma solução de glicose na suspensão de placa. Além disso, o número bactérias totais, estreptococos totais, estreptococos mutans e lactobacilos foi determinado. O pH inicial e final foi menor para as amostras de placa de manchas brancas e a queda do pH foi mais rápida. A porcentagem de estreptococos mutans em relação às bactérias totais também foi maior (2,9%), nas placas de mancha branca, do que nas placas de superfícies hígidas (0,3%). Todas as amostras de placa com mais de 1% de mutans exibiram uma alta capacidade de queda do pH; entretanto, 5 amostras com tempo de queda do pH abaixo de 4 minutos tiveram baixos níveis de mutans (menos de 0,01% ou 0,1%). As proporções de lactobacilos em ambas as placas foram menores que 0,01%. Os resultados indicam que a relação entre o potencial de queda do pH da placa dental humana e sua composição microbiológica é complexa; apesar do potencial de queda do pH estar normalmente associado aos níveis de estreptococos mutans, algumas amostras de placa com alta queda do pH apresentaram níveis baixos ou negligíveis de mutans e lactobacilos. Isto sugere o envolvimento de outros microorganismos acidogênicos, provavelmente entre o grupo dos estreptococos, devido ao seu alto número na placa e seu potencial cariogênico em roedores.

Em 1992, HARDIE[41] fez uma revisão a respeito da microbiologia da cárie e doença periodontal. Ambas são doenças relacionadas à placa bacteriana, embora muito influenciadas por fatores do hospedeiro e do ambiente. Especificamente com relação à cárie, o autor coloca que várias cepas de microorganismos foram capazes de induzir cárie em animais; estas cepas, no entanto, apresentam cariogenicidade variável, sendo os estreptococos mutans os líderes do conjunto de microorganismos cariogênicos. A exemplo do que já foi observado com animais, outras bactérias, além dos estreptococos mutans, podem estar também envolvidas no desenvolvimento de cárie em humanos. Alguns trabalhos já demonstraram a formação de lesões na aparente ausência de estreptococos mutans e, por outro lado, indivíduos apresentam uma alta contagem de estreptococos mutans e não desenvolvem cárie. Isto volta a questão da microbiologia da cárie para uma

comunidade de bactérias cariogênicas, ao invés de uma única espécie ou tipo. Com relação à contagem salivar de estreptococos mutans e lactobacilos, o autor relata que na maioria dos estudos transversais, existe uma correlação entre esta contagem e a prevalência de cárie; entretanto, esta associação não indica necessariamente uma relação de causa e efeito entre a contagem de bactérias e a atividade de cárie. Em estudos longitudinais, a presença de níveis salivares altos de bactérias cariogênicas demonstrou algum valor preditivo na determinação do risco futuro de cárie; entretanto, os limites para classificar um indivíduo entre alto e baixo risco à cárie não estão totalmente estabelecidos. O autor sugere que contagens salivares de estreptococos mutans acima de 100.000 sejam consideradas de alto risco, mas enfatiza que a determinação do risco à cárie não depende apenas dessa contagem.

MARGOLIS et al.[73], 1993, estudaram as diferenças entre a placa bacteriana de indivíduos livres de cárie e indivíduos cárie ativos, antes e após a realização de bochechos com soluções de diferentes concentrações de sacarose. A composição bioquímica da placa nos dois grupos de indivíduos antes da exposição à sacarose era similar. Após o bochecho, o pH da placa caiu rapidamente, sendo bastante afetado pela concentração de sacarose e menor para os indivíduos cárie ativos. A porcentagem de estreptococos do grupo mutans dos indivíduos livres de cárie variou de 0 a 2,5% do total de microorganismos cultiváveis, contra 0,1 a mais de 10% nos indivíduos cárie ativos. Antes da exposição à sacarose, a placa dos indivíduos livres de cárie era mais supersaturada com relação aos minerais do esmalte do que a dos indivíduos cárie ativos e o grau de saturação caiu menos para os primeiros, após o bochecho.

Dando continuidade ao trabalho de VAN HOUTE et al.[104] (1991), SANSONE et al.[84] estudaram, em 1993, a capacidade de acidogênese de estreptococos mutans e outros estreptococos obtidos da placa bacteriana de 3 grupos de indivíduos. O primeiro grupo era composto por indivíduos cárie ativos, onde a placa bacteriana foi coletada, após 48 horas de restrição de higiene, de superfícies hígidas e com mancha branca. O grupo 2 era composto por indivíduos livres de cárie e o grupo 3 por indivíduos com cárie de raiz. As amostras de placa bacteriana foram analisadas quanto à queda do pH e composição microbiológica, que incluiu a contagem do número de bactérias totais, lactobacilos, estreptococos totais e estreptococos mutans. Além disso, a acidogenicidade de colônias isoladas de estreptococos "não mutans" foi avaliada em um caldo contendo 1% de glicose, pela medição do pH do caldo após 3 dias. O pH inicial das amostras de placa de superfícies com mancha branca do grupo 1 foi ligeiramente menor do que o das superfícies hígidas do mesmo grupo, que foi menor que o pH inicial das amostras de placa do grupo 2. A queda do pH também foi mais

rápida nas amostras de placa de mancha branca. A porcentagem de estreptococos mutans nas amostras do grupo 1 foi ligeiramente maior nas áreas de cárie ativa. O pH final dos caldos contendo as cepas de estreptococos "não mutans" obtidas do grupo 1 variou de abaixo de 4,2 a acima de 5,0, contra 3,95 a 4,10 das cepas de estreptococos mutans. Não houve diferença na capacidade de baixar o pH dos estreptococos "não mutans" entre as duas amostras de placa do grupo 1, mas as cepas com pH final no caldo menor que 4,2 ou 4,4 foram a maioria. Nos indivíduos livres de cárie houve predominância de cepas de estreptococos "não mutans" com pH final acima de 4,6. Os níveis de lactobacilos foram baixos em todos os grupos. Nas amostras de placa com menos de 0,5% de mutans, a proporção dos estreptococos "não mutans" com pH final abaixo de 4,2 ou 4,4 foi muito maior. Segundo os autores, entre os estreptococos "não mutans" estariam *S. sanguis*, *S. mitis* ou outros; nenhuma dessas espécies ou grupos tem correlação positiva com cárie, o que ajudou na concepção de que, dentre os estreptococos, apenas os mutans são considerados como fator etiológico importante. Os autores sugerem outras investigações sobre o papel dessas bactérias na etiologia da cárie, visto que o pH final é um indicador de acidogenicidade, mas a velocidade de produção de ácidos deve ser maior para os estreptococos mutans.

A respeito do uso dos fatores microbiológicos na previsão da ocorrência de cárie, VAN HOUTE[101] escreveu, em 1993, que a presença de lactobacilos e estreptococos mutans na placa de superfícies dentárias sadias e cariadas sugere uma limitação de seu uso para estimar a ocorrência futura de cárie. Apesar da associação positiva entre as contagens de lactobacilos e estreptococos mutans demonstrada por vários estudos, estes também se depararam com indivíduos com incidência de cárie zero e altas contagens, assim como indivíduos com alta incidência de cárie e baixas contagens. Além disso, o fluxo salivar e a ingestão de carboidratos influenciam os níveis de estreptococos mutans na placa, sugerindo um interação entre os diversos fatores envolvidos no desenvolvimento de cárie e dificultando a definição de um único teste que possa prever sua ocorrência.

No ano seguinte, VAN HOUTE[102] escreveu sobre o papel dos microorganismos na etiologia da cárie. Segundo o autor, existe uma correlação dinâmica entre consumo de carboidratos, composição microbiológica da placa, perfil do pH e atividade de cárie. A cárie pode então ser considerada uma doença infecciosa bacteriana modificada por carboidratos, pois um aumento no número de estreptococos mutans e lactobacilos na placa, induzido pelo consumo de carboidratos, causa uma maior diminuição do pH da placa e aumento no potencial cariogênico. O autor também enfatizou o importante papel da saliva em regular a virulência desses microorganismos. Outro ponto levantado é que uma alta queda do pH

pode ocorrer em placas com uma quantidade mínima de estreptococos mutans e lactobacilos. Entre os microorganismos envolvidos nessa queda do pH, chamados de estreptococos "não mutans" que baixam o pH, estariam as espécies *S. salivarius*, *S. mitis* e *S. sanguis*.

Em 1994, MARSH[74] fez uma revisão a respeito da microbiologia da placa dental. Ele criticou a hipótese da placa específica, que propõe que apenas um número limitado de microorganismos presentes na placa bacteriana estaria envolvido no desenvolvimento de cárie, mas encontra problemas para explicar a ocorrência da doença na aparente ausência desses microorganismos na placa, ou a sua presença em locais sem a evidência da doença. Da mesma forma, a hipótese da placa não específica defende que uma mistura heterogênea de microorganismos presentes na placa poderiam participar da cárie, mas não explica a evidência de especificidade demonstrada pelas doenças mediadas por placa. Utilizando conceitos semelhantes aos defendidos por VAN HOUTE[102], o autor propôs a hipótese da placa ecológica, que determina que fatores do ambiente bucal levam a uma alteração na microbiota da placa, predispondo um certo local à cárie. Por exemplo, a queda do pH após o metabolismo do açúcar selecionaria os microorganismos mais acidúricos às custas dos mais sensíveis a um pH baixo, principalmente se a freqüência de exposição ao açúcar for alta; da mesma forma, a redução do fluxo salivar causaria uma transformação microbiológica da placa.

SULLIVAN et al.[92], 1996, se propuseram a estudar a correlação entre cárie e número de estreptococos mutans e lactobacilos na placa bacteriana e na saliva estimulada, para determinar se a variação entre o índice de cárie poderia ser melhor explicado por uma amostra de placa total, ao invés da saliva. A saliva foi obtida por 5 minutos após estimulação com parafina e a placa foi coletada de todas as superfícies dentárias de 60 adolescentes. O coeficiente de correlação entre o número de bactérias na saliva e na placa foi de 0,75 para os estreptococos mutans e 0,72 para os lactobacilos. Entretanto, o coeficiente de correlação entre o índice de superfícies cariadas e restauradas e a contagem de mutans e lactobacilos foi baixo, mesmo considerando apenas os indivíduos com padrão de higiene deficiente. Os autores concluíram que a contagem de estreptococos mutans e lactobacilos na placa ou saliva não ajuda a explicar a ocorrência de cárie de modo que possa ser utilizada como uma ferramenta preditiva.

FEJERSKOV[34], 1997, contestou, de maneira interessante, os conceitos de cariologia que têm norteado as pesquisas científicas. Segundo ele, os conceitos simples de etiologia e patogênese da cárie desenvolvidos no meio do século passado ainda predominam, sem se

levar em conta o avanço do conhecimento científico durante as décadas subseqüentes. Com relação aos microorganismos cariogênicos, desde os achados de FITZGERALD e KEYES em animais, na década de 60, os cientistas têm focalizado seus estudos nos estreptococos mutans, ignorando o fato de que várias pesquisas já demonstraram que o número desses microorganismos na placa bacteriana de lesões de cárie ativa varia de níveis não detectáveis até o máximo de 30% da microbiota total. Também se ignora o fato de que um declínio na ocorrência de cárie ocorreu há alguns anos, sem mudanças aparentes nos níveis salivares de estreptococos mutans na população. Segundo o autor, a cárie não é um evento singular, mas uma sucessão de processos de des e remineralização resultantes do metabolismo bacteriano sobre a superfície do dente. Assim, a cárie é uma doença multifatorial, mas cuja única causa é a placa bacteriana. Para FEJERSKOV, os estreptococos mutans e os lactobacilos não devem ser considerados como causadores da cárie, mas como microorganismos indicadores, que refletem as condições acidúricas do ambiente.

BOWDEN[9], 1997, questionou se a composição bacteriana da placa e saliva poderiam diagnosticar a atividade de cárie dos indivíduos. Segundo ele, os testes microbiológicos mostram uma associação íntima entre os odontopatógenos e cárie em indivíduos com alta e baixa atividade da doença, mas não são tão efetivos na detecção de grupos com níveis intermediários de cárie ou em análises individuais. Pode ocorrer cárie na ausência de estreptococos mutans na placa, ou quando estes microorganismos estão presentes em níveis muito baixos, o que sugere que outros microorganismos possam estar envolvidos. Para o autor, os testes microbiológicos deveriam ser utilizados no monitoramento de cada paciente na determinação de alterações no ambiente bucal.

O grau de saturação da placa bacteriana com relação aos minerais do esmalte foi estudado *in situ* por CURY; REBELLO; DEL BEL CURY[21], 1997, de acordo com a freqüência diária de exposição à sacarose. Doze voluntários utilizaram dispositivos palatinos contendo blocos de esmalte humano armazenados em solução de formol por um mês, montados 1 milímetro abaixo do acrílico e cobertos por uma tela plástica para promover o acúmulo de placa. O estudo foi dividido em quatro fases de 28 dias, variando-se a freqüência de exposição a uma solução de 20% de sacarose: zero, 2, 4 ou 8 vezes ao dia. Os voluntários utilizaram um dentifrício não fluoretado, mas beberam água fluoretada, e removeram o dispositivo intrabucal durante as refeições. A placa foi analisada quanto ao conteúdo de cálcio, fósforo, flúor e polissacarídeos solúveis e insolúveis. A placa formada na presença de sacarose apresentou concentrações significantemente menores de cálcio, fósforo e flúor. Não houve diferença na concentração de flúor na placa formada durante 4 ou 8 exposições

à sacarose, nem entre a concentração de cálcio e fósforo na placa formada durante 2, 4 ou 8 exposições à sacarose. A concentração de polissacarídeos solúveis não foi diferente nos quatro protocolos, mas a concentração de polissacarídeos insolúveis foi significantemente maior com 8 exposições à sacarose. Os blocos de esmalte apresentaram manchas brancas visíveis quando expostos 4 ou 8 vezes por dia à sacarose, sugerindo que a fluoretação da água por si só é capaz de impedir a desmineralização em placas bacterianas intactas expostas até 2 vezes ao dia à sacarose.

Em continuidade ao trabalho anterior, CURY et al.[22] determinaram, em 2000, a concentração de cálcio, fósforo, flúor e polissacarídeos e a composição protéica da placa bacteriana formada *in situ* em um estudo cruzado de 28 dias, seguindo 3 protocolos: exposição à solução de sacarose a 20% 8 vezes ao dia, exposição a solução com 10% de glicose e 10% de frutose 8 vezes ao dia e grupo controle. A microdureza dos blocos de esmalte também foi analisada. A concentração de cálcio, fósforo e flúor foi significantemente maior no grupo controle do que nos outros dois, mas os valores foram numericamente menores na placa bacteriana formada na presença de sacarose. A concentração de polissacarídeo insolúvel foi significantemente maior na placa formada na presença de sacarose. A análise protéica demonstrou composição diferente entre as 3 placas. Dos 48 blocos de esmalte examinados, 27 apresentaram manchas brancas visíveis no tratamento com glicose e frutose e 43 no tratamento com sacarose. Análise de microdureza superficial dos blocos demonstrou perda de aproximadamente 3% de dureza no grupo controle, 44% no grupo tratado com glicose e frutose e 73% no grupo tratado com sacarose. Os resultados sugerem que a alta cariogenicidade da placa formada na presença de sacarose seja principalmente explicada pela alta concentração de polissacarídeos extracelulares insolúveis, mas a baixa concentração inorgânica e a composição protéica também podem influenciar o processo.

2.1.4. Acúmulo de placa bacteriana e progressão da lesão de cárie

Em 1970, VON DER FEHR; LÖE; THEILADE[106] publicaram os resultados de um estudo de cárie experimental em humanos. Doze estudante de odontologia ficaram 23 dias sem realizar qualquer procedimento de higiene bucal; metade deles realizou um bochecho com solução de sacarose a 50%, por 2 minutos, 9 vezes ao dia durante este período. Após essa fase de desmineralização, os voluntários passaram por dois períodos de

remineralização de 30 dias, realizando bochechos diários com solução de fluoreto de sódio a 0,2%. O índice de cárie foi determinado imediatamente antes e ao final do período de acúmulo de placa através de escores. O índice de placa e o gengival foram medidos, periodicamente, durante o período de ausência de higiene. Esfregaços da placa bacteriana foram obtidos periodicamente, corados pelo método de Gram e examinados quanto à porcentagem de distribuição das bactérias. Ao final do período de ausência de higiene, o índice de placa e de cárie no grupo da sacarose foi consideravelmente maior do que no grupo controle. A severidade das lesões de cárie, vistas ao microscópio com 16X de aumento, variou de alterações quase imperceptíveis até manchas branco-acinzentadas. Não houve diferença entre a colonização bacteriana nos dois grupos; inicialmente a placa era composta por cocos e bacilos gram positivos e gram negativos; após 1 a 5 dias apareceram microorganismos filamentosos e após 5 a 10 dias a microbiota apresentava espirilos e espiroquetas. A proporção final de bactérias foi alcançada após 10 a 15 dias sem higiene. Ambos os grupos apresentaram gengivite abundante ao final dos 23 dias, sem diferença entre eles. O índice de cárie após os dois períodos de remineralização foi semelhante para os dois grupos, demonstrando que as alterações foram reversíveis.

HOLMEN et al.[47, 48] publicaram em 1985 dois artigos a respeito dos estágios de progressão da cárie de esmalte após 1, 2, 3 ou 4 semanas de acúmulo de placa *in vivo*. Três pacientes com pré-molares indicados para extração participaram do estudo. Os pré-molares foram bandados, deixando um espaço de 0,8 mm entre a banda e o dente para acúmulo de placa bacteriana. A avaliação dos dentes em microscopia de luz polarizada, publicada em um artigo[47], mostrou, após uma semana, a formação de uma zona translúcida externa no esmalte, e com duas ou três semanas os dentes apresentaram vários graus de desmineralização subsuperficial. Com quatro semanas de desafio cariogênico, os três indivíduos desenvolveram manchas brancas opacas sob a área da banda. A análise em microscopia eletrônica de varredura[48] indicou sinais de dissolução da superfície do esmalte, com aumento do espaço intercristalino. Com o passar do tempo, a superfície ficou gradualmente mais porosa e a dissolução aumentou progressivamente. Independentemente do período, o esmalte subsuperficial apresentou a maior porosidade.

Em 1988, HOLMEN et al.[49] avaliaram o efeito de uma profilaxia ou limpeza com bolinha de algodão umedecida em água, uma vez por semana, na formação de lesões de cárie em pré-molares bandados como descrito anteriormente. Após 5 semanas de acúmulo de placa, todos os dentes do grupo controle apresentaram lesões de mancha branca, o que não ocorreu naqueles dentes limpos por qualquer um dos dois métodos.

Também em 1988, OGAARD; ROLLA; ARENDS[81] cimentaram bandas em pré-molares com indicação de extração, deixando um espaço para o acúmulo de placa bacteriana. Os dentes foram extraídos após 4, 6 ou 8 semanas e a desmineralização foi avaliada através de microrradiografias. A perda mineral e a profundidade da lesão em esmalte foram proporcionais ao período de desmineralização. Os autores descreveram a progressão da lesão como um valor médio, pois a desmineralização é um evento intermitente. Após 4 semanas, a profundidade da lesão foi de aproximadamente 100 micrômetros, equivalente a uma progressão de 3 µm/dia.

Em 1990, paralelamente ao trabalho de BOYAR et al.[10] (ver 2.1.3), THYLSTRUP et al.[97] publicaram os resultados da descalcificação do esmalte após períodos de acúmulo de placa de 1, 2, 4, 8 e 14 dias. Onze adolescentes, vivendo em comunidades com água fluoretada no Canadá, participaram da pesquisa. Seus dentes foram bandados como já descrito e extraídos após os períodos mencionados. Após a extração, os dentes foram avaliados macroscopicamente, em microscopia eletrônica de varredura e em microscopia de luz polarizada. Macroscopicamente, os dentes não apresentaram sinais de manchas brancas, mas com 8 e 14 dias de acúmulo de placa a área bandada apresentou uma opacidade evidente, contrastando com a área sadia adjacente. Análise em microscopia eletrônica de varredura não demonstrou alteração no esmalte com 1 dia de acúmulo de placa. Após 2 dias, alguns dentes demonstraram sinais de alteração quando observados no microscópio eletrônico, mas com 4 dias, 6 dos 8 dentes avaliados apresentaram dissolução da superfície do esmalte. A alteração do esmalte foi progressivamente maior, até que com 14 dias, todos os dentes analisados exibiram sinais de dissolução.

2.2. Avaliação da perda mineral do esmalte

Em 1912, PICKERILL[83] desenvolveu um esclerômetro para medir a dureza dos dentes. O aparelho consistia de uma ponta de diamante e um peso, que eram aplicados sobre a estrutura dentária com pressão crescente, até que se pudesse observar um risco macroscopicamente, após a aplicação de grafite sobre ele.

Outros métodos de avaliação da dureza dos dentes, através da resistência ao risco, foram utilizados por diversos pesquisadores. Em 1933, HODGE; MCKAY[45], utilizando o teste de Bierbaum, onde um risco era realizado com um diamante e medido através de um

microscópio, determinaram a microdureza do esmalte e dentina em diferentes áreas do dente. A microdureza era calculada através da razão entre a área da impressão e a força aplicada e, segundo os autores, seus valores deveriam ser considerados apenas para efeito de comparação.

Dentre os métodos de avaliação da microdureza através da resistência à penetração existentes até a década de 30, nenhum era adequado para utilização na estrutura dentária. Entretanto, em 1939, KNOOP; PETERS; EMERSON[58] desenvolveram um penetrador de diamante em formato piramidal, que podia ser pressionado contra um material com cargas de 1 g a 500 g. As indentações criadas pelo penetrador possuíam o formato de um losango, com a diagonal maior 7 vezes o comprimento da diagonal menor e 30 vezes a profundidade da impressão. Com a utilização do penetrador tipo Knoop, a maior parte da memória elástica do material avaliado tende a deformar a indentação transversalmente e não no seu longo eixo, o que permite a avaliação da microdureza de materiais frágeis, entre eles a estrutura dentária. O número de dureza Knoop (KHN) é expresso em Kg/mm^2, como a carga necessária para forçar o penetrador até que uma área de 1 mm^2 de superfície seja ocupada.

Em 1943, SOUDER; SCHOONOVER[88] empregaram a microdureza Knoop para estudar o efeito de dentifrícios e soluções contendo açúcar e ácidos na dissolução da superfície e amolecimento do esmalte e dentina. A associação entre açúcar e bactérias no desenvolvimento de cáries foi demonstrada após a imersão de fragmentos dentários numa solução de açúcar e saliva: houve dissolução e amolecimento do esmalte e dentina. Ao medirem lesões de mancha branca, os valores de dureza encontrados foram de 250 KHN, contra 350 KHN no esmalte sadio adjacente. Os autores enfatizaram as vantagens da utilização da microdureza no estudo da cárie em relação aos outros métodos existentes na época, permitindo a detecção de alterações na estrutura dentária de maneira rápida e sensível.

Em 1958, CALDWELL et al.[13] utilizaram a microdureza para avaliar a taxa de amolecimento de dentes humanos submetidos a desmineralização *in vitro*. Dentes intactos e polidos foram cobertos por placa bacteriana, cultivada a partir de saliva em um meio de cultura contendo glicose. Dez indentações com penetrador Knoop foram realizadas inicialmente e após a desmineralização *in vitro*. A microdureza inicial foi ligeiramente maior nas superfícies intactas (367), do que nas polidas (325). A porcentagem de diminuição de dureza por hora foi de 3,4% para as superfícies intactas e 4,9% para as superfícies polidas, em média. Os autores consideraram o método promissor para avaliação da taxa de desenvolvimento de cárie *in vitro* e para o teste de agentes anticariogênicos.

NEWBRUN; TIMBERLAKE; PIGMAN[80], em 1959, também avaliaram a taxa de amolecimento do esmalte através da microdureza superficial, após exposição dos dentes a um tampão lactato com pH 5,0. Neste experimento foram utilizados dentes humanos, intactos e polidos, e dentes bovinos intactos. A microdureza inicial e após a imersão no tampão por até 10 horas foi avaliada através de 10 indentações com penetrador tipo Knoop, com carga de 500 g por 10 segundos. A microdureza inicial dos dentes humanos e bovinos foi, em média, 367 e 356, respectivamente. Além disso, a taxa de amolecimento foi ligeiramente maior para os dentes bovinos do que para os humanos. Os dentes polidos apresentaram um menor desvio-padrão entre as leituras individuais de microdureza, mas a queda na dureza foi mais rápida do que para as superfícies intactas. Os autores também investigaram se a microdureza inicial tinha correlação com a resistência ao amolecimento; o índice de correlação foi praticamente zero e eles concluíram que a taxa de amolecimento era independente da dureza inicial.

Em 1960, NEWBRUN; PIGMAN[79] fizeram uma revisão dos métodos até então existentes para determinação da dureza do esmalte e dentina. Ressaltando as vantagens do penetrador Knoop, os autores concluíram que a microdureza é um método sensível e adequado para acompanhar a progressão de lesões de cárie produzidas natural ou artificialmente.

FEAGIN; KOULOURIDES; PIGMAN[31], 1969, avaliaram a relação entre perda ou ganho de dureza do esmalte e desmineralização ou remineralização. Blocos de esmalte humano e bovino foram utilizados. Cinco indentações foram realizadas inicialmente e outras 5 após o amolecimento e/ou endurecimento do esmalte, a uma distância de 60 µm das primeiras. A desmineralização foi realizada em tampão acetato de potássio com pH 5,0, por 4 a 5 horas, após a qual uma diminuição em 100 a 120 KHN pôde ser observada. A remineralização foi realizada durante 1 a 6 horas em solução remineralizante descrita pelos autores. A concentração de cálcio e fósforo nas soluções des e remineralizante foi determinada. A diminuição e o aumento no KHN apresentou uma relação linear com a perda ou ganho de cálcio e fosfato pelo esmalte, o que demonstrou que as medidas de dureza podem ser usadas como indicadoras do seu grau de mineralização.

Para investigar a confiabilidade da utilização do teste de microdureza superficial na avaliação de lesões de cárie, ARENDS; SCHUTHOF; JONGEBLOED[3], 1979, testaram a microdureza Knoop de 60 dentes bovinos e 50 dentes humanos, desgastados e polidos, após a formação de lesões de cárie artificial. Foram utilizadas cargas de 25, 50, 100, 200 e 500 g por 10 segundos. A dureza Knoop do esmalte humano foi de 317 ± 30 e o esmalte

bovino se apresentou ligeiramente mais mole. De acordo com este estudo, quando o comprimento da indentação é medido em função da raiz quadrada da carga, encontra-se uma relação linear entre o esmalte humano e bovino hígidos, assim como para o esmalte com lesões artificiais de cárie. Além disso, nem a camada superficial da lesão nem o esmalte sadio subjacente influenciam consideravelmente as indentações. Assim, os autores provaram que as medidas das indentações refletem o grau de descalcificação da lesão, apesar da presença da camada superficial.

No ano seguinte, ARENDS; SCHUTHOF; JONGEBLOED[4] avaliaram a relação entre o comprimento da indentação e a profundidade da lesão. Utilizando a mesma metodologia descrita no artigo anterior, os autores concluíram que existe uma relação linear empírica entre profundidade da lesão de cárie artificial e comprimento de indentação para o esmalte humano e bovino e descreveram uma equação para determinar a profundidade da lesão.

As diferenças entre a taxa de produção de lesões artificiais de cárie em esmalte bovino, ovino e humano foram determinadas por FEATHERSTONE; MELLBERG[32], em 1981. O estudo incluiu esmalte humano decíduo e permanente, esmalte bovino decíduo e permanente (desgastado ou não) e esmalte ovino permanente. Dois sistemas para produção de cárie artificial foram utilizados por tempos diferentes e as lesões produzidas e sua profundidade foram quantificadas através da incorporação de corantes. As lesões no esmalte decíduo progrediram de forma mais rápida do que no esmalte permanente, tanto para o substrato humano como para o bovino. As lesões foram produzidas 3 vezes mais rápido no esmalte bovino permanente, bovino permanente desgastado e ovino permanente do que no esmalte humano permanente. Entretanto, a progressão da lesão ocorreu numa relação linear dependente da raiz quadrada do tempo, em todos os substratos.

Em 1983, em um “Workshop” sobre desmineralização e remineralização do esmalte, KOULOURIDES; HOUSCH[60] descreveram a microdureza superficial como um dos principais testes utilizados para avaliação da desmineralização e remineralização do esmalte. Segundo eles, apesar do esmalte ser um substrato não homogêneo, principalmente quando desmineralizado e remineralizado, a medida da microdureza é extremamente sensível às alterações na sua densidade mineral. A principal vantagem do método é que ele não é destrutivo, podendo avaliar uma sucessão de alterações ocorrendo no mesmo espécimen. Dentre suas desvantagens está a necessidade de uma superfície plana, que requer o desgaste da camada superficial do esmalte.

Em 1987, WHITE[109], ao avaliar a capacidade de remineralização *in vitro* de

dentifrícios fluoretados sobre o esmalte desmineralizado, fez uma comparação entre a microdureza superficial e a microrradiografia com relação à remineralização do esmalte. Segundo o autor, o conteúdo mineral da superfície do esmalte tem relação linear com a diagonal da indentação ou a sua penetração. Entretanto essa relação se restringe a lesões de cárie com pequena profundidade (menos de 50 micrômetros); em lesões subsuperficiais profundas, a microdureza superficial deve ser substituída pela microrradiografia ou pela microdureza longitudinal.

Em uma revisão detalhada sobre os modelos de cárie *in situ* (ver 2.3), ZERO (1995) defendeu o uso da microdureza superficial como método de análise mineral, por ser altamente sensível, principalmente quando se utilizam cargas pequenas, como 50 gramas, e reproduzível, podendo ser utilizada para o estudo dos estágios iniciais de desmineralização e remineralização do esmalte.

2.3. Estudos *in situ*

Em 1974, KOULOURIDES et al.[62] descreveram na literatura odontológica o primeiro teste *in situ*, desenvolvido em 1964[61] e utilizado para avaliação do efeito do flúor em um ensaio de cárie experimental. Blocos de esmalte bovino de 4 X 4 X 2 mm foram desgastados e polidos e sua microdureza Knoop inicial foi determinada por meio de 2 indentações com carga de 500 g. Metade dos blocos foram desmineralizados *in vitro*. Dois blocos, um hígido e um desmineralizado, foram montados em cada lado de próteses parciais removíveis inferiores, utilizadas por 3 voluntários. Em um dos lados da prótese, os blocos de esmalte foram cobertos com uma tela de fibra de poliéster (Dacron), para promover o acúmulo de placa bacteriana. Quatro vezes ao dia, as próteses eram removidas e um lado era imerso, durante 10 minutos, em água contendo 1 ppm de flúor e o outro lado (coberto com a tela), em uma solução de sacarose a 3% contendo 1 ppm de flúor. Este protocolo foi repetido durante 1 semana. A desmineralização ou remineralização foram avaliadas através da diferença entre a profundidade de penetração do diamante Knoop no esmalte, antes e após a exposição intrabucal. A incorporação de flúor nos blocos de esmalte também foi medida. Os blocos desmineralizados imersos em água contendo flúor sofreram remineralização e incorporação de flúor; nos blocos hígidos a mudança na dureza e a incorporação de flúor foram mínimas. Já a imersão em solução de sacarose a 3% causou maior perda de dureza nos blocos hígidos e maior reincorporação de flúor nos blocos

desmineralizados. Os autores encontraram uma grande variação entre os voluntários na desmineralização dos blocos imersos em sacarose.

Em 1977, OSTROM et al.[82] avaliaram a composição microbiológica da placa bacteriana formada *in situ* sobre blocos de esmalte bovino, cobertos com uma tela. Inicialmente foi avaliada a relação entre a microbiota da placa formada *in situ* e a microbiota presente em diversas estruturas bucais, para determinar qual delas contribuiu para a colonização dos blocos. Os autores empregaram um teste *in situ* semelhante ao de KOULOURIDES et al.[62], sendo os blocos de esmalte bovino imersos 4 vezes ao dia por 10 minutos em uma solução de sacarose a 3%. Duas horas após a instalação do dispositivo intrabucal inferior, amostras para análise microbiológica foram coletadas da tela, da placa formada sobre os blocos, da saliva não estimulada, da mucosa vestibular, da língua e de alguns dentes. O dispositivo intrabucal continuou a ser utilizado por 7 dias, quando amostras da placa aderida à tela e sobre a superfície dos blocos de esmalte foram coletadas. Todas as amostras foram semeadas em ágar sangue, mitis salivarius e Rogosa. As colônias presentes no ágar mitis salivarius foram identificadas morfologicamente ou através de testes fisiológicos entre *S. mutans*, *S. salivarius*, *S. sanguis* ou outros estreptococos. Este protocolo foi repetido 4 vezes em 2 voluntários, sendo que não houve grande variação na composição da placa obtida nas quatro repetições. Os *S. mutans* compreenderam menos de 1% do total de estreptococos em todas as amostras de placa dos blocos. Houve semelhança entre a placa da mucosa vestibular e a aderida sobre os blocos após 2 horas, sugerindo que a colonização do aparelho se dá por contato direto. Também houve aumento na contagem de *S. salivarius* e lactobacilos na tela que cobria os blocos após 7 dias, sugerindo uma retenção dessas bactérias nesse local. Numa segunda etapa, 4 voluntários utilizaram o dispositivo por períodos de 2, 6 e 24 horas, 3 dias e 7 dias, após os quais a composição microbiológica da placa formada e a microdureza dos blocos foi determinada. Para análise microbiológica, foram utilizadas a placa presente na tela, a placa não aderida (lavada com 10 mL de meio de cultura) e a placa aderida presente sobre o bloco. Nos primeiros 3 dias, os *S. mutans* compreendiam 1% do número total de estreptococos; este número aumentou para até 15% na placa de 7 dias. Embora a proporção de *S. mutans* tenha aumentado progressivamente, não foi demonstrada correlação aparente entre essa proporção e a quantidade de desmineralização. Um voluntário apresentou a menor taxa de desmineralização dos blocos de esmalte e a maior proporção de *S. mutans* na placa. A proporção de *S. salivarius* aumentou entre o terceiro e o sétimo dia; nos dois voluntários que apresentaram um alto grau de desmineralização, a proporção de *S. salivarius* estava aumentada. A presença de *S. salivarius* na placa reforça a idéia de que a gaze utilizada para

cobrir os blocos favorece o estabelecimento dessas bactérias. Após 7 dias, a variação na profundidade de penetração do microdurômetro foi de 4 a 6 micrômetros nos voluntários com maior desmineralização, contra menos de 0,5 micrômetro nos outros dois. A maior parte da desmineralização ocorreu entre o terceiro e o sétimo dia.

Um outro tipo de teste *in situ* foi desenvolvido por BRUDEVOLD et al.[12], em 1984. Uma massa de *S. mutans* cepa Ingbritt-1600 foi preparada e colocada em contato com blocos de esmalte bovino, montados em dispositivos intrabucais palatinos, que foram utilizados por 5 voluntários durante 2 horas. Os voluntários fizeram um bochecho de 1 minuto com uma solução de sacarose a 10% nos tempos 0 e 60 minutos. Para avaliar a desmineralização dos blocos, os autores utilizaram a permeabilidade do esmalte ao iodo, medida inicialmente e ao final das 2 horas. Os bochechos com sacarose causaram desmineralização do esmalte; quando os voluntários não realizaram bochecho algum, houve remineralização. A segurança do método foi medida através da eliminação dos *S. mutans* da saliva dos voluntários, que ocorreu após 1 a 2 semanas. A principal vantagem deste teste intrabucal é sua rapidez e sensibilidade, embora o problema ético de se introduzir uma massa de *S. mutans* na cavidade bucal dos voluntários seja uma desvantagem.

O efeito da estimulação salivar na inibição da desmineralização do esmalte foi estudado *in situ* por KASHKET; YASKELL; LOPEZ[51], em 1989. Uma massa de *S. mutans* foi colocada sobre blocos de esmalte bovino montados em um dispositivo intrabucal palatino. O efeito da utilização de uma goma de mascar contendo sorbitol durante 30 minutos, iniciada após 5, 15 ou 30 minutos de um bochecho com solução de sacarose a 10%, foi avaliado por meio da desmineralização do esmalte bovino e da alteração do pH da placa. A maior redução na desmineralização do esmalte ocorreu quando a goma de mascar foi introduzida aos 5 minutos após o bochecho com sacarose; não houve diferença na desmineralização apresentada quando a goma foi introduzida após 30 minutos e aquela do grupo controle. O pH da placa subiu mais rapidamente quando a goma de mascar foi utilizada. Os autores sugeriram que a inibição da desmineralização do esmalte, pelo uso da goma de mascar, seja causada pela estimulação do fluxo salivar.

A influência dos métodos de esterilização dos blocos de esmalte a serem utilizados nos testes de cariogenicidade *in situ* na sua microdureza superficial foi testada por CHANDLER[15], em 1990. O autor preparou blocos de esmalte bovino para realização dos testes de microdureza e submeteu-os a 3 métodos de esterilização: autoclave, radiação gama e óxido de etileno. Posteriormente, avaliou a alteração na microdureza e a morfologia superficial do blocos, através de microscopia eletrônica de varredura. Nenhum dos 3

métodos alterou a morfologia superficial dos blocos; entretanto, a autoclave causou um amolecimento significante do esmalte. Segundo a literatura, a radiação gama pode alterar a resposta do esmalte em testes de cariogenicidade, tornando-o mais resistente. O óxido de etileno não alterou a microdureza do esmalte, mas este método de esterilização tende a desaparecer, às custas da toxicidade do gás, sua alta capacidade explosiva e à complexidade de seu uso. Devido a ausência de outros métodos, para o autor a radiação gama parece ser o método mais adequado para a substituição do óxido de etileno, na esterilização de blocos de esmalte.

MACPHERSON et al.[69], 1990, estudaram *in situ* o efeito da aplicação de sacarose e da implantação de estreptococos mutans na composição microbiológica da placa bacteriana de três semanas, em 5 voluntários. Três protocolos experimentais foram utilizados neste estudo: (a) uso de um aparelho removível inferior contendo 4 blocos e 2 fatias de esmalte humano em cada lado, sem qualquer cobertura, na região lingual, durante 3 semanas, sendo removido da boca apenas durante a escovação dos dentes naturais; (b) aplicação de uma solução de sacarose a 10% por 1 minuto, 9 vezes por dia, na área contendo os espécimens de esmalte; (c) inoculação de estreptococos mutans, obtidos do próprio voluntário, na área contendo os espécimens de esmalte e aplicação de solução de sacarose a 10% como descrito em "b". Ao final da terceira semana, a placa formada sobre os blocos e fatias de esmalte foi coletada, diluída e semeada em ágar sangue, MSB e Rogosa. As colônias foram identificadas através da coloração e morfologia de Gram, exigências atmosféricas para crescimento e testes bioquímicos. A freqüência de isolamento dos estreptococos mutans sobre os blocos de esmalte foi de 62%, 63% e 90%, respectivamente, para os protocolos "a", "b" e "c". A porcentagem média de mutans sobre o número de bactérias totais nessas placas foi de 3,3%, 4,4% e 21,2%, respectivamente, para os protocolos "a", "b" e "c". O efeito da diferença entre os voluntários foi significante a 1%, sendo que um voluntário foi o responsável pelo aumento na porcentagem média de estreptococos mutans sobre o número total de viáveis, principalmente nos protocolos "a" e "b". Mesmo no protocolo "c", três dos cinco voluntários apresentaram uma porcentagem de mutans na placa abaixo de 1%. No protocolo "b", houve uma maior freqüência de isolamento e porcentagem de bacilos gram negativos. Nesse estudo, a aplicação extrabucal de sacarose teve um efeito qualitativo e quantitativo muito pequeno na composição microbiológica da placa. Segundo os autores, a utilização de uma tela sobre os blocos de esmalte para o acúmulo da placa pode levar a um aumento na proporção de estreptococos mutans.

Paralelamente ao trabalho anterior, MACPHERSON; MACFARLANE; STEPHEN[68]

(1990) estudaram a relação entre a microbiota da placa bacteriana formada *in situ* e a desmineralização das fatias de esmalte. Quarenta e três porcento dos sítios de esmalte avaliados apresentaram mudanças mínimas no conteúdo mineral, avaliadas através de microrradiografia, enquanto que 9% das lesões tiveram uma desmineralização de mais de 1.000 unidades de perda mineral total. As lesões foram divididas de acordo com a perda mineral em 4 grupos, em ordem crescente. A freqüência de isolamento dos estreptococos mutans, no grupo 1, foi de 52%, chegando a 100% no grupo 4, o que suporta o papel desses microorganismos no desenvolvimento das lesões de cárie. Entretanto, nem estreptococos mutans, nem lactobacilos foram detectados em 27% das lesões do grupo 3 (entre 500 e 999 unidades de perda mineral total), sugerindo que outros microorganismos acidogênicos presentes na placa possam ter sido responsáveis pela desmineralização. A freqüente aplicação de sacarose resultou em um leve, mas não significante, aumento nos níveis de desmineralização, em comparação com os sítios que receberam apenas o açúcar da dieta do voluntário; por outro lado, a implantação de estreptococos mutans, associada à aplicação de sacarose, levou a um aumento significante na perda mineral. A porcentagem de mutans, em relação ao número de bactérias totais, aumentou com o aumento da perda mineral, sendo a porcentagem e a freqüência de isolamento dessas bactérias maiores nos grupos com maior desmineralização, mesmo naqueles protocolos em que não foram inoculados pelos pesquisadores.

Em 1991, MACPHERSON et al.[70] avaliaram se a placa bacteriana formada *in situ* sobre blocos e fatias de esmalte e aquela formada sobre uma base de acrílico são semelhantes à placa formada naturalmente sobre as superfícies lisas dos dentes. Cinco voluntários utilizaram, durante uma semana, um aparelho[68, 69] contendo 4 blocos e uma fatia de esmalte, que era removido apenas duas vezes ao dia para higienização dos dentes naturais. A placa bacteriana foi coletada das fatias e blocos de esmalte, da área do acrílico junto aos blocos e dos primeiros molares permanentes inferiores dos voluntários, que estavam em contato com o acrílico do aparelho. Posteriormente, foi coletada a placa formada por uma semana, sem o uso do aparelho, sobre a mesma superfície dos molares permanentes. Além disso, foram avaliados o pH e a quantidade de lactato/acetato da placa presente sobre os blocos de esmalte e sobre os primeiros molares dos voluntários, antes e após um bochecho com sacarose a 10%. Apesar de algumas diferenças quantitativas terem sido observadas entre as proporções de bactérias isoladas das diferentes superfícies, qualitativamente a microbiota foi muito similar, não sendo encontrada também diferença entre o pH e as proporções de lactato/acetato, nas diferentes placas, após o bochecho com sacarose. Houve uma variação significante entre os voluntários na composição da placa em

diferentes superfícies. A microbiota predominante na placa bacteriana sobre os blocos de esmalte foi mais próxima daquela formada sobre dentes naturais do que a formada sobre fatias de esmalte. Os autores concluíram que a placa formada *in situ* é similar àquela formada sobre a dentição natural, mas esta semelhança pode ser diminuída pela utilização de uma tela sobre os blocos, para promover o acúmulo de placa.

Em 1992, vários artigos apresentados durante um "Workshop" sobre avanços tecnológicos nos modelos intrabucais utilizados para avaliar a cariogenicidade foram publicados no periódico Journal of Dental Research.

FEATHERSTONE; ZERO[33] (1992) relataram suas experiências com o uso de testes *in situ*. Segundo eles, apesar desses testes simularem como nenhum laboratório as condições da cavidade bucal, estão sujeitos a diversas variáveis que devem ser ao máximo controladas como, por exemplo, pela realização de estudos cruzados. À medida que relatam suas experiências com alguns tipos de metodologias *in situ*, os autores colocam os critérios necessários à execução adequada desses testes, entre eles a seleção e o seguimento dos voluntários, o preparo do dispositivo intrabucal e o método de avaliação da des ou remineralização.

VERNON et al.[105] (1992) escreveram a respeito da influência de certos fatores nos estudos *in situ*, com base em um trabalho de remineralização de lesões de cárie artificial através de dentifrícios fluoretados. Dentre as sugestões dos autores, está a avaliação da cooperação do voluntário através de diários indicando a freqüência de uso do tratamento; no experimento por eles relatado, houve diferença, porém, não estatisticamente significante, quando dados de todos os voluntários foram comparados com os dados daqueles que relataram cooperação, o que sugere que este tipo de avaliação da colaboração é importante.

KOULOURIDES; CHIEN[59] (1992) fizeram uma revisão sobre o teste intrabucal de cariogenicidade desenvolvido em 1964 por KOULOURIDES; VOLKER[61]. Neste artigo, os autores colocam que a microdureza superficial, utilizada como método de avaliação mineral, nesse teste *in situ*, permite diversas avaliações do aumento e regressão da lesão de cárie no mesmo espécimen de esmalte, porque o penetrador, quando pressionado com uma determinada carga sobre a superfície do esmalte, comprime os minerais da lesão sobre o tecido intacto e penetra até que a resistência desenvolvida seja igual à pressão exercida pela carga. Para o teste de microdureza é necessário o desgaste de 100 a 200 micrômetros do esmalte até a obtenção de uma superfície plana e polida; assim, a camada do esmalte

mais rica em flúor é removida e a variabilidade dos blocos é diminuída. O uso de dentes bovinos no teste intrabucal de cariogenicidade também é justificado neste artigo: quando utilizaram a microdureza superficial, os autores não encontraram diferença entre o esmalte humano e bovino, com exceção do esmalte humano apresentar maior variabilidade devido ao menor tamanho e maior curvatura da superfície.

TEN CATE; VAN DE PLASSCHE-SIMONS; VAN STRIJP[95] (1992) colocaram em seu artigo a importância do controle das diversas variáveis presentes nos testes *in situ*. Com relação à seleção dos voluntários, o ideal é trabalhar com indivíduos jovens, nos quais a cárie é mais pronunciada. A respeito do substrato, o esmalte bovino é mais poroso que o humano, podendo levar a diferenças na taxa de des ou remineralização. A utilização de tela para promover o acúmulo de placa bacteriana pode levar à formação de uma microbiota de composição diferente daquela formada sobre superfícies livres; por outro lado, a colocação dos espécimens em um sítio com recessão leva a diferentes padrões de desmineralização e remineralização na porção central e periférica do espécimen. Com relação ao método de avaliação da perda/ganho de mineral, a microdureza superficial parece representar bem as alterações ocorridas na camada mais superficial da lesão, sendo um método mais sensível que a microrradiografia nessa região.

MANNING; EDGAR[72] (1992) fizeram uma revisão a respeito da metodologia envolvida nos estudos *in situ*. Com relação ao substrato, o esmalte bovino apresenta pouca variabilidade, principalmente após a remoção de 100 a 200 micrômetros de sua superfície externa. Dentre os métodos de avaliação da perda ou ganho de mineral estão a microdureza, a microrradiografia e a microscopia de luz polarizada. O primeiro é um teste sensível, que pode ser utilizado no mesmo espécimen antes e após os tratamentos, mas que não fornece medidas diretas do conteúdo mineral e requer uma superfície polida. Já a microrradiografia e a microscopia de luz polarizada necessitam que o dente seja seccionado.

Para STOOKEY[91] (1992) a experiência passada e atual de cárie dos voluntários do estudo *in situ* devem ser conhecidas, através do índice CPOD e da contagem de *S. mutans* e lactobacilos, assim como o fluxo salivar, pH, capacidade tampão e concentração de cálcio e fósforo na saliva. Outra questão colocada pelo autor é que os estudos *in situ* devem evitar períodos de feriados, onde o consumo de doces e lanches aumenta. Com relação à colaboração dos voluntários, ela deve ser controlada através de diários ou de contatos por telefone. O uso de voluntários adultos ao invés de crianças facilita o entendimento dos objetivos do estudo e aumenta a colaboração.

MELLBERG[76] (1992) fez uma revisão sobre os substratos utilizados nos estudos *in situ*. O esmalte humano é considerado o substrato de escolha, mas uma de suas desvantagens é a sua pouca disponibilidade em quantidade e qualidade; ele normalmente não tem uma superfície plana ampla e sua composição e resposta ao teste variam de acordo com a idade. O esmalte de incisivos bovinos é facilmente obtido em grande quantidade e boas condições, apresenta superfícies planas amplas e possui uma composição menos variável que o esmalte humano, devido à menor concentração de flúor e por não passar por desafios cariogênicos, resultando em uma resposta experimental mais padronizada. Ele também é mais poroso que o esmalte humano, apresentando uma taxa de difusão e formação da lesão mais rápidas. O acúmulo de placa bacteriana sobre os blocos de esmalte pode ser promovido pela colocação de uma cobertura sobre os espécimens; para aumentar a taxa de formação da lesão e padronizar o desafio cariogênico, os espécimens cobertos podem ser expostos extrabucalmente a uma solução cariogênica. Entretanto, o desenvolvimento de cárie em espécimens tratados com sacarose várias vezes ao dia é severo e não necessariamente natural. Com relação à difusão de íons, os espécimens cobertos por tela são mais representativos de áreas interproximais; aqueles colocados abaixo do nível do aparelho são mais representativos de superfícies lisas.

Em 1994, LINGSTRÖM et al.[66] avaliaram a desmineralização do esmalte e dentina *in situ* e a alteração no pH da placa em relação ao consumo de alimentos à base de amido e de sacarose. Oito voluntários utilizaram uma prótese total inferior contendo blocos de esmalte e dentina, montados 1 mm abaixo do acrílico, durante 3 períodos cruzados de 21 dias: (a) consumo de 12 a 15 vezes ao dia de alimentos contendo amido; (b) consumo de 12 a 15 vezes ao dia de alimentos contendo sacarose; (c) período controle. A desmineralização dos blocos foi avaliada através de microdureza superficial e microrradiografia. Não houve diferença estatisticamente significante entre a microdureza dos blocos de esmalte nos 3 períodos, mas, numericamente, o aumento no comprimento de indentação foi maior após o consumo de sacarose e amido. No início e final de cada período experimental, a saliva estimulada dos voluntários foi coletada para avaliação do número de estreptococos mutans e lactobacilos. Houve aumento na contagem dessas bactérias nos 3 períodos, sem diferença estatisticamente significante entre eles. A queda no pH após um bochecho de 1 minuto com sacarose a 10% foi maior na placa formada sobre os blocos nos períodos de consumo de amido e sacarose.

Em 1995, os resultados de uma conferência sobre os aspectos clínicos da des e remineralização dos dentes, incluindo testes *in situ*, foram publicados na revista Advances in Dental Research.

ZERO[112] (1995) fez uma revisão detalhada sobre os modelos de cárie *in situ*. Os critérios de exclusão dos voluntários para esses testes devem incluir: uso de antibióticos até 2 meses antes do início do estudo, pois eles podem alterar a microbiota bucal; uso de medicamentos que alterem o fluxo salivar; realização de aplicações profissionais de flúor até 2 semanas antes do estudo, devido à possibilidade de efeito residual. Não é necessário que os indivíduos sejam cárie ativos, pois é possível produzir uma rápida desmineralização do substrato experimentalmente na boca de um sujeito cuja dentição natural não mostra sinais de atividade de cárie. Por outro lado, indivíduos com lesões de cárie não tratadas devem ser excluídos. Dentre os fatores salivares, o ideal é que os voluntários possuam uma taxa de fluxo salivar variável, para representar adequadamente a população; entretanto, como este critério aumenta a variação entre os indivíduos, o autor e sua equipe estabeleceram critérios de exclusão com base no fluxo salivar não estimulado e estimulado. Segundo o autor, a variação entre os voluntários com relação à resposta aos estudos *in situ* é grande, o que entretanto não indica a pré-qualificação de indivíduos mais ou menos susceptíveis a um determinado tratamento. ZERO colocou, com relação ao dispositivo intrabucal, que os aparelhos removíveis, principalmente os não funcionais, dependem muito da colaboração dos voluntários, que podem intencionalmente ou inadvertidamente não utilizar o aparelho. A localização dos espécimens na cavidade bucal também é importante, pois diferentes locais apresentam diferentes velocidades e espessuras do filme salivar. A espessura e composição da placa bacteriana também interferem no modelo: diferenças na espessura da placa de 0,5 mm ou menos podem ter um profundo efeito na resposta do modelo *in situ*. A respeito do substrato, humano ou bovino, ZERO descreveu que seu laboratório utiliza blocos de esmalte bovino, que são menos variáveis, mais porosos, desmineralizam mais rápido e podem ser considerados uma alternativa aceitável ao esmalte humano, diminuindo o tempo do teste e a variabilidade da resposta do substrato no modelo experimental. O delineamento experimental deve ser preferencialmente cruzado. Entre suas conclusões o autor coloca que a maior fonte de variação associada aos estudos *in situ* deve ser de origem biológica e não experimental.

Em seu artigo, que tratou do papel da saliva nos estudos de cárie, HAY[43] (1995) enfatizou que ela não é somente um meio de diluição, mas um fluido de química complexa, que interage com a placa. Um aspecto importante abordado pelo autor diz respeito ao papel da saliva na adesão das bactérias envolvidas no início da formação da placa. As bactérias se aderem a receptores específicos presentes nas proteínas salivares adsorvidas sobre o dente, ou seja, na película adquirida; como a composição salivar varia muito entre indivíduos e no mesmo indivíduo em diferentes locais, existe um potencial de que essas diferenças

afetem a formação da película e conseqüentemente a adesão inicial das bactérias e a natureza da placa formada.

MARSH[75] e BOWDEN[8] (1995) discorreram sobre o papel da microbiologia nos modelos de cárie. O primeiro autor disse que a placa é um biofilme de composição diversa e o seu significado microbiológico está começando a ser desvendado. Com relação aos estudos *in situ*, não se pode afirmar que os resultados obtidos em um local sejam idênticos a outros locais, porque existem diferenças inerentes, por exemplo, com relação ao fluxo salivar, lavagem da saliva e profundidade e composição microbiológica da placa. Portanto os modelos *in situ* devem promover o desenvolvimento de placa com composição similar àquelas formadas em superfícies naturais. Quando se utiliza a cobertura por uma tela, a placa bacteriana formada não se assemelha à placa natural nem em estrutura nem em composição; os *S. salivarius* são os estreptococos predominantes nessas placas. De qualquer maneira a resposta da placa dos modelos *in situ* em termos de produção de ácidos e posterior elevação do pH é similar ao visto na placa natural, mas os modelos onde a placa é formada em uma superfície não protegida assemelham-se mais ao que ocorre nos dentes naturais. Para BOWDEN[8] os modelos *in situ* de estudo dos fatores envolvidos no desenvolvimento da cárie têm contribuído muito para o entendimento da microbiologia da placa. A individualidade dos voluntários tem intrigado os bacteriologistas na exploração do processo da cárie *in situ*, principalmente o achado de que a desmineralização inicial do esmalte pode ocorrer na ausência de níveis detectáveis de estreptococos mutans e lactobacilos. Para ele, a utilização de uma banda ou tela para promover o acúmulo de placa gera uma pressão de seleção muito forte, levando à formação de uma placa com menor diversidade. Entretanto pode-se argumentar que esse habitat protegido apenas acelera o processo da colonização e sucessão bacterianas naturais.

Preocupados com a infecção cruzada que os estudos *in situ* utilizando substrato humano ou bovino podem promover, AMAECHI; HIGHAM; EDGAR[2], 1998, publicaram um artigo avaliando 4 métodos de esterilização (autoclave, radiação gama, hipoclorito de sódio e povidine-iodine) de blocos de incisivos bovinos. Após a extração, os dentes foram armazenados em solução de timol a 0,1%. A contagem de microorganismos remanescentes após a esterilização indicou crescimento, apenas no grupo controle, de *S. aureus* e bacilos. Após a esterilização, os blocos foram desmineralizados *in vitro* e a perda mineral e a profundidade da lesão foram avaliadas através de microrradiografia. Houve diferença numérica entre a lesão de cárie artificial criada nos dentes esterilizados por diferentes métodos, que não foi estatisticamente significante quando comparada ao grupo controle. Entre os germes presentes nos blocos controle estavam microorganismos comensais da

mão e pele, ao contrário de *S. mutans*, *S. sanguis* e outros que são cultivados de dentes imediatamente após a extração. Isto sugere que a imersão em solução de timol a 0,1% foi suficiente para evitar a infecção cruzada, não sendo necessário nenhum outro método de esterilização, desde que os blocos de esmalte sejam manipulados assepticamente.

FUSHIDA; CURY[37] testaram em 1999 o efeito da freqüência de ingestão do refrigerante Coca-Cola na erosão do esmalte e dentina *in situ*. Nove voluntários utilizaram um dispositivo intrabucal palatino contendo 4 blocos de esmalte e 4 blocos de dentina bovinos e ingeriram 1, 2, 4 ou 8 copos de Coca-Cola durante o dia, sendo os blocos removidos e a microdureza determinada logo após a última ingestão. Todas as freqüências de ingestão do refrigerante levaram à perda de dureza superficial significante no esmalte e dentina quando comparada aos valores iniciais, causada pela erosão do esmalte. Quanto maior a freqüência de ingestão da Coca-Cola, maior a perda de dureza; um copo causou perda de aproximadamente 19% da dureza do esmalte, que chegou a 28% quando 8 copos foram utilizados. Após 24 horas de exposição à saliva, os blocos recuperaram parte da dureza perdida.

3. PROPOSIÇÃO

3. PROPOSIÇÃO

Buscando investigar a desmineralização do esmalte provocada por períodos relativamente curtos de acúmulo de placa bacteriana e tendo em vista as divergências existentes na literatura com relação às características salivares e microbiológicas individuais relacionadas ao desenvolvimento de cárie, principalmente a respeito do papel desses fatores na desmineralização do esmalte *in situ*, este estudo visou:

- Avaliar o tempo mínimo necessário para que a placa bacteriana formada sobre blocos de esmalte bovino hígidos *in situ*, na presença de sacarose, se torne cariogênica;
- Investigar a possível interferência do fluxo salivar, capacidade tampão da saliva e níveis salivares de estreptococos mutans na desmineralização do esmalte *in situ*;
- Investigar a relação entre desmineralização dos blocos de esmalte *in situ* e a presença e porcentagem de estreptococos mutans na placa bacteriana formada sobre os blocos.

4. Material e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Delineamento experimental

Com o intuito de facilitar a apresentação da metodologia envolvida no experimento, um fluxograma está esquematizado na Figura 1.

4.2. Preparo dos blocos de esmalte

4.2.1. Obtenção dos dentes bovinos

Foram preparados aproximadamente 250 dentes incisivos bovinos extraídos de gado da raça nelore com idade média de 36 meses, abatido para consumo no Frigorífico Vangelio Mondelli Ltda., em Bauru, SP. Os incisivos foram esterilizados em solução de formol a 2%, pH 7,0[6, 21, 22, 109], preparada com tampão fosfato, onde ficaram imersos durante todo o período de preparo dos blocos de esmalte. A solução foi trocada periodicamente e o período mínimo de imersão dos dentes foi de 30 dias.

4.2.2. Obtenção dos blocos de esmalte

Os dentes foram seccionados na porção cervical, separando coroa e raiz (Figura 2a), em um torno de polimento odontológico adaptado para corte (Fábrica Nacional de Motores Monofásicos Nevoni, São Paulo, SP), com disco diamantado Diaflex-F (Wilcos do Brasil, Ind. e Com. Ltda., Petrópolis, RJ). As coroas foram fixadas na sua face distal com cera pegajosa Kota (Kota Ind. e Com. Ltda., São Paulo, SP) em placas de acrílico cristal de 40 mm X 40 mm X 5 mm (Figura 2b) e seccionadas no sentido mésio-distal, separando-se a face vestibular da lingual, com disco diamantado dupla face - XL 12205, “High concentration”, 102 mm X 0,3 mm X 12,7 mm (Extec Corp., Enfield, CT, USA), acoplado a um aparelho de corte de precisão Labcut 1010 (Extec Corp.), com velocidade de 300 rpm e refrigeração a água deionizada (Figura 2c). As faces vestibulares foram fixadas com cera pegajosa nas mesmas placas de acrílico. Do centro da face vestibular foram obtidos 1 a 2 blocos de esmalte com dimensões de 4 X 4 mm, através do uso de dois discos diamantados dupla face (Extec Corp.), no aparelho de corte, com um espaçador de 4 mm entre eles (Figuras 2d e 2e). Os blocos com esmalte trincado ou manchado foram desprezados. No total foram confeccionados 286 blocos.

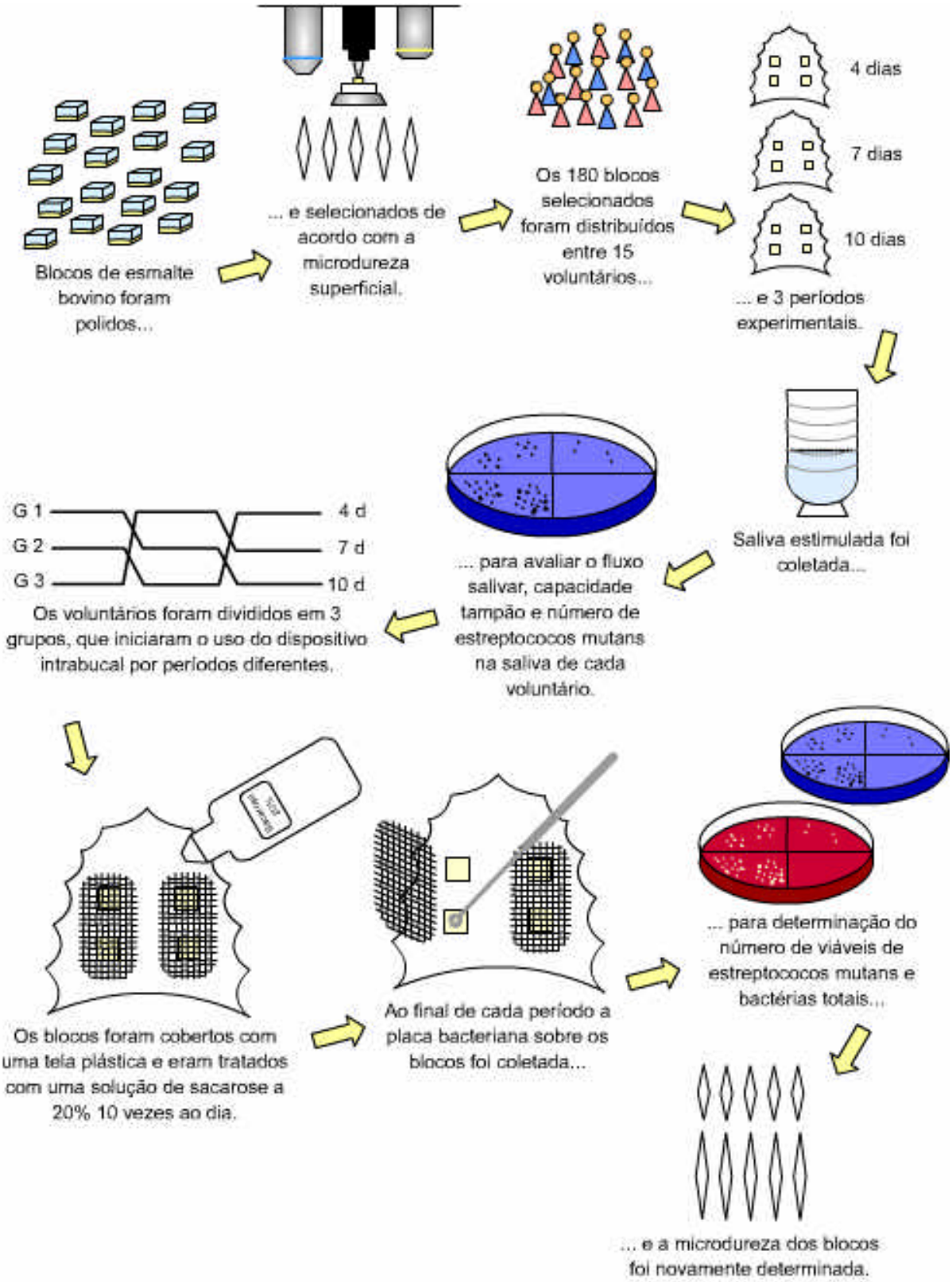

FIGURA 1: Fluxograma do experimento

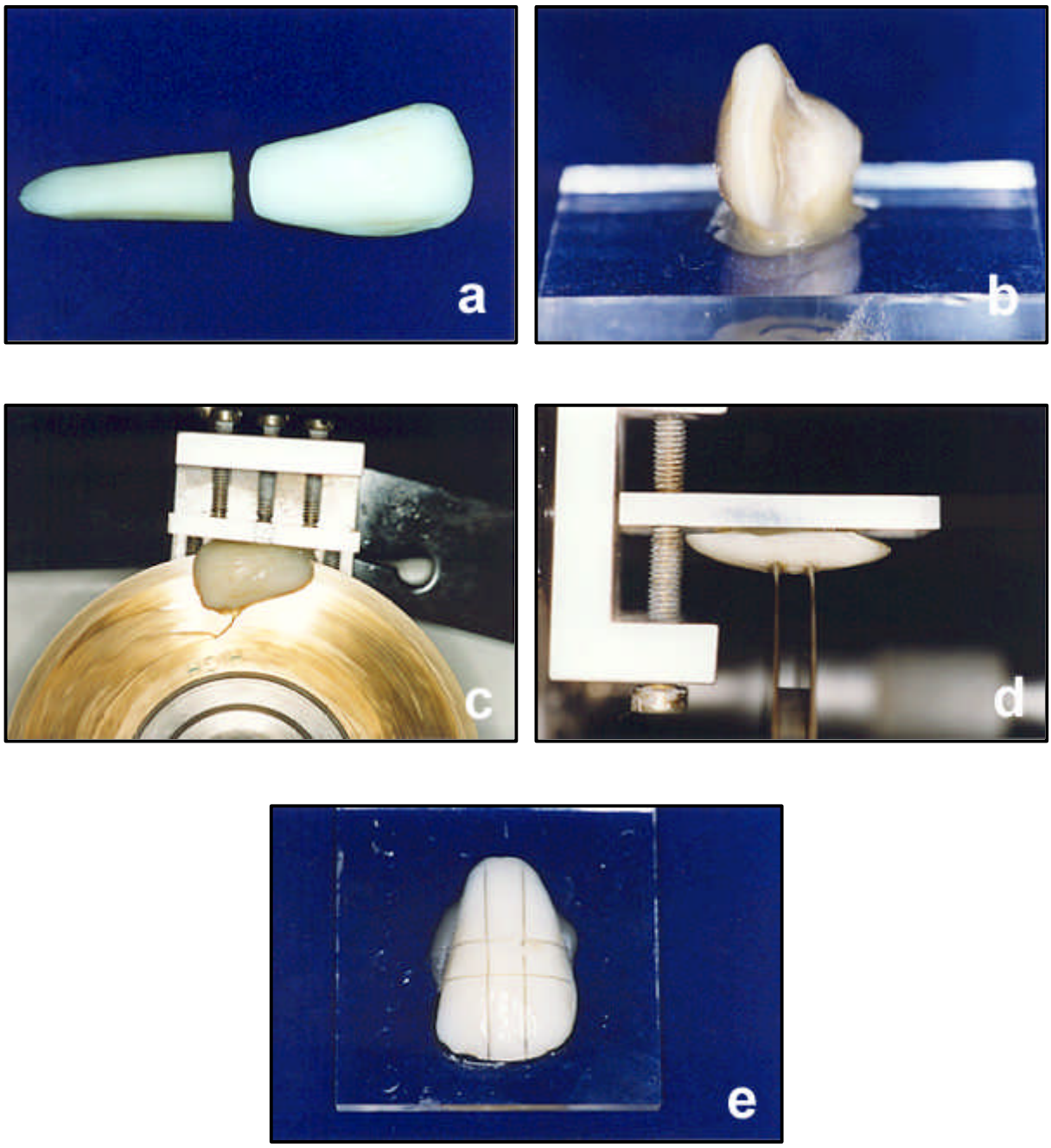

FIGURA 2 - (a) Incisivo bovino após a separação da coroa e raiz. (b) Coroa fixada em placa de acrílico com cera pegajosa. (c) Corte no sentido mésio-distal para separação da face vestibular. (d) Corte da face vestibular com dois discos diamantados e espaçador de 4 mm para obtenção dos blocos. (e) Face vestibular após os cortes para a obtenção de um bloco de esmalte do seu centro.

4.2.3. Desgaste e polimento dos blocos de esmalte

Cada bloco foi fixado com cera pegajosa no centro de um disco de acrílico cristal de 30 mm de diâmetro por 8 mm de espessura, com a maior área plana do esmalte voltada para baixo (Figura 3a). A dentina foi planificada numa politriz metalográfica (APL 4, Arotec, Cotia, SP), com um sistema de suporte que permite que o desgaste seja paralelo à base do disco de acrílico (Figura 3b). Foi utilizada uma lixa de silicone carbide de granulação 320 (Extec Corp.), com refrigeração a água, até que os blocos ficassem com espessura de 2 mm. Para tanto, a politriz foi acionada em baixa velocidade, com 2 pesos padrão de 86 g, durante 30 segundos a 7 minutos, até se alcançar a espessura de 2 mm.

A seguir, os blocos de esmalte foram removidos dos discos de acrílico e estes foram limpos com xilol (Pharmácia Specifica Manipulação de Fórmulas, Bauru, SP), para remover todo o resíduo de cera. Os blocos foram novamente fixados nos discos de acrílico com o esmalte voltado para cima, onde foi feito um desgaste e polimento para obter uma superfície plana, paralela à base do acrílico e polida (Figura 3a), indispensável para a realização dos ensaios de microdureza. Inicialmente, o esmalte foi desgastado na politriz com uma lixa de silicone carbide de granulação 600 - ref. 15007 (Extec Corp.), com refrigeração a água, durante 1 minuto, com 2 pesos, em velocidade baixa. Este desgaste teve o objetivo de planificar uma determinada área da superfície de esmalte do bloco, para permitir a aferição da microdureza naquela área. Em seguida, iniciou-se polimento do esmalte, com lixa de silicone carbide de granulação 1200 - ref. 30-5538-012-100 (Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, USA), com refrigeração a água, durante 2 minutos e 30 segundos, com 2 pesos, em velocidade alta, após o qual já pôde-se observar que a superfície se apresentava com aspecto vítreo. Para finalizar o polimento, foi utilizado um pano - ref. 40-7218 (Buehler) umedecido com uma suspensão de diamante de 1 µm - ref. 40-6530 (Buehler), durante 3 minutos, com 2 pesos, em velocidade alta (Figura 3c).

Entre cada desgaste, os espécimens foram lavados em ultra-som T7 Thornton (Unique Ind. e Com. de Produtos Eletrônicos Ltda., São Paulo, SP), com freqüência de 40 KHz, durante 2 minutos, com água destilada deionizada, a fim de impedir que os grãos da lixa anterior contaminassem a lixa seguinte, prejudicando sua ação de polimento. A seguir, cada bloco foi lavado com um jato de água destilada deionizada. Ao final do polimento, foi utilizada no ultra-som uma solução detergente - ref. 75-5000-032 (Buehler), diluída em 20 partes de água destilada deionizada. Para remover a solução detergente, os blocos ficaram imersos por 3 a 5 minutos em água destilada deionizada corrente.

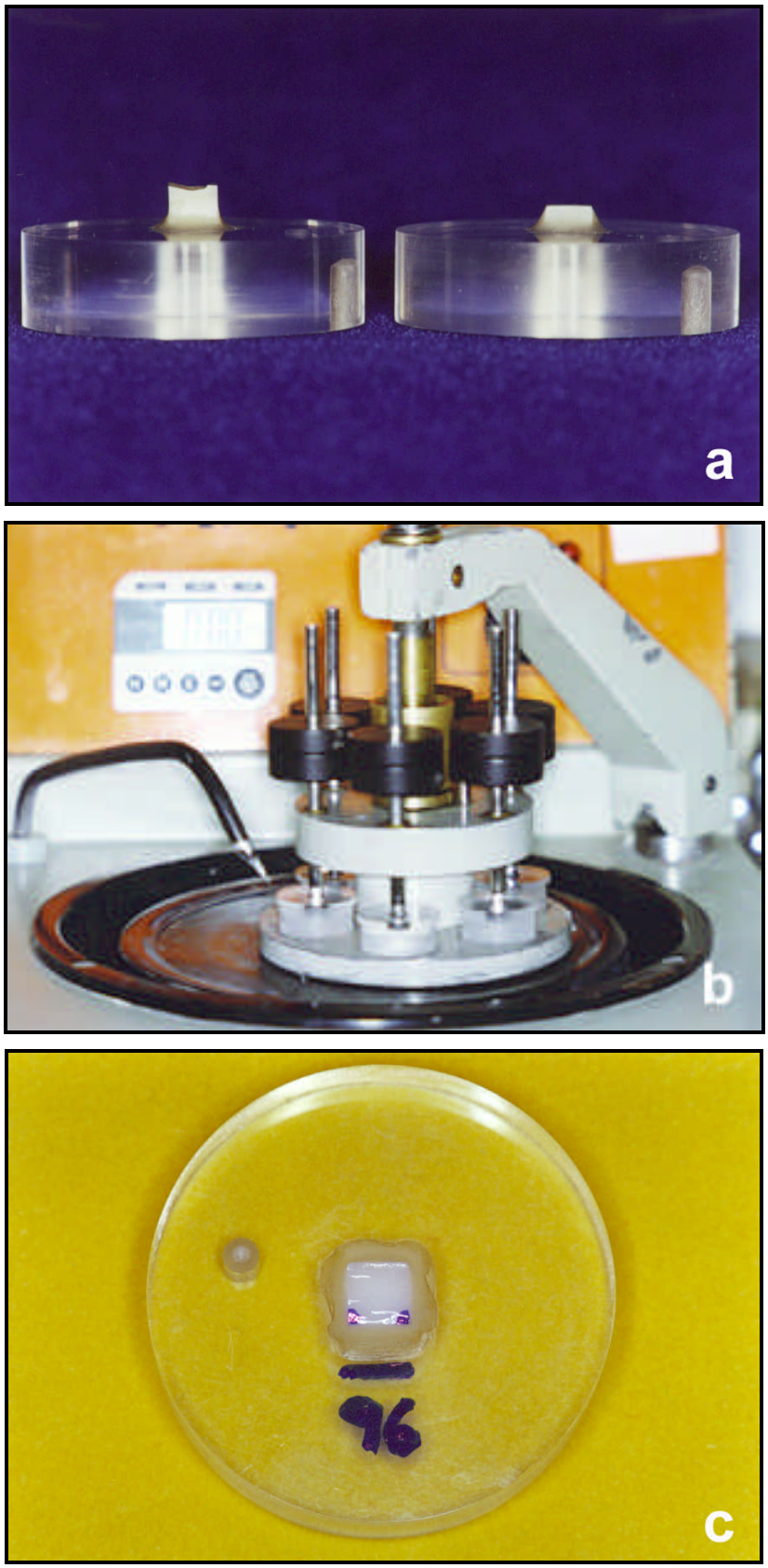

FIGURA 3 - (a) Blocos colados no disco de acrílico, com a dentina voltada para cima e após o polimento do esmalte. (b) Desgaste e polimento dos blocos de esmalte na politriz. (c) Bloco 96 após o polimento do esmalte.

A partir do início dos procedimentos de desgaste e polimento, os blocos passaram a ser guardados em refrigerador a 4 ^{o}C. Durante este período e até o final do experimento, os blocos foram armazenados fixados nos discos de acrílico em recipientes plásticos com tampa, separados por folhas de papel absorvente Softy's (Melhoramentos, São Paulo, SP) encharcadas com água deionizada.

4.2.4. Avaliação da microdureza superficial inicial e seleção dos blocos de esmalte

A microdureza superficial inicial do esmalte foi avaliada utilizando-se um microdurômetro Future-Tech FM (Future-Tech Corp., Tóquio, Japão) acoplado a um software FM-ARS (Future-Tech Corp.) (Figuras 4a e 4b). Foram feitas 5 indentações paralelas com 100 µm de distância entre cada uma, com penetrador tipo Knoop, carga estática de 50 g por 5 segundos. A área escolhida para a realização das indentações estava no mínimo a 1000 µm da lateral do bloco, não apresentava riscos ou trincas e permitia a realização de outras 5 indentações a 100 µm de distância das primeiras.

O comprimento da diagonal maior das indentações foi medido utilizando-se o software FM-ARS. A média do comprimento da diagonal maior das cinco indentações foi utilizada para excluir os blocos com microdureza fora do padrão. Foram desprezados 20 blocos com média do comprimento da indentação com valor 10% acima ou 10% abaixo da média de todos os blocos e aqueles com desvio-padrão do comprimento das indentações acima de 10% do valor da sua própria média. Outros 16 blocos foram descartados por apresentarem trincas ou por não estarem totalmente paralelos após o polimento. Cerca de 70 blocos foram utilizados no estudo piloto e 180 foram selecionados para a realização do experimento.

A microdureza Knoop inicial dos 180 blocos foi calculada utilizando-se a seguinte fórmula:

$$KHN = \frac{C \times carga}{d^2}$$

onde: KHN = número de dureza Knoop
C = 14.230
carga = 50
d = diagonal maior da indentação

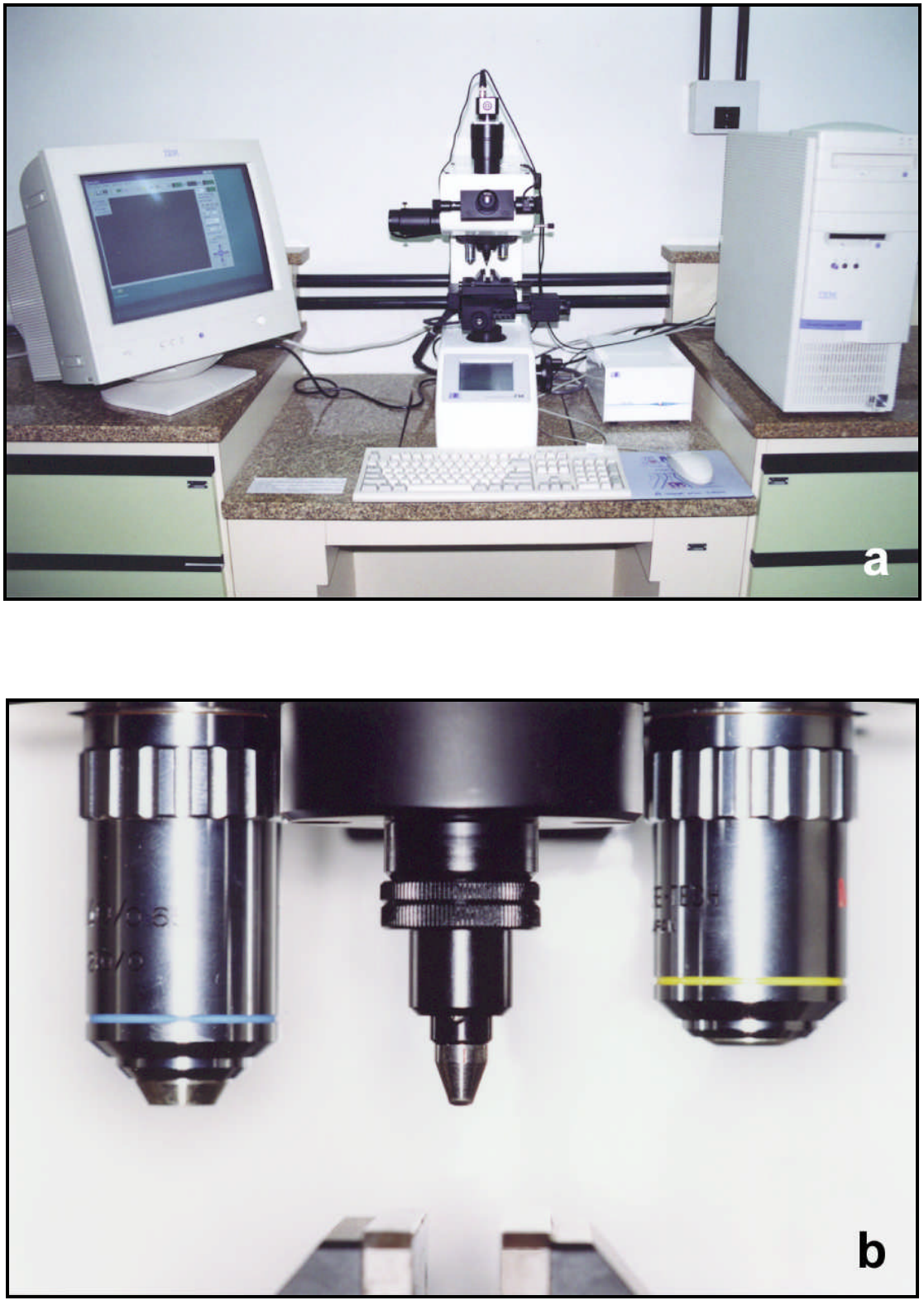

FIGURA 4 - (a) Microdurômetro Future-Tech FM. (b) Indentador e lentes do microdurômetro.

4.3. Seleção dos voluntários

Quinze voluntários adultos jovens (9 do sexo feminino e 6 do sexo masculino), com idade entre 19 e 28 anos (média de 21,6) foram selecionados para participar da pesquisa. Quatorze eram alunos do segundo ou quarto ano do Curso de Odontologia da Universidade Estadual de Maringá, PR, cidade onde foi realizada a pesquisa e um era funcionário do referido curso. Foram excluídos da amostra os voluntários[33, 112]: a) fumantes; b) que haviam utilizado antibiótico nos últimos 2 meses antes do início da pesquisa; c) que tomavam medicamentos que afetam o fluxo salivar. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Bauru - USP (Anexo 1). Os voluntários selecionados tomaram ciência do experimento através da "Carta de informação ao voluntário" (Anexo 2) e assinaram um "Termo de consentimento livre e esclarecido" (Anexo 3).

4.4. Avaliação do fluxo salivar estimulado

Os voluntários mastigaram um pedaço de aproximadamente 1 cm de um tubo de látex, número 203 (Auriflex, São Roque, SP), previamente esterilizado, para estimular a produção de saliva. A saliva produzida durante os primeiros 30 segundos foi deglutida, sendo subseqüentemente coletada por 5 minutos em um béquer de 100 mL esterilizado. Os voluntários foram instruídos a movimentar o tubo de látex na cavidade bucal, de forma que todos os dentes fossem usados na mastigação, pois a saliva estimulada seria utilizada também para contagem do número de estreptococos do grupo mutans.

A saliva coletada no béquer foi assepticamente transferida com o auxílio de pipetas de 10 mL para um tubo de ensaio 16 X 150 mm esterilizado, registrando-se o volume transferido. O fluxo salivar estimulado foi expresso em mililitros por minuto (mL/min).

Todas as coletas de saliva foram realizadas ao final da tarde, com exceção do voluntário 10, que teve a saliva coletada pela manhã.

4.5. Avaliação da capacidade tampão da saliva estimulada

4.5.1. Preparo da solução de ácido clorídrico a 0,005 N

A solução de ácido clorídrico (HCl) a 0,005 N foi preparada a partir de uma solução de ácido clorídrico concentrada (37%) p.a. (Merck, Darmstadt, Alemanha) recém aberta. A normalidade foi aferida por titulação com solução de carbonato de sódio 0,005 N. A solução de HCl 0,005 N foi armazenada em refrigerador a 4 ^{o}C, tendo sido utilizada num prazo máximo de 4 dias após o preparo.

4.5.2. Realização do teste

Volumes de 1 mL da saliva estimulada foram assepticamente transferidos com o auxílio de pipeta de 1 mL para, respectivamente, 3 tubos de ensaio 16 X 150 mm com tampa de rosca contendo 3 mL da solução de ácido clorídrico 0,005 N.

A mistura de saliva e solução de ácido clorídrico foi homogeneizada, invertendo-se os tubos por 5 vezes. A tampa dos tubos foi removida para a eliminação do gás carbônico e o pH foi aferido após 2 a 5 minutos[107], utilizando-se um pHmetro - DMPH-2 (Digimed Instrumentação Analítica Ltda., São Paulo, SP).

4.6. Contagem de estreptococos mutans na saliva estimulada

4.6.1. Meio de cultura

O meio de cultura utilizado para a contagem de estreptococos mutans foi o ágar mitis salivarius bacitracina (MSB)[38]. Ele foi preparado a partir do meio base ágar mitis salivarius (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA), suplementado com 15% de sacarose e 0,001% de telurito de potássio e adicionado de bacitracina na concentração de 0,2 U/mL. O meio foi preparado utilizando-se o seguinte procedimento: **(a)** Uma solução de telurito de potássio a 1% foi preparada pela adição de 0,1 g de telurito de potássio (BDH Limited, Poole, Inglaterra) a 10 mL de água destilada. A solução foi autoclavada a 121 ^{o}C por 15 minutos e armazenada em refrigerador a 4 ^{o}C; **(b)** Uma solução de bacitracina contendo 30 U/mL foi preparada pela adição de 2,7 mg de bacitracina 67 U/mg (Byk Química e Farmacêutica Ltda., São Paulo, SP) a 6 mL de água destilada resfriada. A solução foi esterilizada por filtração em membrana Millipore (Millipore Ind. e Com. Ltda., São Paulo, SP), sendo utilizada

logo após o preparo. **(c)** Para o preparo de 300 mL de meio, 27 g de ágar mitis salivarius (Difco Laboratories) (fórmula para 1000 mL: Tryptose, 10 g; proteose peptona número 3, 5 g; proteose peptona, 5 g; dextrose, 1 g; sacarose, 50 g; fosfato di-potássico, 4 g; azul de tripan, 0,075 g; cristal violeta, 0,008 g; ágar-ágar, 15 g) e 45 g de sacarose (Labsynth Produtos para Laboratório, Diadema, SP) foram adicionados em um erlenmeyer de 500 mL contendo 300 mL de água destilada. O meio foi deixado em repouso à temperatura ambiente por 15 minutos para encharcar o ágar, sendo posteriormente dissolvido em placa aquecedora magnética Corning, mod. PC-320 (Corning Brasil, São Paulo, SP) sob agitação constante, até a ebulição. O meio foi autoclavado a 121 ^{o}C por 15 minutos e em seguida resfriado em banho-maria a 45-50 ^{o}C. Assepticamente, 0,3 mL da solução de telurito de potássio a 1% e 2 mL da solução de bacitracina contendo 30 U/mL foram adicionados ao meio. O meio foi distribuído assepticamente em volumes de 15 a 20 mL para placas de petri descartáveis 90 X 15 mm (Inlab, Diadema, SP). Após a solidificação, as placas foram incubadas em estufa, a 37 ^{o}C, durante 24 horas para fazer o controle de esterilidade. O meio de cultura foi armazenado em refrigerador a 4 ^{o}C, acondicionado em papel filme e utilizado até 7 dias após o preparo.

4.6.2. Diluição da saliva estimulada, semeadura e incubação

A saliva foi homogeneizada em agitador de tubos do tipo " mixer" Thermolyne, modelo M63215 (Barnsted/Thermolyne Co., Dubuque, IA, USA), durante 30 segundos. A seguir foram preparadas diluições decimais seriadas (10^{-1} a 10^{-3}) misturando-se 0,2 mL de saliva com 1,8 mL de solução salina esterilizada. A determinação do número de viáveis de estreptococos do grupo mutans foi realizada pelo método da contagem na gota[77] modificado, semeando-se em duplicata, com o auxílio de uma pipeta de 0,2 mL, volumes de 0,02 mL das diluições 10^{-1}, 10^{-2} e 10^{-3} na placa de petri contendo ágar mitis salivarius bacitracina. As placas semeadas foram incubadas em estufa a 37 ^{o}C, durante 48 horas, em jarras com atmosfera de microaerofilia obtida pelo método da vela[39].

4.6.3. Contagem das colônias

A contagem das colônias foi feita com o auxílio de microscópio estereoscópico (Carl Zeiss do Brasil, São Paulo, SP). Sempre que possível, foram selecionadas para a contagem as gotas das diluições com 6 a 60 unidades formadoras de colônia (UFC). Os dados foram convertidos em UFC/mL de saliva, multiplicando-se o número de colônias encontradas por 50 (correção para 1 mL) e pela recíproca da diluição. Os dados foram transformados em $\log_{10}$ para realização da análise estatística.

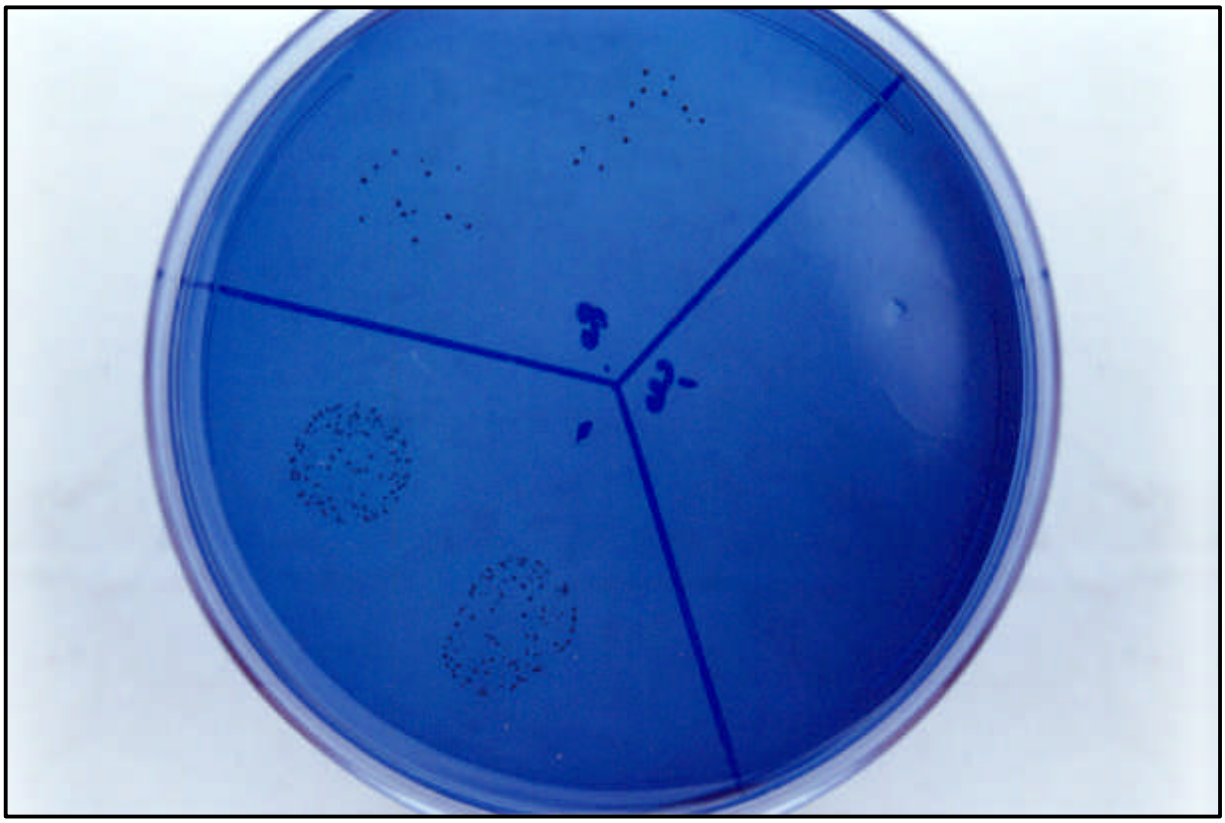

FIGURA 5 - Crescimento de colônias de estreptococos mutans no ágar mitis salivarius bacitracina

4.7. Preparo do dispositivo intrabucal palatino

Moldes da arcada superior dos voluntários foram obtidos com alginato (Ezact Kromm, Vigodent, Rio de Janeiro, RJ) e vazados em gesso pedra (Duranit, Chaves S.A. Mineração e Indústria, Fortaleza, CE). Os dispositivos intrabucais palatinos foram confeccionados em resina acrílica (Jet, Artigos Odontológicos Clássico, São Paulo, SP). Cada dispositivo continha quatro cavidades de 4 X 4 X 3 mm, sendo duas de cada lado, que serviram para a fixação dos blocos de esmalte bovino. Os dispositivos foram polidos quimicamente, pela imersão, por alguns segundos, em monômero de resina acrílica aquecido.

A distribuição dos blocos entre os voluntários foi feita de forma que em todos os grupos (4, 7 e 10 dias) e voluntários houvessem blocos com microdureza mais alta e mais baixa. Para isso, os 180 blocos foram ordenados no sentido crescente de microdureza e 60 sorteios aleatórios foram realizados para separar os três grupos experimentais; posteriormente, os grupos foram ordenados no sentido crescente de microdureza e 12 sorteios aleatórios dos voluntários foram realizados. No total, para cada voluntário foram destinados 12 blocos, 4 para cada período experimental.

Os 4 blocos de esmalte de cada período foram fixados no dispositivo intrabucal com cera pegajosa Kota, sendo cuidadosamente adaptados, evitando-se fendas laterais entre o blocos e a cavidade que possibilitassem o acúmulo de placa bacteriana em locais indesejados. Como os blocos possuíam 4 X 4 X 2 mm, foram posicionados 1 mm abaixo da superfície da resina.

Para permitir o acúmulo de placa bacteriana volumosa sobre os blocos de esmalte, uma tela de polietileno (peneira grande, ref. 0041, Plásticos Gonçalves Ltda., São Paulo, SP) foi recortada e colada no acrílico com resina acrílica, cobrindo os blocos (Figura 6a).

4.8. Procedimentos intrabucais

No mínimo dez dias antes e durante o experimento, os voluntários utilizaram dentifrício não fluoretado à base de sílica (Pharmácia Specifica Manipulação de Fórmulas, Bauru, SP), mas beberam água de abastecimento fluoretada.

Os 15 voluntários foram divididos em 3 grupos. Cada um dos grupos iniciou o uso do dispositivo intrabucal por um determinado período de tempo (4, 7 ou 10 dias). Após um intervalo de no mínimo 4 dias, cada grupo passava a utilizar o dispositivo novamente, agora por um novo período de tempo, sempre seguindo o sentido 4 – 7 – 10 dias.

Cada voluntário recebeu uma lista de instruções (Anexo 4), uma pisseta contendo água deionizada, um estojo plástico (Dental Morelli Ltda., Sorocaba, SP) para guardar o dispositivo intrabucal, uma bisnaga de dentifrício e porções de algodão - Topz (Nature's Plus Farmacêutica Ltda., Hortolândia, SP). A água deionizada e o dentifrício eram repostos quando necessário.

Nos dias em que estavam utilizando o dispositivo intrabucal, os voluntários foram orientados a realizar a higiene bucal normalmente e utilizar o dispositivo continuamente, exceto quando fosse ingerir algum alimento ou bebida. Neste período o dispositivo deveria ser mantido no estojo plástico, envolto por algodão umedecido em água deionizada. Os voluntários foram orientados a higienizar o dispositivo com o dentifrício não fluoretado e água deionizada, evitando-se escovar a área que continha os blocos.

Para promover a formação de placa bacteriana cariogênica sobre os blocos, os voluntários adicionavam, a cada 1 hora e 30 minutos, uma gota de uma solução de sacarose a 20%[21, 22] (Labsynth) sobre cada bloco de esmalte (Figura 6b). Após o gotejamento da sacarose, os dispositivos eram deixados por 5 minutos em repouso antes de retornarem à cavidade bucal, a fim de que a sacarose se difundisse pela placa. A primeira exposição à sacarose era realizada às 8 horas e a última às 21 horas e 30 minutos, totalizando 10 exposições por dia. A solução de sacarose a 20% era usada até 48 horas após o preparo, sendo posteriormente substituída.

Os voluntários receberam uma ficha para anotar os horários em que removeram o dispositivo da boca e os horários em que realizaram a adição da sacarose (Anexo 5).

Após a remoção do dispositivo, a tela plástica que cobria os blocos foi removida e a placa bacteriana presente sobre os blocos situados na posição 2 (posterior direita) e 3 (anterior esquerda) foi coletada para contagem de estreptococos do grupo mutans e microorganismos anaeróbios e facultativos totais. A coleta da placa foi feita com o auxílio de uma alça calibrada de plástico de 1 µL descartável e estéril (Inlab, Diadema, SP), tomando-se cuidado para não danificar os blocos de esmalte agora desmineralizados. O volume de placa coletado variou conforme o volume presente sobre o bloco. A placa foi coletada do centro do bloco, evitando-se aquela formada em contato com a resina acrílica. Todas as coletas foram realizadas ao final da manhã ou da tarde. Os blocos foram então cuidadosamente escovados com escova extramacia individual para cada voluntário (Kolynos Infantil, Kolynos do Brasil, São Bernardo do Campo, SP) e dentifrício não fluoretado, removidos do dispositivo intrabucal e colados nos seus respectivos discos de acrílico, a fim de serem analisados novamente quanto à microdureza.

Após a remoção dos blocos de esmalte, os dispositivos intrabucais ficaram por pelo menos uma noite dentro do seu recipiente plástico contendo hipoclorito de sódio diluído em

água, com concentração final de 1 a 2%, para desinfecção. Para que o dispositivo pudesse ser utilizado no próximo período experimental, ele foi lavado em água corrente por pelo menos uma hora e os restos da tela plástica e da resina que a fixava foram desgastados.

4.9. Contagem de estreptococos mutans na placa bacteriana

Como a quantidade de placa bacteriana coletada foi variável, o número de estreptococos do grupo mutans na placa foi estimado com base em sua porcentagem em relação às bactérias anaeróbias e facultativas, que representam a grande maioria dos microorganismos da placa e serão portanto chamadas, a partir desse ponto, de bactérias totais.

4.9.1. Preparo do meio ágar mitis salivarius bacitracina

O meio foi preparado conforme descrito anteriormente.

4.9.2. Preparo do meio ágar sangue brucella suplementado

O ágar sangue brucella suplementado foi preparado a partir do meio base ágar brucella (Difco Laboratories), suplementado com 0,0005% de hemina bovina (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA), 0,0001% de menadione (Sigma) e 5% de sangue desfibrinado de carneiro. O preparo do meio foi realizado da seguinte forma: **(a)** Uma solução de menadione a 0,1% foi preparada pela adição de 10 mg de menadione a 10 mL de etanol absoluto p.a. (Merck)[46, 93]. A solução foi armazenada em refrigerador a 4 ^{o}C. **(b)** Uma solução de hemina bovina a 0,5% foi preparada pela adição de 50 mg de hemina a 1 mL de uma solução de hidróxido de sódio a 1 N (Merck) e a 9 mL de água destilada[93]. A solução foi autoclavada a 121^{o}C por 15 minutos[46, 93] e armazenada em refrigerador a 4 ^{o}C. **(c)** 50 mL de sangue de carneiro foram coletados assepticamente em um erlenmeyer de 100 mL contendo pérolas de vidro, previamente esterilizado. Após o controle de esterilidade, o sangue foi armazenado em refrigerador a 4 ^{o}C. **(d)** Para o preparo de 300 mL de meio, 12,9 g de ágar brucella (Difco Laboratories) (fórmula para 1000 mL: Triptona, 10g; peptamina, 10g; glicose, 1g; extrato de levedura, 2g; cloreto de sódio, 5g; bissulfito de sódio, 0,1g; ágar, 15g) foram adicionados em um erlenmeyer de 500 mL contendo 300 mL de água destilada.

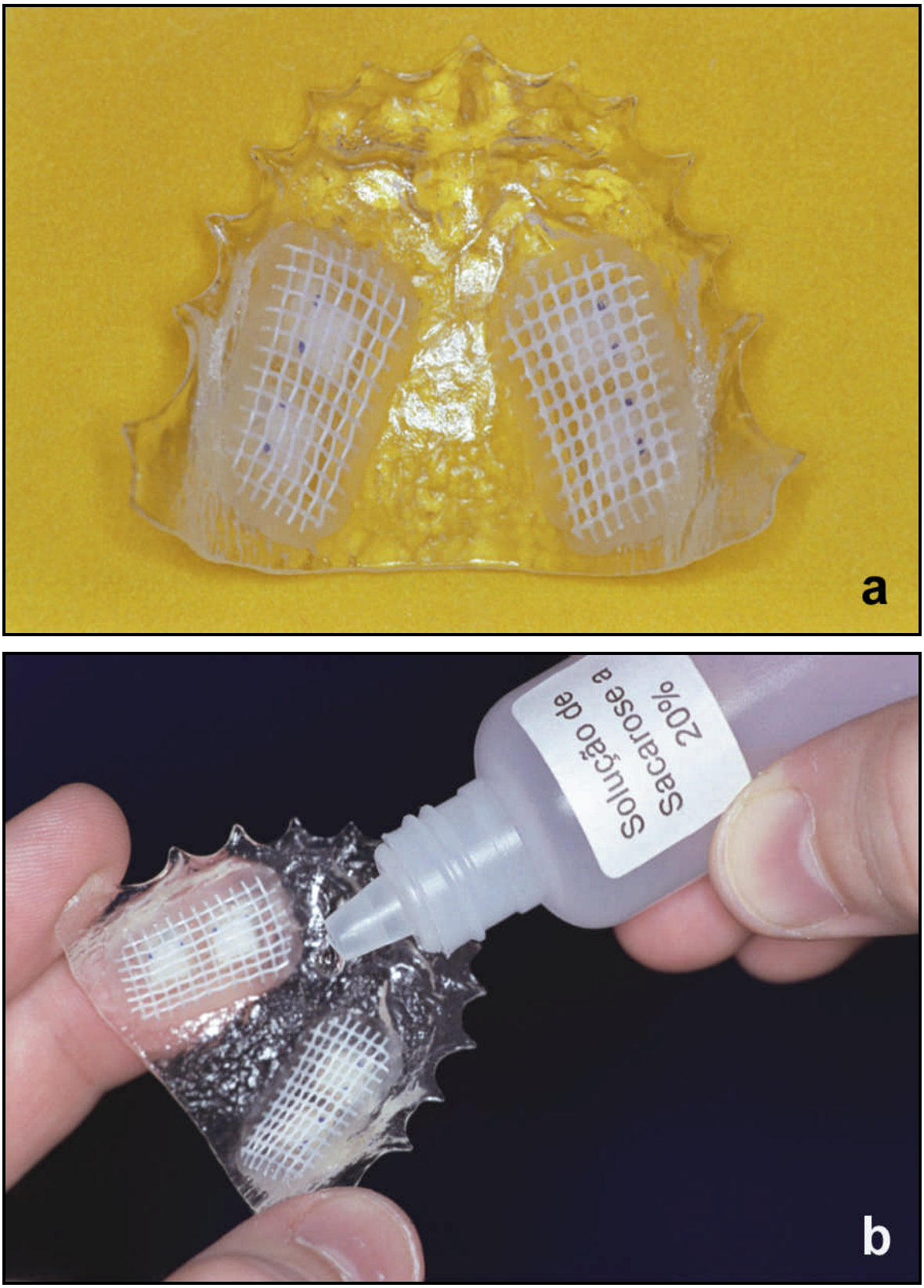

FIGURA 6 - (a) Dispositivo intrabucal utilizado, contendo 4 blocos de esmalte bovino cobertos por uma tela plástica. (b) Gotejamento da solução de sacarose a 20% sobre os blocos de esmalte.

O meio foi deixado em repouso à temperatura ambiente por 15 minutos para encharcar o ágar, sendo posteriormente dissolvido em placa aquecedora magnética (Corning), com agitação constante, até a ebulição. O meio foi removido da placa aquecedora e 0,3 mL da solução de menadione a 0,1% foi adicionado ao erlenmeyer[46]. A seguir, o meio foi autoclavado a 121 ^{o}C por 15 minutos e em seguida resfriado em banho-maria a 45-50 ^{o}C. Assepticamente, 0,3 mL da solução de hemina bovina a 0,5% e 15 mL de sangue de carneiro foram adicionados. O meio foi distribuído assepticamente em volumes de 15 a 20 mL em placas de petri descartáveis 90 X 15 mm (Inlab). Após a solidificação, as placas foram incubadas em estufa a 37 ^{o}C (Fanem), durante 24 horas, para fazer o controle de esterilidade. O meio de cultura foi armazenado acondicionado em papel filme, em refrigerador a 4 ^{o}C, sendo a maioria das placas utilizada em 48 a 72 horas.

4.9.3. Preparo da suspensão de placa bacteriana

A placa coletada dos blocos 2 e 3 foi suspensa em um frasco de vidro de 4 mL com tampa de rosca, contendo 2 mL de solução salina tamponada[7], pH 7,4, e 15 a 20 pérolas de vidro de 1 a 2 mm de diâmetro. A suspensão de placa foi agitada em agitador de tubos do tipo "mixer" (Thermolyne) por 30 segundos, para desagregar as células bacterianas (Figura 7a).

4.9.4. Diluição da suspensão de placa bacteriana

A partir da suspensão de placa bacteriana foram preparadas diluições decimais seriadas (10^{-1} a 10^{-6}) misturando-se 0,2 mL da suspensão de placa com 1,8 mL de solução salina tamponada esterilizada em um tubo de ensaio 13 X 100 mm. Entre cada diluição os tubos foram agitados em "mixer" (Thermolyne) por 20 a 30 segundos.

4.9.5. Semeadura e incubação

Para a determinação do número de estreptococos do grupo mutans, volumes de 0,02 mL das diluições 10^{0}, 10^{-1}, 10^{-2} e 10^{-3} foram semeados em duplicata na superfície de uma placa de petri, contendo o meio ágar mitis salivarius bacitracina. As placas foram incubadas na estufa a 37 ^{o}C, durante 48 horas, em atmosfera de microaerofilia obtida pelo método da vela[39].

Para a determinação do número de bactérias totais, volumes de 0,02 mL das

diluições 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5} e 10^{-6} foram semeadas em duplicata na superfície de uma placa de petri, contendo ágar sangue brucella suplementado (Figura 7b). As placas foram incubadas em estufa a 37 ^{o}C, em jarras de anaerobiose "GasPak" (Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, MD, USA), contendo os envelopes gerador de CO_2 e H_2 "BBL GasPak Plus" e indicador de anaerobiose (Becton Dickinson Microbiology Systems), por 72 a 96 horas.

As amostras de placa bacteriana foram semeadas em um tempo médio de 2 horas após a coleta.

4.9.6. Contagem das colônias

A contagem das colônias foi feita com o auxílio de microscópio estereoscópico (Carl Zeiss do Brasil). Sempre que possível, foram selecionadas, para a contagem, as gotas das diluições com 6 a 60 UFC.

A identificação das colônias de estreptococos mutans foi feita com o auxílio do microscópio estereoscópico e coloração de Gram. As colônias pretas, com 0,5 a 1,0 mm de diâmetro, convexas, com aspecto rugoso, com ou sem a presença de uma gota na superfície, constituídas por cocos gram positivos dispostos em cadeias foram consideradas como colônias típicas pertencentes aos estreptococos do grupo mutans (Figura 5). De cada tipo morfológico de colônia atípica presente em cada placa de MSB foi feito um esfregaço, corado pelo método de Gram, para observação das características morfotintoriais ao microscópio Olympus CBA (Micronal, São Paulo, SP), com objetiva de imersão. Na contagem de estreptococos mutans, foram consideradas as colônias típicas e aquelas que apresentavam crescimento misto de cocos gram positivos e bacilos gram negativos ou positivos. Nenhum método de identificação bioquímica foi utilizado na contagem dos estreptococos mutans.

Os dados foram convertidos em UFC/mL de suspensão de placa, multiplicando-se o número de colônias encontradas por 50 (correção para 1 mL) e pela recíproca da diluição. O número de estreptococos do grupo mutans presente na placa bacteriana foi expresso em porcentagem em relação ao número de bactérias totais.

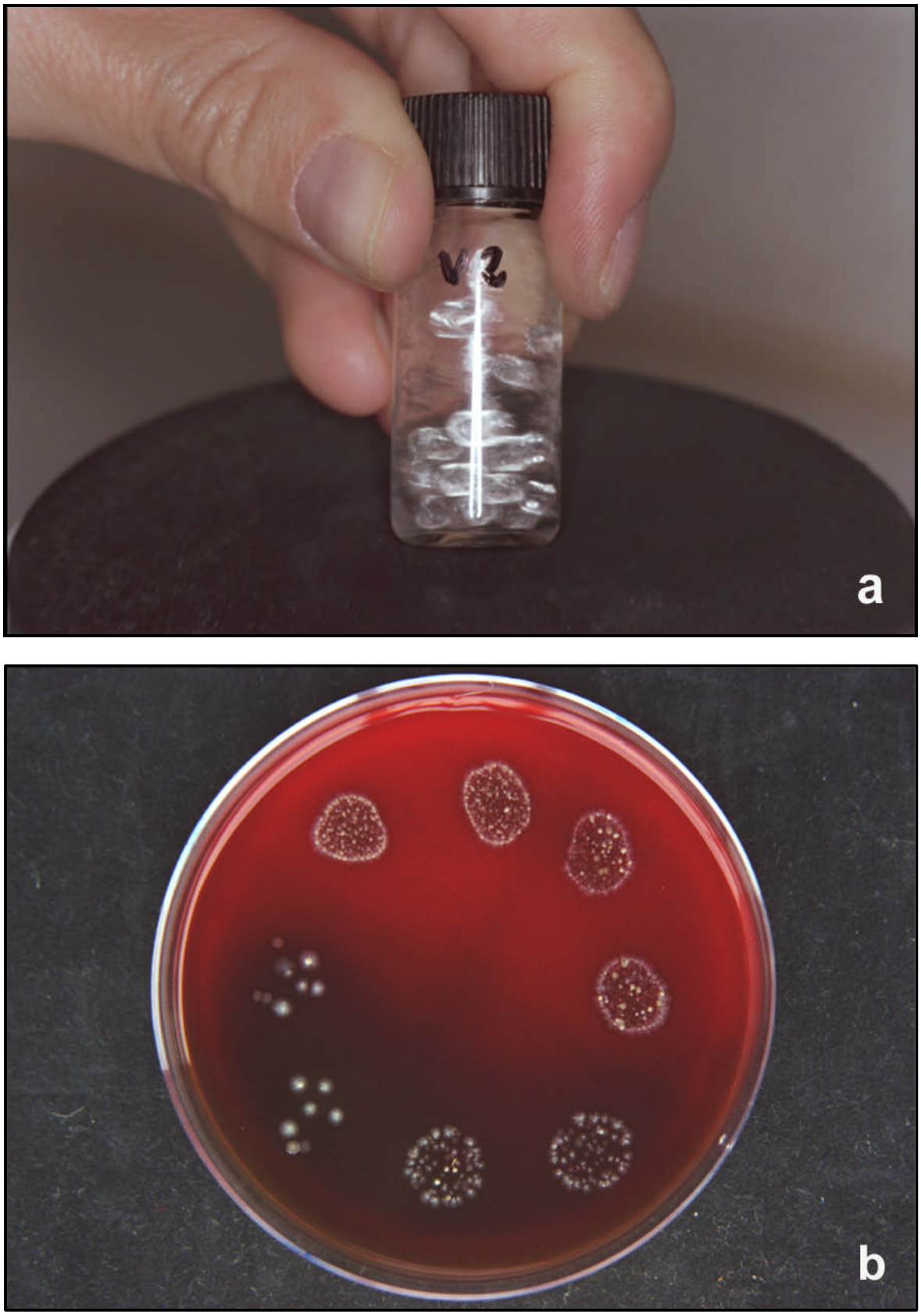

FIGURA 7 - (a) Agitação, em “mixer”, do frasco com pérolas contendo 2 mL de solução salina tamponada e a amostra de placa bacteriana. (b) Placa de ágar sangue após o crescimento das bactérias totais.

4.10. Análise da perda de dureza superficial do esmalte

A microdureza dos blocos desmineralizados *in situ* pelos períodos de 4, 7 e 10 dias foi avaliada pela realização de 5 indentações a 100 µm de distância das primeiras (Figura 8).

A porcentagem de perda de dureza superficial (%PDS) foi calculada com base na microdureza após o período de desmineralização e na microdureza inicial dos blocos, segundo a fórmula:

$$\%PDS = \frac{\text{dureza inicial} - \text{dureza após a desmineralização}}{\text{dureza inicial}} \times 100$$

4.11. Análise estatística dos dados

A comparação entre a microdureza inicial e final, nos três períodos estudados, foi realizada por meio do teste "t" pareado. A porcentagem de perda de dureza do esmalte, nos 3 períodos experimentais e nos 4 locais onde os blocos foram fixados no dispositivo intrabucal, foi comparada através de análise de variância a 2 critérios e teste de Tukey. A comparação entre os dados de fluxo salivar estimulado, capacidade tampão da saliva, níveis salivares de estreptococos mutans e porcentagem de perda de dureza superficial foi realizada através do coeficiente de correlação de Pearson. Como a porcentagem de estreptococos mutans na placa bacteriana não apresentou distribuição normal, as análises estatísticas envolvendo esses dados foram realizadas utilizando testes não paramétricos. Na análise da relação entre porcentagem de estreptococos mutans na placa bacteriana, porcentagem de perda de dureza superficial e níveis salivares de estreptococos mutans utilizou-se o coeficiente de correlação de Spearman. A comparação entre a porcentagem de perda de dureza dos voluntários que apresentaram estreptococos mutans em suas amostras de placa e daqueles que não apresentaram foi realizada através do teste de Mann-Whitney. O nível de significância mínimo de 5% foi adotado em todos os testes. O programa "Statistica for Windows", versão 5.1 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA) foi utilizado em todas as análises.

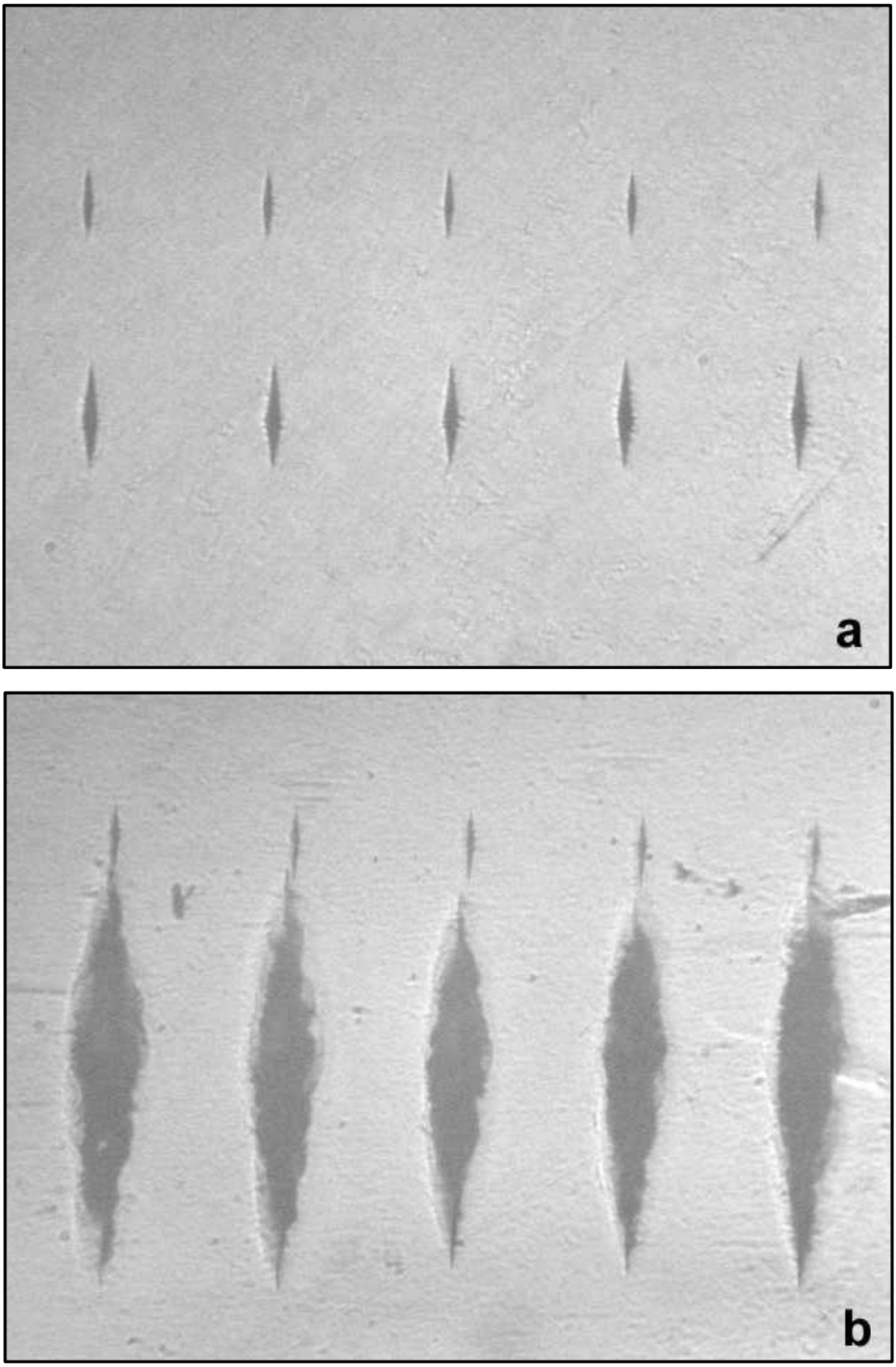

FIGURA 8 - (a) Indentações realizadas em bloco de esmalte antes e após a desmineralização *in situ* por 4 dias. (b) Bloco de esmalte que apresentou perda de dureza intensa após desmineralização *in situ* por 10 dias.

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

Os 15 voluntários selecionados participaram dos experimentos de avaliação do fluxo salivar, capacidade tampão da saliva e níveis salivares de estreptococos mutans. Na avaliação da desmineralização *in situ* e microbiologia da placa bacteriana, 2 voluntários foram excluídos: um deles teve uma infecção e precisou tomar antibióticos e o outro removeu o dispositivo intrabucal antes do final em dois períodos de desmineralização, ficando o número de voluntários reduzido a 13.

5.1. Fluxo salivar, capacidade tampão da saliva e níveis salivares de estreptococos mutans

Conforme mostrado na Tabela 1, o fluxo salivar dos 15 voluntários analisados variou de 0,74 a 2,80 mL/min, apresentando uma média de 1,60 mL/min. A capacidade tampão da saliva oscilou de 3,46 a 6,64, encontrando-se uma média de 5,14 (Tabela 1). Os níveis salivares de estreptococos mutans encontrados variaram de 500 a 230.000 UFC/mL de saliva (Tabela 1).

O coeficiente de correlação de Pearson (r) mostrou que não houve correlação estatisticamente significante entre os testes salivares e bacteriológicos. Os valores de r e de p foram de 0,48 e 0,07; -0,22 e 0,43; -0,36 e 0,19, para respectivamente, fluxo salivar e capacidade tampão da saliva; fluxo salivar e níveis salivares de estreptococos mutans; capacidade tampão da saliva e níveis salivares de estreptococos mutans.

TABELA 1 - Fluxo salivar[1], capacidade tampão da saliva[2] e níveis salivares de estreptococos do grupo mutans[3] dos 15 voluntários estudados

Voluntário	Fluxo salivar (mL/min)	Capac. tampão (pH)	mutans (UFC/mL)
1	1,44	5,60	500
2	1,00	5,22	23.000
3	2,80	6,42	38.000
4	1,62	4,80	65.000
5	0,90	3,46	30.000
6	0,74	5,10	190.000
7	1,58	3,52	230.000
8	1,52	4,40	33.000
9	1,66	4,42	18.000
10	0,90	4,46	88.000
11	2,04	4,87	33.000
12	1,64	6,18	210.000
13	2,12	6,29	4.000
14	2,54	5,69	12.000
15	1,46	6,64	10.000

[1] Saliva estimulada

[2] Média de 3 determinações

[3] Contagem em duplicata, realizada pela técnica da contagem na gota[77] modificada

5.2. Microdureza do esmalte

O número de dureza Knoop inicial e final de cada bloco de esmalte é apresentado nos Anexos 6, 7 e 8. A microdureza inicial e final apresentada pelos blocos de cada voluntário, nos três períodos estudados, é mostrada na Tabela 2. A microdureza final foi estatisticamente diferente da inicial nos três períodos, como mostra a tabela 3.

A porcentagem de perda de dureza superficial (%PDS) de cada voluntário nos três períodos experimentais é apresentada no Anexo 9. Em média, houve um aumento na %PDS com o aumento no tempo de acúmulo de placa bacteriana *in situ* (Figura 9).

A média da %PDS de cada voluntário também apresentou uma tendência de aumento, quanto maior o período de acúmulo de placa *in situ* (Figura 10). Entretanto, 7 dos 13 voluntários apresentaram %PDS negativa, que indica ausência de desmineralização, em um ou dois períodos de acúmulo de placa. Entre os 7 voluntários, 3 não apresentaram desmineralização com 4 dias, 5 não apresentaram desmineralização com 7 dias e 1 não apresentou desmineralização com 10 dias (dos 39 períodos de uso do dispositivo intrabucal, em 9 não ocorreu desmineralização que pudesse ser avaliada por meio da microdureza).

A %PDS foi muito semelhante entre os 4 locais em que os blocos de esmalte foram fixados, independentemente do período experimental avaliado. A %PDS também foi semelhante nos lados direito (locais 1 e 2) e esquerdo (locais 3 e 4) e nas regiões anterior (locais 1 e 3) e posterior (locais 2 e 4) do dispositivo (Figura 11). Como era esperado, a análise de variância a 2 critérios mostrou que não houve diferença estatisticamente significante entre os locais 1, 2, 3 e 4, com relação à perda de dureza. Da mesma maneira, não houve diferença estatisticamente significante entre a perda de dureza nos lados direito e esquerdo e nas regiões anterior e posterior. Entretanto, para o fator tempo, os períodos de 4, 7 e 10 dias diferiram entre si, sendo que a diferença na perda de dureza ocorrida nos períodos de 4 e 7 dias não atingiu níveis de significância, de acordo com o teste de Tukey (Tabelas 4 e 5).

TABELA 2 - Número de dureza Knoop inicial e final dos 4 blocos de esmalte nos 3 períodos experimentais para cada voluntário

Voluntário	4 dias		7 dias		10 dias	
	inicial	final	inicial	final	inicial	final
1	337,9 ± 20,2[1]	246,0 ± 51,2	345,3 ± 17,1	346,7 ± 49,7	345,8 ± 27,7	97,1 ± 40,8
2	343,5 ± 15,8	345,4 ± 5,3	334,8 ± 25,2	362,4 ± 17,3	342,7 ± 17,7	300,7 ± 21,7
3	340,6 ± 23,8	363,7 ± 37,8	346,5 ± 16,7	262,5 ± 69,1	340,9 ± 16,7	218,8 ± 34,2
4	342,5 ± 14,1	280,3 ± 32,7	334,1 ± 26,9	244,6 ± 27,7	335,0 ± 29,4	224,1 ± 49,5
5	339,1 ± 17,8	148,1 ± 71,1	335,7 ± 23,2	151,1 ± 99,7	337,9 ± 21,1	50,8 ± 51,0
6	342,3 ± 29,2	333,9 ± 31,6	337,8 ± 20,4	214,8 ± 74,3	344,8 ± 18,1	71,9 ± 71,7
7	341,8 ± 15,5	330,3 ± 46,8	344,5 ± 17,8	319,0 ± 76,2	342,3 ± 16,6	183,7 ± 60,9
8	343,1 ± 13,9	255,7 ± 77,6	341,2 ± 18,8	290,9 ± 39,9	335,0 ± 30,0	130,3 ± 126,8
9	341,5 ± 14,9	364,0 ± 13,1	340,6 ± 16,0	174,5 ± 70,7	345,3 ± 16,2	199,4 ± 108,7
10	342,9 ± 18,2	304,6 ± 49,4	349,7 ± 20,4	378,5 ± 23,1	343,3 ± 15,9	192,6 ± 65,0
14	339,7 ± 16,1	331,0 ± 37,1	345,1 ± 17,3	359,1 ± 24,1	339,8 ± 18,4	350,4 ± 53,1
12	338,4 ± 29,4	233,2 ± 89,8	337,3 ± 33,8	123,7 ± 92,2	345,1 ± 17,4	69,4 ± 62,8
13	335,4 ± 30,7	285,9 ± 37,1	339,4 ± 19,7	348,5 ± 43,6	336,9 ± 25,1	194,8 ± 107,7
Média ± D.P.	340,7 ± 2,4	294,0 ± 61,8	340,9 ± 5,0	275,1 ± 87,2	341,1 ± 3,9	175,7 ± 90,2

[1] Média de 4 blocos ± desvio padrão

TABELA 3 - Comparação, através do teste "t" pareado, entre a microdureza inicial e final nos três períodos estudados.

Período	**n[1]**	**t**	**p**
4 dias	13	2,765261	0,017112*
7 dias	13	2,801010	0,016014*
10 dias	13	6,559547	0,000027*

[1] Tamanho da amostra

* significante a 5%

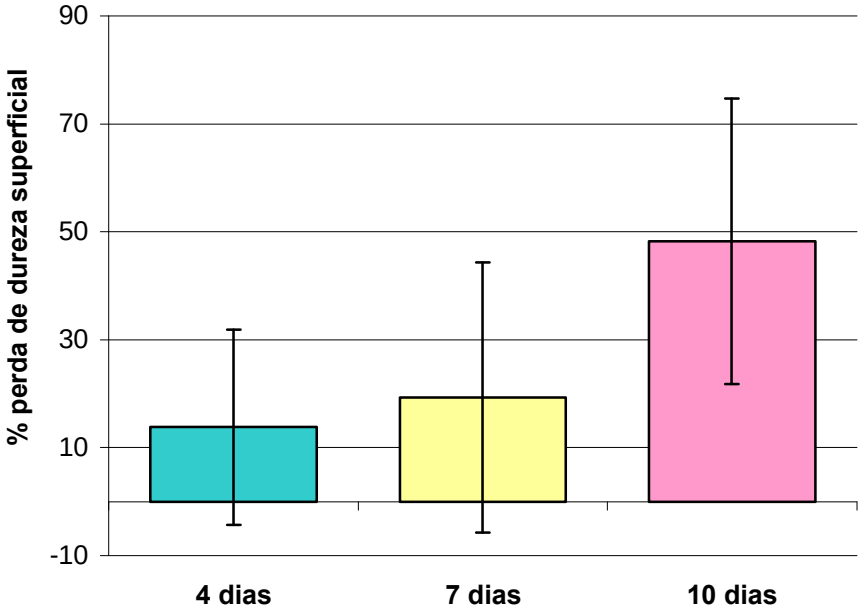

FIGURA 9 - Média e desvio-padrão da porcentagem de perda de dureza superficial nos três períodos investigados.

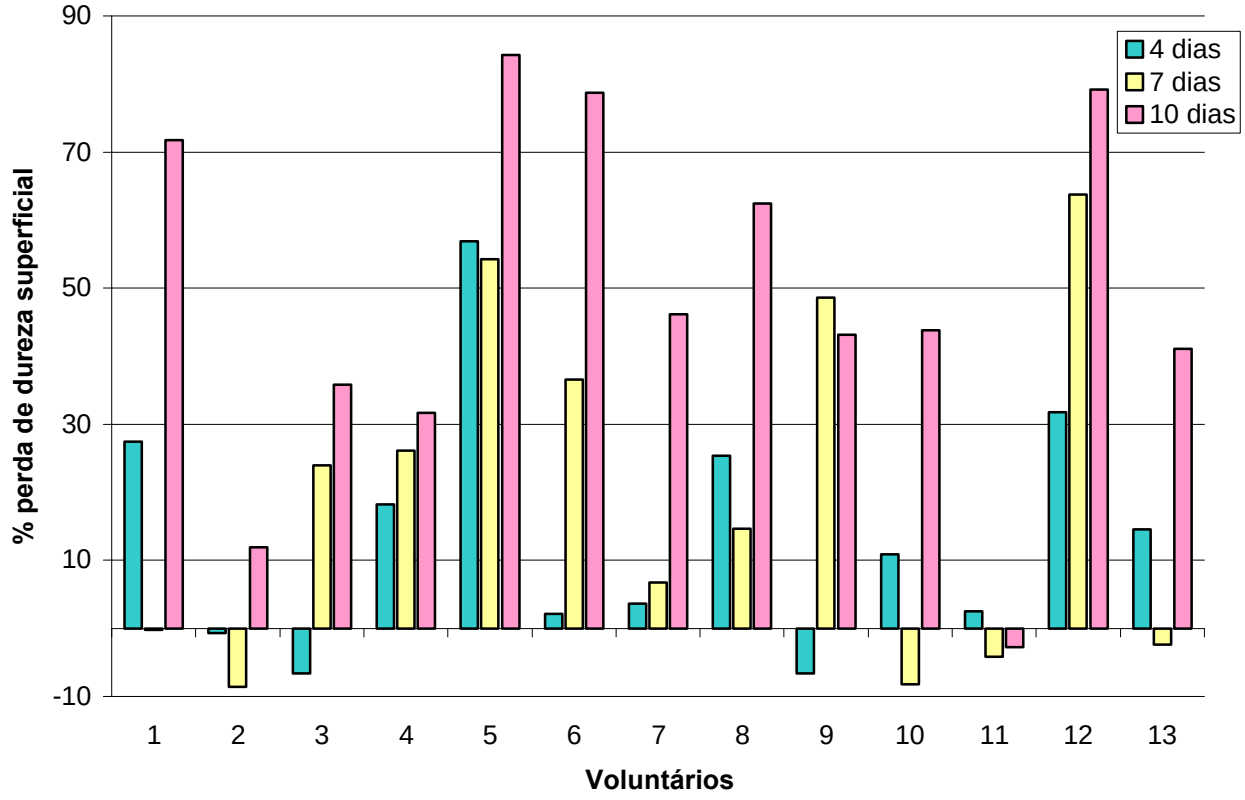

FIGURA 10 - Média da porcentagem de perda de dureza superficial dos 4 blocos de esmalte nos três períodos analisados. Valores negativos indicam que não houve perda de dureza.

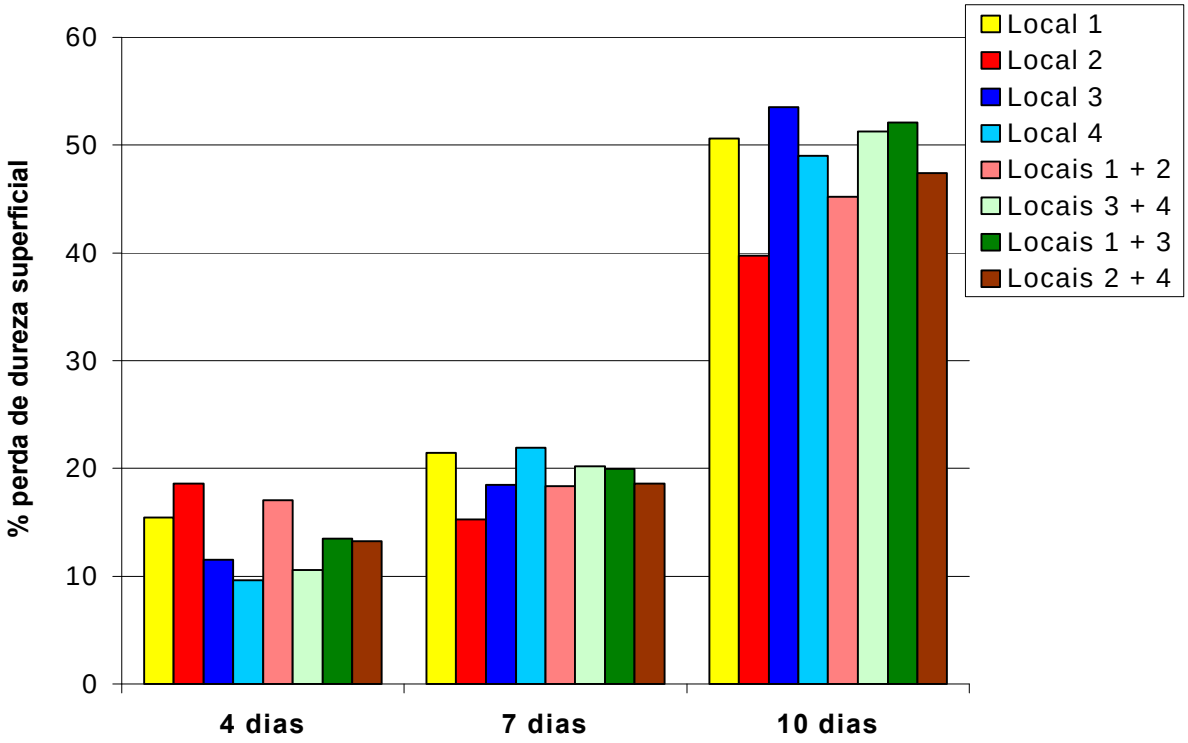

FIGURA 11 - Média da porcentagem de perda de dureza superficial dos blocos colocados em diferentes locais no dispositivo intrabucal. Locais 1+2, 3+4, 1+3 e 2+4 referem-se à média dos respectivos locais.

TABELA 4 - Resultado da análise de variância a dois critérios, comparando a porcentagem de perda de dureza superficial nos diferentes tempos estudados e locais de fixação dos blocos de esmalte no dispositivo intrabucal.

Efeito	Graus de liberdade	Quadrado méd. (efeito)	Quadrado méd. (resíduo)	F	p
Tempo (4 X 7 X 10)	2	1,780172	0,79681	22,34125	0,000000*
Local (1 X 2 X 3 X 4)	3	0,015033	0,79681	0,18866	0,903980
Tempo X Local	6	0,032157	0,79681	0,40357	0,875730
Tempo (4 X 7 X 10)	2	1,780172	0,077547	22,95597	0,000000*
Local (1 + 2 X 3 + 4)	1	0,031033	0,077547	0,40018	0,527957
Tempo X Local	2	0,024490	0,077547	0,31580	0,729687
Tempo (4 X 7 X 10)	2	1,780172	0,077547	22,95597	0,000000*
Local (1 + 3 X 2 + 4)	1	0,031033	0,077547	0,40018	0,527957
Tempo X Local	2	0,024490	0,077547	0,31580	0,729687

* significante a 5%

TABELA 5 - Resultados do teste de Tukey na comparação da porcentagem de perda de dureza superficial nos diferentes períodos de acúmulo de placa.

Comparação	P
4d X 7d	0,573932
7d X 10 d	0,000022*
4d X 10 d	0,000022*

* significante a 5%

O coeficiente de correlação de Pearson mostrou uma correlação negativa entre o fluxo salivar e a %PDS, nos três tempos avaliados e na média dos três tempos. O mesmo ocorreu entre a capacidade tampão da saliva e a %PDS. Entretanto, nenhuma das correlações foi estatisticamente significante a 5%. A correlação entre a %PDS e o log_{10} do número de estreptococos mutans na saliva também não foi estatisticamente significante, mas a correlação foi positiva, com exceção da %PDS com 4 dias (Tabela 6).

TABELA 6 - Valores de r e p do coeficiente de correlação de Pearson nas comparações entre fluxo salivar, capacidade tampão da saliva e log_{10} da contagem de estreptococos mutans na saliva e a porcentagem de perda de dureza nos três períodos estudados e na média dos três períodos.

Desmineralização	**Fluxo salivar**		**Capac. tampão**		**Log_{10} mutans**	
	r	**p**	**r**	**p**	**r**	**p**
%PDS[1] 4 dias	-0,33	0,27	-0,23	0,46	-0,15	0,63
%PDS 7 dias	-0,07	0,82	-0,06	0,84	0,36	0,23
%PDS 10 dias	-0,39	0,18	-0,09	0,77	0,04	0,91
%PDS total[2]	-0,31	0,30	-0,14	0,66	0,12	0,69

[1] %PDS = porcentagem de perda de dureza superficial

[2] %PDS total refere-se à média da %PDS com 4, 7 e 10 dias

5.3. Análise bacteriológica da placa bacteriana e relação com a perda de dureza do esmalte

As contagens de estreptococos mutans e bactérias totais nas amostras de placa bacteriana são apresentadas no Anexo 10. A Tabela 7 apresenta a relação entre a quantidade de estreptococos mutans e bactérias totais na placa bacteriana formada sobre os blocos 2 e 3, dos quais ela foi coletada, e a média da %PDS nos respectivos blocos. Em várias amostras de placa bacteriana os estreptococos mutans não foram detectados e, quando presentes, sua porcentagem em relação ao número de bactérias totais variou de 0,008% a 0,472%. A detecção ou não dos estreptococos mutans nas amostras de placa não teve relação com os períodos estudados ou entre os diferentes voluntários.

Na contagem dos estreptococos mutans das amostras de placa bacteriana, várias colônias atípicas, com até 5 mm de diâmetro, de cor esverdeada, acinzentada ou bege, de aspecto mucóide, povoaram as placas de ágar mitis salivarius bacitracina (MSB). A grande maioria das colônias atípica era de bacilos gram negativos, com uma menor porcentagem de bacilos gram positivos. Normalmente, cada placa de MSB apresentou até 4 tipos coloniais diferentes e o mesmo voluntário não apresentou necessariamente os mesmos tipos coloniais nas 3 amostras de placa bacteriana (4, 7 e 10 dias). Os bacilos gram negativos vistos no microscópio eram provavelmente de espécies distintas, pois apresentavam características variáveis (alguns mais alongados, outros mais arredondados; alguns corados adequadamente, outros gram lábeis). Não se pôde estabelecer um padrão quanto ao crescimento dessas colônias atípicas em cada voluntário ou período experimental.

TABELA 7 - Porcentagem de estreptococos do grupo mutans (% mutans) em relação ao total de bactérias totais na suspensão de placa e porcentagem de perda de dureza superficial (%PDS) correspondente.

Volunt.	4 dias		7 dias		10 dias	
	% mutans	%PDS[1]	% mutans	%PDS	% mutans	%PDS
1	0,017%	29,99%	0,209%	-8,30%	0,080%	62,11%
2	——— [2]	-0,07%[3]	———	-4,30%	———	15,65%
3	———	-7,67%	0,017%	25,85%	———	29,31%
4	0,116%	21,05%	———	16,25%	0,071%	18,98%
5	0,034%	41,03%	0,074%	52,25%	0,033%	77,34%
6	0,108%	8,28%	0,016%	39,09%	———	73,63%
7	———	9,17%	0,050%	16,74%	———	41,24%
8	———	27,43%	———	6,67%	———	75,06%
9	———	-7,09%	0,057%	32,68%	———	53,69%
10	———	9,44%	———	-9,35%	0,067%	32,09%
11	0,100%	10,12%	0,472%	-2,30%	———	5,06%
12	0,008%	41,78%	0,012%	63,36%	0,013%	72,17%
13	0,026%	12,45%	0,073%	-9,02%	0,147%	50,13%

[1] Média da %PDS dos blocos 2 e 3, dos quais a placa bacteriana foi coletada

[2] Ausência de crescimento (< 50 UFC/mL)

[3] Valores negativos indicam aumento na dureza

Não foi encontrada correlação estatisticamente significante entre a porcentagem de perda de dureza e o número de estreptococos mutans presentes na placa bacteriana sobre os respectivos blocos nos períodos de 4, 7 e 10 dias ou utilizando os dados dos três períodos (Tabela 8).

Quando a mesma correlação foi investigada excluindo os dados onde não foram detectados estreptococos mutans na placa, os valores de r obtidos foram negativos, ao contrário do esperado. Além disso, essa correlação foi estatisticamente significante quando os dados dos três períodos de desmineralização foram analisados (Tabela 9).

TABELA 8 - Valores de r e p do coeficiente de correlação de Spearman nas comparações entre a porcentagem de perda de dureza e a porcentagem de estreptococos mutans na placa bacteriana sobre os respectivos blocos nos três períodos estudados.

Correlação	**n**	**r**	**p**
4 dias	13	0,41	0,17
7 dias	13	0,05	0,87
10 dias	13	0,11	0,73
4 + 7 + 10 dias[1]	39	0,07	0,65

[1] O coeficiente de correlação foi determinado utilizando os dados de 4, 7 e 10 dias

TABELA 9 - Valores de r e p do coeficiente de correlação de Spearman nas comparações entre a porcentagem de perda de dureza superficial e a porcentagem de estreptococos mutans na placa bacteriana sobre os respectivos blocos nos três períodos estudados, excluindo os voluntários que não apresentaram crescimento dessas bactérias em suas amostras de placa.

Correlação	**n**	**r**	**p**
4 dias	7	- 0,64	0,12
7 dias	9	- 0,60	0,09
10 dias	6	- 0,49	0,33
4 + 7 + 10 dias[1]	22	- 0,50	0,02*

[1] O coeficiente de correlação foi determinado utilizando os dados de 4, 7 e 10 dias

* significante a 5%

Não foi encontrada correlação estatisticamente significante entre os níveis salivares de estreptococos mutans (log_{10} do número de UFC/mL de saliva) e a porcentagem de estreptococos mutans na placa bacteriana formada nos três tempos estudados; além disso o valor de r foi negativo (Tabela 10).

TABELA 10 - Valores de r e p do coeficiente de correlação de Spearman nas comparações entre o log_{10} da contagem de estreptococos mutans na saliva e sua porcentagem na placa bacteriana formada por 4, 7 e 10 dias.

Correlação	**r**	**p**
log_{10} mutans X % mutans 4 dias	- 0,01	0,99
log_{10} mutans X % mutans 7 dias	- 0,44	0,13
log_{10} mutans X % mutans 10 dias	- 0,31	0,31

A Tabela 11 mostra o número de voluntários que apresentaram ou não perda de dureza, de acordo com a presença ou ausência de estreptococos mutans na placa bacteriana formada sobre os blocos.

TABELA 11 - Relação entre a ocorrência de desmineralização e a presença de estreptococos mutans nas amostras de placa

	4 dias		**7 dias**		**10 dias**	
	Com mutans[1]	Sem mutans[2]	Com mutans	Sem mutans	Com mutans	Sem mutans
Com perda de dureza[3]	7	3	6	2	6	7
Sem perda de dureza[4]	———	3	3	2	———	———

[1] % estreptococos mutans nas amostras de placa > 0

[2] % estreptococos mutans nas amostras de placa = 0

[3] % perda de dureza superficial positiva

[4] % perda de dureza superficial negativa

A comparação da %PDS entre os voluntários que apresentaram estreptococos mutans nas amostras de placa e aqueles que não apresentaram um número detectável dessas bactérias foi realizada através do teste de Mann-Whitney (Tabela 12). Uma diferença estatisticamente significante entre os dois grupos só foi encontrada na avaliação da %PDS com 4 dias. Entretanto, nos outros períodos e na somatória de todos os períodos, houve maior porcentagem de desmineralização nos blocos cuja placa bacteriana continha estreptococos mutans.

TABELA 12 - Comparação, por meio do teste de Mann-Whitney, entre a porcentagem de perda de dureza superficial dos blocos onde os estreptococos mutans foram detectados na placa (G1) e a dos blocos onde essas bactérias não foram detectadas (G2).

Período	**Média ± D.P. G1**	**Média ± D.P. G2**	**n[1] G1**	**n G2**	**U**	**p**
4 dias	23,53% ± 14,27%	5,20% ± 13,21%	7	6	6	0,032132*
7 dias	23,37% ± 26,29%	2,32% ± 11,45%	9	4	8	0,122833
10 dias	52,13% ± 22,98%	41,95% ± 27,23%	6	7	16	0,475056
4+7+10 dias[2]	31,27% ± 24,87%	19,65% ± 26,99%	22	17	130	0,106460

[1] Tamanho da amostra

[2] Dados de porcentagem de perda de dureza superficial dos períodos de 4, 7 e 10 dias

* significante a 5%

6. DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

A revisão de literatura demonstra que a interação dos fatores envolvidos no desenvolvimento da cárie é complexa e até hoje não totalmente compreendida. Embora o papel da saliva e de certos microorganismos na ocorrência de cárie seja claro, as dificuldades encontradas para determinar uma relação direta entre eles sugerem a necessidade por um entendimento mais profundo do processo.

A utilização de um modelo *in situ* para avaliar a desmineralização inicial do esmalte e a influência de fatores salivares e microbiológicos parece ser adequada para uma compreensão mais ampla da questão. Esses modelos eliminam a artificialidade dos estudos *in vitro* e são uma alternativa aos estudos clínicos, que apresentam problemas éticos e nos quais a interferência de certas variáveis não pode ser eliminada. Desde 1974, quando KOULOURIDES et al.[62] apresentaram a metodologia à literatura odontológica, os estudos *in situ* têm demonstrado um valor imensurável nas pesquisas a respeito da cárie. Normalmente eles são utilizados para avaliar a inibição da desmineralização e promoção da remineralização do esmalte, por meio da estimulação salivar[51] e do flúor[33, 59, 62, 105, 112], nas suas mais diversas formas de aplicação. Neste trabalho, no entanto, o modelo *in situ* foi utilizado para estudar os fatores envolvidos na desmineralização do esmalte em períodos de até 10 dias, sem a interferência de agentes terapêuticos. Os voluntários beberam água fluoretada, mas utilizaram um dentifrício sem flúor, eliminando o efeito anticariogênico promovido por este íon por meio da escovação. O único artifício inserido no modelo foi a alta freqüência de exposição do substrato à sacarose, simulando um desafio cariogênico severo.

Os voluntários selecionados para participar do estudo eram alunos de odontologia, com idade entre 19 e 28 anos. Apesar da cárie ocorrer com maior freqüência e severidade em crianças, a realização de estudos *in situ* nessa idade não é indicada devido à necessidade de seguir o protocolo à risca, especialmente com o uso de um aparelho removível[91, 112]. Além disso, a cárie pode ser produzida em qualquer indivíduo, independentemente da idade, desde que se estabeleça um protocolo de desafio cariogênico[112].

Considerando a influência do fluxo salivar e da capacidade tampão da saliva no desenvolvimento de cárie, a avaliação desses fatores antes do início da fase *in situ* visou determinar as características da cavidade bucal de cada voluntário que poderiam posteriormente interferir na desmineralização do esmalte.

O papel da saliva na manutenção da saúde bucal fica evidente quando o fluxo salivar é diminuído por doenças ou medicamentos[24, 64, 89, 94]. Sua ação na inibição da desmineralização do esmalte baseia-se na limpeza de microorganismos e açúcares por lavagem, na neutralização dos ácidos produzidos pelas bactérias através de seu sistema tampão e no seu grau de saturação em relação ao conteúdo mineral do dente, que favorece a todo momento a remineralização do esmalte[24, 27, 64, 94, 102]. Quanto maior o fluxo salivar e a capacidade tampão da saliva, mais favoráveis as condições da cavidade bucal para impedir a desmineralização do esmalte[30, 64].

O fluxo salivar estimulado dos voluntários apresentou média de 1,6 mL/min, sendo que quatro deles apresentaram fluxo salivar entre 0,7 e 1,0 mL/min (Tabela 1). Todos os pesquisadores colocam como normais os valores acima de 1,0 mL/min[30, 63, 65, 89, 96, 107], mas nenhum deles apresenta resultados consistentes para justificar essa classificação. SHIP; FOX; BAUM[87], quando tentaram determinar o valor mínimo de normalidade do fluxo salivar, concluíram que essa é uma medida individual e variável, e o que é considerado baixo para uns, pode ser normal para outros. O mesmo cuidado na determinação do que é normal ou anormal em relação ao fluxo salivar é sugerido por LARMAS[65] e SREEBNY[89]. Assim, os valores de fluxo salivar encontrados foram considerados como demonstrativos da variabilidade entre os voluntários, não sendo utilizados para caracterizar nenhum deles como produtor de uma baixa quantidade de saliva. Além disso, esses valores não foram utilizados na seleção dos voluntários, como recomendam alguns pesquisadores[33, 112]; a intenção era justamente avaliar se valores mais baixos ou mais altos de fluxo salivar teriam influência na desmineralização *in situ*.

Com relação à capacidade tampão da saliva, ERICSSON; HARDWICK[30], utilizando a técnica descrita por ERICSSON[29] em 1959, consideraram valores de pH final abaixo de 4,0 como muito baixos e valores entre 5,75 e 6,50 como normais, mas não explicaram os critérios utilizados para esta classificação. Outros autores consideram os valores abaixo de 4,0 como baixos, entre 4,0 e 5,0 como intermediários e acima de 5,0 como normais[63, 107]. Seguindo esses últimos parâmetros, apenas oito dos 15 voluntários avaliados possuíam capacidade tampão considerada normal (Tabela 1). No estudo de HEINTZE; BIRKHED; BJÖRN[44], 80% de uma população de 629 suecos apresentaram capacidade tampão abaixo de 4,0. Estes resultados demonstram que provavelmente os critérios de classificação da capacidade tampão precisem ser revistos. A falta de um estudo controlado sobre o assunto impede a determinação do valor mínimo de normalidade da capacidade tampão que possa ser utilizado como critério de risco para a cárie. Assim como o fluxo salivar, a capacidade tampão da saliva foi determinada visando avaliar sua relação com a desmineralização do

esmalte, e não classificar os voluntários.

A correlação entre fluxo salivar e capacidade tampão da saliva não foi estatisticamente significante, provavelmente devido ao baixo número de voluntários estudados. Outros pesquisadores[20, 25, 44, 55, 99] encontraram correlação significante entre esses fatores, trabalhando com uma amostra muito maior. O aumento dos níveis salivares de bicarbonato, principal sistema tampão da saliva estimulada, com o aumento do fluxo salivar é o responsável por essa correlação[25, 27, 64, 96]. Mesmo assim, TUKIA-KULMALA; TENOVUO[99] encontraram dez indivíduos em sua amostra de 128 crianças com alta capacidade tampão e baixo fluxo salivar.

A implicação dos estreptococos mutans no desenvolvimento da cárie data de 1924[16], mas apenas na década de 60 os pesquisadores comprovaram sua cariogenicidade em animais[28, 36, 53]. O entendimento da cárie como uma doença multifatorial impulsionou as pesquisas a respeito de cada um desses fatores e os estreptococos mutans passaram a ser estudados extensivamente. Sua cariogenicidade está relacionada com a acidogenicidade e aciduricidade, capacidade de produção de polissacarídeos extracelulares insolúveis, que garantem adesividade à placa, produção e degradação de polissacarídeos intracelulares de reserva e capacidade de adesão à estrutura dentária e à outras bactérias[42, 67, 94, 100]. Assim, além dos fatores salivares, este estudo procurou determinar a influência da contagem salivar de estreptococos mutans na desmineralização *in situ* do esmalte. A contagem de estreptococos mutans na saliva dos voluntários antes do início do experimento revelou níveis relativamente baixos. Apenas três voluntários apresentaram acima de 100.000 UFC/mL de saliva, considerados por alguns como de alto risco para a cárie[41], e a maior contagem foi de 230.000 UFC/mL de saliva (Tabela 1). No trabalho de KLOCK; KRASSE[55], 40% das 655 crianças estudadas apresentavam níveis salivares de estreptococos mutans acima de 1.000.000 UFC/mL de saliva; mais recentemente KLOCK; SVANBERG; PETERSSON[57] encontraram esses níveis em mais de 50% de uma amostra de 718 suecos. Provavelmente a seleção dos voluntários entre alunos de odontologia, que mantém um padrão adequado de higiene e dieta, tenha contribuído para os baixos valores encontrados.

Embora apenas uma determinação dos níveis salivares de estreptococos mutans tenha sido realizada, TOGELIUS et al.[98] não encontraram diferenças em duas determinações realizadas com poucas horas de diferença ou após alteração do padrão de higiene. KLOCK; KRASSE[55] e KLOCK; SVANBERG; PETERSSON[57] também não encontraram diferenças marcantes nas contagens de estreptococos mutans na saliva realizadas com duas semanas de intervalo. WILSON; ASHLEY[110] observaram uma

correlação estatisticamente significante entre os valores de capacidade tampão e *S. mutans* na saliva avaliados com um ano de intervalo. Entretanto, TUKIA-KULMALA; TENOVUO[99] demonstraram grandes variações intra-individuais no fluxo salivar, capacidade tampão da saliva e níveis salivares de estreptococos mutans em 128 crianças avaliadas durante 9 meses. Assim, embora a curto prazo esses fatores salivares não apresentem grande variação, não se pode afirmar que os mesmos valores serão apresentados em análises futuras.

A correlação entre os níveis salivares de estreptococos mutans e o fluxo salivar não foi significante, mas o coeficiente de correlação apresentou um valor negativo, reforçando a idéia de que quanto maior o fluxo salivar, maior o efeito de lavagem e remoção de restos alimentares e bactérias. KLOCK; KRASSE[55], SEPPÄ; PÖLLÄNEN; HAUSEN[86] e TUKIA-KULMALA; TENOVUO[99] encontraram correlação negativa significante entre os níveis salivares de estreptococos mutans e o fluxo salivar. Talvez se o número de voluntários neste estudo fosse maior, uma correlação estatisticamente significante também fosse encontrada. Cabe lembrar, no entanto, que a população avaliada nesses trabalhos apresentava níveis salivares de estreptococos mutans variáveis e o papel da saliva pode ser maior em indivíduos com alta contagem dessas bactérias.

A correlação entre a capacidade tampão e os níveis salivares de estreptococos mutans também apresentou um valor negativo, indicando uma relação inversa entre eles, porém não estatisticamente significante. Ao compararem esses dois fatores em uma população de 655 crianças, KLOCK; KRASSE[55] também não encontraram correlação estatisticamente significante. Provavelmente a principal ação da saliva na diminuição dos níveis de estreptococos mutans seja exercida pelo alto fluxo salivar.

Após a determinação dos fatores salivares, os voluntários iniciaram a fase de desmineralização *in situ*, em 3 períodos relativamente curtos de acúmulo de placa bacteriana (4, 7 e 10 dias).

A técnica de análise escolhida para avaliar a desmineralização dos blocos de esmalte *in situ* foi a microdureza superficial. A partir do desenvolvimento do penetrador Knoop[58] em 1939, as dificuldades enfrentadas pelos pesquisadores na determinação da dureza dos dentes, no início do século XX[45, 79, 83], foram superadas e o método passou a ser empregado em inúmeras pesquisas a respeito do desenvolvimento de cárie em esmalte[13, 79, 80, 82, 88, 112].

A relação entre o conteúdo mineral da superfície do esmalte e o comprimento da

indentação gerada pelo penetrador Knoop já foi demonstrada na literatura[3, 4, 31, 109]. A área desmineralizada é comprimida sobre o esmalte sadio subjacente e, de acordo com o tamanho da indentação gerada, as alterações ultraestruturais dos cristais de hidroxiapatita podem ser determinadas[59, 60, 112]. Dessa forma, o teste de microdureza superficial é sensível para detectar a desmineralização inicial do esmalte [60, 72, 95, 109, 112]. Mesmo em um substrato heterogêneo como a lesão de cárie, que apresenta uma camada superficial mais mineralizada, a microdureza superficial permite avaliar a desmineralização, principalmente em lesões com até 50 micrômetros de profundidade[3, 4, 59, 60, 109, 112]. Entretanto ela não apresenta medidas diretas do conteúdo mineral do esmalte, o que é considerado uma desvantagem[60, 72].

A microdureza superficial é um método não destrutivo, podendo ser utilizada seqüencialmente no mesmo bloco de esmalte, antes e após a desmineralização *in situ*[3, 4, 13, 59, 60, 72, 109, 112], propriedade que norteou a sua escolha como método de análise da desmineralização neste estudo.

A microdureza só pode ser realizada sobre uma superfície plana e polida, que requer o desgaste e polimento da camada externa do esmalte[3, 33, 59, 60, 72, 76]. Essa exigência, no entanto, não diminui a indicação do método; apesar do esmalte subsuperficial apresentar uma velocidade de desmineralização maior, a remoção da camada superficial, rica em flúor, leva à formação de lesões mais padronizadas e menos variáveis[33, 59, 76, 80, 112].

A desmineralização *in situ* foi avaliada em blocos de esmalte bovino. Uma das razões que levaram à escolha desse substrato é a disponibilidade de dentes bovinos em quantidade e qualidade suficientes à obtenção dos 180 blocos de esmalte necessários neste estudo. Entretanto, a opção pelo uso do esmalte bovino não se baseou apenas em sua facilidade de obtenção. Diversos pesquisadores utilizam esse substrato para avaliar a desmineralização e remineralização[3, 4, 12, 32, 37, 59, 71, 72, 76, 95, 112], porque ele apresenta um comportamento semelhante ao esmalte humano e uma menor variabilidade de resposta aos testes. KOULOURIDES; CHIEN[59] relataram não ter encontrado diferenças entre a cárie produzida nos dois tipos de esmalte quando utilizaram a microdureza para medi-la e concluíram que tanto o esmalte bovino quanto o humano podem ser usados nos estudos *in situ*. Embora o esmalte humano seja considerado o substrato de escolha, ele apresenta maior variabilidade na composição e na resposta ao teste, devido à influências genéticas, diferenças na exposição ao flúor e idade[12, 59, 76, 112]. Além disso, os dentes humanos apresentam coroa com tamanho menor e maior curvatura que os dentes bovinos, dificultando a obtenção de blocos adequados aos ensaios de microdureza[12, 59, 76, 112].

Apesar de apresentar um comportamento semelhante ao do esmalte humano em relação à desmineralização, o esmalte bovino é mais poroso, o que resulta em uma taxa de difusão e formação da lesão mais rápidas e permite a utilização de períodos experimentais mais curtos[4, 32, 76, 80, 95, 112]. Em estudos cruzados, onde os voluntários participam de todas as etapas da pesquisa, a diminuição dos períodos experimentais facilita a colaboração. Embora o tempo necessário à ocorrência de desmineralização tenha sido diminuído pela utilização do esmalte bovino, o tempo necessário à formação de uma placa cariogênica não foi, reforçando a opção por esse substrato.

Uma preocupação crescente nos estudos *in situ* diz respeito ao método de esterilização dos blocos de esmalte[112]. CHANDLER[15] recomendou a utilização do óxido de etileno ou da radiação gama. Entretanto, AMAECHI; HIGHAM; EDGAR[2] demonstraram que após a imersão dos dentes bovinos em solução de timol a 0,1%, um desinfetante mais fraco que o formol, a contaminação cruzada é eliminada. Assim, o método de esterilização dos blocos de esmalte bovino foi a imersão por no mínimo 30 dias em solução de formol a 2%, pH 7,0, como utilizado por WHITE[109], BENELLI et al.[6], CURY; REBELLO; DEL BEL CURY[21] e CURY et al.[22].

Os voluntários da pesquisa eram alunos de odontologia, o que facilitou a colaboração, devido ao interesse pelos resultados do estudo. Mesmo assim, cada voluntário foi solicitado a preencher fichas com os horários em que fez a exposição à sacarose e os períodos que ficou com o dispositivo fora da boca (Anexo 5). A importância do monitoramento dos voluntários foi enfatizada por FETHERSTONE; ZERO[33], VERNON et al.[105] e STOOKEY[91]. Como o estudo avaliou a desmineralização causada por uma placa bacteriana formada *in situ*, períodos prolongados fora da boca causariam a alteração da placa formada no dispositivo. Embora alguns voluntários tenham relatado períodos de mais de uma hora com o dispositivo fora da boca ou a realização de menos de 10 exposições à sacarose em alguns dias, não houve alteração nos resultados de desmineralização. O cuidado em anotar detalhadamente o uso do dispositivo intrabucal justifica-se por funcionar como um estímulo para o uso correto e enfatizar a necessidade de seguir o protocolo à risca.

A instrução para remover o dispositivo da boca durante as refeições ou consumo de qualquer bebida teve o intuito de padronizar o desafio cariogênico, sem a interferência da dieta dos voluntários. Além disso, FUSHIDA; CURY[37] demonstraram que a exposição de blocos de esmalte à bebidas ácidas, como Coca-Cola, causa erosão e perda significante da dureza.

O conhecimento do tempo necessário à ocorrência de lesão no esmalte pela ação de uma placa bacteriana cariogênica é importante no desenvolvimento de programas preventivos, principalmente aqueles que se baseiam no controle mecânico da placa. A relação entre o período de acúmulo de placa bacteriana e a ocorrência de desmineralização já foi estudada por alguns pesquisadores[47, 48, 81, 97, 106]. Em 1970, VON DER FEHR; LÖE; THEILADE[106] demonstraram *in vivo* que lesões de cárie incipientes ocorriam em superfícies lisas após três semanas de eliminação de procedimentos de higiene e utilização de bochechos de sacarose freqüentes. HOLMEN et al. [47, 48] observaram a formação de lesões de mancha branca *in vivo* após 4 semanas de acúmulo de placa; entretanto, demonstraram por meio de microrradiografia e microscopia de luz polarizada, que as alterações na superfície e subsuperfície do esmalte tiveram início muito antes, com 1 a 2 semanas.

Os trabalhos que demonstram a desmineralização do esmalte *in situ* em função do tempo são escassos. Além disso, os estudos *in situ* normalmente trabalham com períodos de desmineralização maiores (21 a 28 dias) do que os utilizados neste estudo. A avaliação da desmineralização em períodos curtos de acúmulo de placa bacteriana *in situ* visou determinar as alterações iniciais que ocorrem no esmalte após a suspensão da higiene bucal.

A análise da microdureza inicial e final nos três períodos estudados demonstrou desmineralização significante do esmalte (Tabelas 2 e 3). Esse resultado evidencia que, mesmo após 4 dias, já há sobre o esmalte uma placa bacteriana cariogênica, capaz de causar uma alteração significativa, detectada por meio da microdureza superficial. A porcentagem de perda de dureza foi progressivamente maior nos períodos de 7 e 10 dias, sem diferença estatisticamente significante entre a porcentagem perda de dureza de todos os voluntários nos períodos de 4 e 7 dias (Figura 9, Tabelas 4 e 5).

THYLSTRUP et al.[97] avaliaram a alteração do esmalte em períodos de 1, 2, 4, 8 e 14 dias, após a bandagem de pré-molares permitindo o acúmulo de placa. Embora neste trabalho não tenha sido instituída uma dieta cariogênica, os resultados foram muito semelhantes aos encontrados no presente estudo: após 4 dias de acúmulo de placa, os autores observaram na maioria dos dentes evidências de dissolução da superfície do esmalte, progressivamente maior nos períodos de 8 e 14 dias.

Apesar dos resultados terem demonstrado desmineralização do esmalte após 4 dias de acúmulo de placa, resta investigar até que ponto as alterações observadas através da microdureza refletem preocupações clínicas, além da ação da saliva na reversão do dano

após a remoção da placa. HOLMEN et al.[49] demonstraram que o simples distúrbio mecânico semanal da placa bacteriana foi suficiente para impedir o desenvolvimento de cárie após 5 semanas de acúmulo de placa em pré-molares.

Além disso, alguns recursos utilizados no modelo *in situ* impedem a extrapolação dos dados relacionados ao tempo necessário à ocorrência de desmineralização para a situação clínica, como o uso do esmalte bovino, no qual as lesões são formadas mais rapidamente. A alta freqüência de exposição à solução de sacarose (10 vezes ao dia), utilizada para simular um desafio cariogênico severo, também influenciou a formação das lesões. CURY; REBELLO; DEL BEL CURY[21] relacionaram a ocorrência de manchas brancas em blocos de esmalte humano intactos, após 28 dias de acúmulo de placa *in situ*, com a freqüência de exposição à uma solução de sacarose a 20%. Utilizando uma metodologia semelhante à empregada neste estudo, os autores observaram a formação de manchas brancas no esmalte quando os voluntários realizaram 4 ou 8 exposições diárias à sacarose, que não ocorreram quando os blocos foram expostos 2 vezes ao dia.

Além da influência nas quedas do pH abaixo do nível crítico, a exposição freqüente à sacarose também causa uma alteração na composição microbiológica e bioquímica da placa bacteriana. VAN HOUTE[100] e MARSH[74] escreveram que a exposição freqüente à açúcares fermentáveis causa freqüentes quedas do pH, que selecionam microorganismos acidogênicos e acidúricos, tornando a placa bacteriana cada vez mais cariogênica.

Entre os trabalhos que estudaram a relação entre sacarose e composição microbiológica da placa, VON DER FEHR; LÖE; THEILADE[106] não encontraram diferenças entre a placa formada *in vivo* com 9 bochechos diários de sacarose ou sem bochechos de sacarose, embora a análise bacteriológica tenha sido feita apenas a partir de esfregaços corados pelo método de Gram. No estudo *in vivo* de STAAT et al.[90], uma dieta rica em sacarose levou à formação de placa bacteriana com maior porcentagem de estreptococos mutans, principalmente nos primeiros 4 dias. SCHEIE et al.[85] relataram uma maior freqüência de estreptococos mutans e uma maior queda do pH nas placas bacterianas de voluntários alimentados com uma dieta rica em sacarose. LINGSTRÖM et al.[66] não encontraram diferenças significantes na desmineralização *in situ* após três semanas de dieta com ou sem sacarose, mas a queda do pH, avaliada *in situ*, foi maior nas placas formadas na presença de sacarose, sugerindo diferenças microbiológicas entre as duas. Ao contrário dos resultados desses estudos, MACPHERSON et al.[69] não relataram diferenças na porcentagem de estreptococos mutans na placa bacteriana formada *in situ* após 3 semanas, com ou sem a aplicação de sacarose a 10%.

Com relação à composição bioquímica da placa bacteriana, VAN HOUTE; RUSSO; PROSTAK[103] demonstraram que massas celulares de *S. mutans* cultivadas na presença de sacarose produzem uma grande quantidade de polissacarídeo extracelular, responsável por aumentar o potencial cariogênico da placa. CURY; REBELLO; DEL BEL CURY[21] e CURY et al. [22], além da quantidade de polissacarídeo extracelular, relacionaram também a menor concentração de cálcio, fósforo e flúor com o maior potencial cariogênico das placas formadas com alta freqüência de exposição à sacarose. Além disso, CURY et al.[22] comprovaram a maior cariogenicidade da sacarose em relação à glicose+frutose.

Apesar do trabalho de MACPHERSON et al.[69] não ter encontrado diferenças na porcentagem de estreptococos mutans na placa formada *in situ* com ou sem a exposição à sacarose, o dispositivo intrabucal foi utilizado durante as refeições e não apresentava tela para o acúmulo de placa. Levando essas diferenças de metodologia em consideração, é muito provável que a composição bioquímica e microbiológica da placa bacteriana formada no presente estudo tenha sido influenciada pela alta freqüência de exposição à sacarose. Dessa forma, a desmineralização ocorrida nos períodos curtos de tempo testados neste trabalho não pode ser comparada ao que ocorreria no mesmo tempo *in vivo*, devido à formação de uma placa bacteriana com características peculiares, num desafio cariogênico severo ao qual os indivíduos não estão normalmente sujeitos.

Outro ponto a ser considerado é que os voluntários não fizeram uso de dentifrício fluoretado, que comprovadamente age inibindo a desmineralização e promovendo a remineralização do esmalte. Provavelmente uma menor porcentagem de perda de dureza fosse encontrada com o uso do dentifrício com flúor. THYLSTRUP et al.[97] discutiram em seu trabalho que a utilização de água fluoretada pelos voluntários determinou uma redução na velocidade de progressão da lesão, embora não tenha sido capaz de prevenir a ocorrência de cárie. Apesar de no Brasil os dentifrícios comercializados serem fluoretados, o trabalho visou determinar a ação da placa bacteriana sobre o esmalte, sem a interferência do flúor.

A Figura 10 mostra a porcentagem de perda de dureza apresentada por cada voluntário nos três períodos experimentais. Houve uma tendência de aumento na desmineralização ao nível individual com o aumento no período de uso do dispositivo intrabucal, mas esse padrão não foi seguido por todos. Sete dos 13 voluntários não apresentaram desmineralização em pelo menos um período experimental, não necessariamente o mais curto. OGAARD; ROLLA; ARENDS[81] encontraram desmineralização proporcional ao período de acúmulo de placa *in vivo*, mas os tempos avaliados foram maiores que os utilizados neste estudo, de 4, 6 e 8 semanas. É pouco

provável que a ausência de desmineralização em certos períodos no presente estudo tenha sido causada por falta de colaboração dos voluntários na utilização adequada do dispositivo intrabucal. Apenas um voluntário foi excluído por não ter cumprido o protocolo até o final em dois dos três períodos experimentais. Os demais foram avaliados através do preenchimento do relatório de uso diário e de contatos freqüentes com a pesquisadora responsável.

Outros estudos já relataram uma grande variabilidade na resposta ao desafio cariogênico entre voluntários[62, 82, 112]. OSTROM et al.[82] chegaram a dividir os quatro voluntários que participaram de sua pesquisa entre os que apresentam desmineralização e os que não apresentam desmineralização *in situ*. Entretanto, as diferenças intravoluntários encontradas não podem ser explicadas senão pela natureza variável da ocorrência da cárie. A desmineralização inconsistente em um hospedeiro que apresenta fatores salivares e microbiológicos próprios e segue uma dieta cariogênica padronizada demonstra necessidade por um entendimento mais amplo da doença.

A perda de dureza também não foi igual entre os quatro blocos utilizados no mesmo dispositivo. Os Anexos 6, 7 e 8 e a Tabela 2 (desvio padrão final) demonstram a diferença na desmineralização entre os quatro blocos: uns desmineralizaram mais, outros menos, porém seguindo um padrão. Essa variação não teve relação com o local específico onde os blocos foram fixados (Figura 11) e portanto não pode ser explicada por diferenças no acesso à saliva ou à solução de sacarose[112]. Uma das hipóteses que justificam esse achado é a variabilidade dos blocos de esmalte bovino, que responderam de maneira diferente ao teste. Outra hipótese é a de que a colonização do esmalte e posterior maturação da placa bacteriana tenha ocorrido de maneira diferente entre os quatro blocos localizados no mesmo dispositivo e submetidos às mesmas condições ambientais. Como escreveu HAY[43], a colonização inicial da superfície dentária é promovida por receptores específicos presentes nas proteínas da película adquirida. Como a composição salivar é muito variável entre indivíduos e no mesmo indivíduo em diferentes ocasiões, é possível que a película adquirida formada também seja influenciada por essas diferenças, afetando a adesão inicial das bactérias e a natureza da placa formada.

A ação da saliva na inibição da desmineralização do esmalte já foi comprovada em diversos estudos. ABELSON; MANDEL[1] estudaram a queda do pH da placa em indivíduos cárie ativos e livres de cárie e descobriram que, na ausência de saliva, o pH cai em níveis semelhantes nos dois grupos, mas na sua presença, a queda do pH é menor nos indivíduos livres de cárie. Isso demonstra uma diferença entre os dois grupos com relação às propriedades da saliva, que pode explicar as diferenças na atividade da cárie. A ação da

estimulação salivar na inibição da desmineralização do esmalte *in situ* foi demonstrada por KASHKET; YASKELL; LOPEZ[51]. Complementando esses resultados, HALL et al.[40] demonstraram que a ação da saliva na inibição da queda do pH não é fruto apenas de sua capacidade de lavagem, mas principalmente de sua capacidade tampão, tendo em vista que a água não tem a mesma ação.

A análise da correlação entre a quantidade de desmineralização *in situ* e o fluxo salivar estimulado, a capacidade tampão da saliva e os níveis salivares de estreptococos mutans não apresentou coeficientes estatisticamente significantes. Nenhum dos três períodos experimentais ou a sua média apresentou desmineralização que pudesse ser associada com algum desses fatores (Tabela 6). Entretanto, o valor de r foi negativo nas correlações entre a porcentagem de perda de dureza e o fluxo salivar e a capacidade tampão da saliva, comprovando a ação desse fluido como antagonista à desmineralização[96]. Num estudo *in situ* semelhante a este, MACPHERSON et al.[71] não observaram relação entre o índice CPOS e o fluxo salivar, a capacidade tampão da saliva e os níveis salivares de *S. mutans* em seis indivíduos. Infelizmente, relação entre a desmineralização *in situ* e esses fatores salivares não foi apresentada.

A relação descrita na literatura entre fluxo salivar e capacidade tampão da saliva e a ocorrência de cárie é inconclusiva[27, 64, 96]. CROSSNER; HOLM[19] encontraram relação estatisticamente significante entre capacidade tampão e índice de cárie em dois grupos de crianças de 5 e 8 anos, mas a relação da cárie com o fluxo salivar só foi estabelecida nas crianças com 8 anos. Para eles, os teste são de pouca aplicabilidade para prever o desenvolvimento de cárie. HONKALA et al.[50] não observaram relação entre a capacidade tampão e o número de dentes cariados e o CPOD um ano antes em aproximadamente 100 crianças de 13 anos. WILSON; ASHLEY[110] relataram uma alta sensibilidade e baixa especificidade do teste de capacidade tampão com relação ao desenvolvimento de cárie, ou seja, crianças com alto índice de cárie possuíam baixa capacidade tampão. BRETZ et al.[11] não observaram relação entre a taxa de superfícies cariadas e o fluxo salivar estimulado em crianças brasileiras de 3 a 6 anos com atividade de cárie. O fluxo salivar e a capacidade tampão da saliva apresentaram relação inversa com o CPOS e o incremento de cárie em 1 ano, em 128 crianças, no trabalho de TUKIA-KULMALA; TENOVUO[99]. Entretanto, para TENOVUO[96] não se pode afirmar que exista uma correlação entre fluxo salivar e capacidade tampão e atividade de cárie, devido às fracas associações encontradas entre esses fatores ao nível individual.

A respeito da relação entre os níveis de estreptococos mutans na saliva e a

experiência passada de cárie em adultos e crianças, determinada através de índices, diversos trabalhos[9, 11, 14, 41, 55, 57, 86, 99] demonstraram uma associação significante. Entretanto, eles também se depararam com índices de cárie baixos e altas contagens de estreptococos mutans, ou vice versa. SULLIVAN et al.[92] encontraram apenas uma fraca correlação entre os níveis salivares de estreptococos mutans e o índice de cárie.

A utilização dos níveis salivares de estreptococos mutans para prever a ocorrência de cárie já foi descrita na literatura. Em 1979, KLOCK; KRASSE[56] encontraram correlação estatisticamente significante entre esses níveis e o incremento de cárie após 2 anos. CANTISANO et al.[14] não identificaram associação estatisticamente significante entre a contagem de estreptococos mutans na saliva e o número de novas lesões de cárie em primeiros molares permanentes após 6 meses, mas com 1 ano, todos os primeiros molares do grupo com as maiores contagens foram acometidos por cárie, o contrário ocorrendo no grupo com as menores contagens. No trabalho de WILSON; ASHLEY[110], o incremento de cárie em crianças com alta e baixa contagem salivar de *S. mutans* foi estatisticamente significante após 3 anos. TUKIA-KULMALA; TENOVUO[99] relataram relação entre os níveis de estreptococos mutans na saliva e o incremento de cárie em 1 ano, numa amostra de 128 crianças.

Apesar desses resultados, a utilização dos níveis salivares de estreptococos mutans para prever a ocorrência futura de cárie é vista com cautela por alguns pesquisadores: a presença dessas bactérias pode não estar associada à cárie e lesões podem acontecer em indivíduos sem infecção pelos estreptococos mutans[65]. VAN HOUTE[101] coloca que a influência da saliva e dieta nas contagens de microorganismos, principalmente na placa bacteriana, impede o desenvolvimento de um teste, baseado em um único parâmetro, que seja capaz de prever a atividade de cárie. BOWDEN[9] sugere que os testes microbiológicos sejam utilizados para monitorar um paciente, mas não como um método preditivo da ocorrência de cárie.

A dificuldade apresentada na literatura em estabelecer relação entre fluxo salivar, capacidade tampão da saliva e níveis salivares de estreptococos mutans e a atividade de cárie presente e futura, associada aos resultados encontrados nesses trabalhos, sugerem que os métodos de diagnóstico de pacientes de risco sejam revistos. Esses testes salivares têm seu valor no controle de pacientes com fluxo salivar deficiente, por exemplo. Entretanto, o estabelecimento de medidas preventivas não deve se fundamentar em seus resultados.

A determinação dos níveis de estreptococos mutans na placa bacteriana visou

investigar se fatores individuais estariam envolvidos na formação de uma placa mais cariogênica e sua relação com a desmineralização *in situ*. Os estreptococos mutans são reconhecidamente os microorganismos mais cariogênicos, pois apresentam uma vantagem ecológica sobre as outras bactérias no desenvolvimento de cárie[94]. Apesar dos lactobacilos também apresentarem acidogenicidade e aciduricidade, tendo sido os primeiros microorganismos associados com a cárie, seu papel é maior na progressão da lesão do que na sua iniciação[26, 55, 56].

A determinação do número de estreptococos mutans na placa bacteriana foi feita com base em sua porcentagem em relação ao total de bactérias presentes na placa. Embora o número de estreptococos mutans pudesse ser expresso por miligrama de placa, o método de pesagem foi descartado devido aos artifícios experimentais gerados, como o aumento do tempo de exposição da placa bacteriana ao ar, que causa a morte de um grande número de bactérias. A maioria dos trabalhos que envolvem a contagem de bactérias da placa bacteriana descritos na literatura utiliza sua porcentagem em relação ao total de bactérias ou ao total de estreptococos[26, 68, 69, 70, 78, 82, 85, 90, 104].

KEENE[52] enfatizou a importância da coleta da placa nos resultados obtidos, devido à grande variação no número de estreptococos mutans na mesma área. A placa bacteriana foi coletada do centro dos blocos de esmalte, evitando-se a área em contato com o acrílico do dispositivo, pois a microdureza foi realizada justamente nessa área central. Apesar desse cuidado, MACPHERSON et al.[70] demonstraram semelhança microbiológica entre a placa bacteriana formada em blocos de esmalte, acrílico e superfícies dentárias, com algumas diferenças quantitativas e grande variação entre os voluntários.

O meio utilizado para a contagem do total de bactérias foi o ágar sangue brucella suplementado. O meio base ágar brucella é extremamente rico e quando suplementado com fatores de crescimento como a hemina e o menadione e adicionado de sangue, torna-se ainda mais nutritivo. A incubação desse meio em anaerobiose permite o crescimento da grande maioria das bactérias, não sendo recuperados apenas os aeróbios estritos, que representam uma porcentagem muito pequena da placa.

Quando as diluições de placa bacteriana foram semeadas no ágar mitis salivarius bacitracina (MSB), outras bactérias, além dos estreptococos mutans, cresceram no meio. As bactérias mais freqüentemente encontradas foram bacilos gram negativos, seguidos por bacilos gram positivos. Embora o ágar MSB seja considerado um meio seletivo para estreptococos mutans, diversos trabalhos na literatura em que foi utilizado citam a

identificação das colônias através de outros métodos além da observação em microscópio estereoscópico[26, 68, 69, 70, 85, 92]. Talvez esses trabalhos também tenham observado o crescimento de outras bactérias nesse meio. O fato desse crescimento só ter ocorrido nas amostras de placa bacteriana, e não nas de saliva, sugere que a agregação e interação das bactérias presentes na placa não tenham sido rompidas pela agitação no frasco contendo pérolas de vidro, embora este seja um método indicado para a obtenção da suspensão de placa. Além disso, MACPHERSON et al.[69] encontraram bacilos gram negativos com maior freqüência e em maior proporção nas placas bacterianas formadas *in situ* sobre blocos de esmalte tratados 9 vezes ao dia com solução de sacarose a 10% em relação àqueles não tratados. Embora esses autores não tenham utilizado a tela plástica para cobrir os blocos de esmalte, é possível que também no presente estudo a placa formada na presença de sacarose apresentasse uma maior proporção de bacilos gram negativos, encontrados nas placas de MSB. De qualquer forma, a contagem dos estreptococos mutans foi realizada com base nas características coloniais e morfotintoriais, não sendo consideradas indiscriminadamente todas as colônias que cresceram no meio. A possibilidade do crescimento de outras bactérias ter inibido o crescimento dos estreptococos mutans nas amostras de placa foi descartada, pois como o meio é seletivo para esses estreptococos, seu crescimento é muito favorecido em detrimento ao das outras bactérias.

Neste trabalho, a técnica de determinação dos níveis de estreptococos mutans levou à detecção dessas bactérias em apenas 56,4% das amostras de placa bacteriana avaliadas (Tabela 7 e Anexo 10). Quando presentes, sua porcentagem em relação às bactérias totais da placa foi baixa, com o máximo de 0,47%. Além disso, não foi possível identificar uma tendência entre os voluntários ou entre os períodos experimentais com relação à freqüência de detecção dos estreptococos mutans ou à sua porcentagem na placa, ao contrário dos achados de OSTROM et al.[82], que encontraram uma porcentagem de estreptococos mutans progressivamente maior com o passar do tempo e uma semelhança na composição da placa bacteriana formada por cada voluntário.

No estudo de MACPHERSON et al.[69] a freqüência de detecção de estreptococos mutans foi de 63% nas placas tratadas 9 vezes ao dia com solução de sacarose a 10% e a variação entre os cinco voluntários foi grande, sendo que 4 apresentaram até 1% de estreptococos mutans na placa e um apresentou mais de 17%. BOYAR et al.[10] também encontraram uma grande variação nos níveis de estreptococos mutans na placa bacteriana acumulada por 1, 2, 4, 8 e 14 dias sob uma banda ortodôntica em 11 voluntários.

Como no presente estudo a placa bacteriana foi formada em blocos de esmalte

cobertos com uma tela plástica, é provável que apresentasse composição diferente daquela formada naturalmente na superfície dos dentes. Alguns autores contra-indicam a utilização da tela, justificando que ela facilita a colonização por estreptococos mutans[69, 70]; outros consideram que esta placa pode ter composição muito diferente daquela formada sem a cobertura[8, 33, 70, 75, 95, 112]. Para BOWDEN[8], a tela promove uma pressão de seleção bacteriana muito forte, gerando uma placa com menor diversidade. MELLBERG[76] e ZERO[112] consideram a placa formada em sua presença como semelhante à da área interproximal, com menor difusão de íons à superfície do esmalte. A opção pela utilização da tela plástica baseou-se no local eleito para a instalação do dispositivo intrabucal, o palato; sem a proteção, a formação de placa sobre os blocos seria muito prejudicada pela ação mecânica de limpeza da língua. Outro cuidado tomado foi a colocação dos blocos 1 mm abaixo da superfície do acrílico[6, 21, 22], evitando que a tela os tocasse. Essa distância permitiu a formação de placa bacteriana com até 1 mm de espessura, com maior capacidade de desmineralização na presença de sacarose do que placas mais finas[76, 112]. Embora praticamente todos os estudos *in situ* recomendem a recessão do bloco ou a utilização da cobertura, a associação dos dois métodos elimina parte das desvantagens de cada um deles, como, por exemplo, a formação de placa preferencialmente na periferia do bloco com o uso da recessão[33, 95, 112], e no caso da cobertura, a formação de placa seguindo o desenho da tela.

OSTROM et al.[82] estudaram a composição microbiológica da placa bacteriana formada na presença da tela e encontraram alta porcentagem de *S. salivarius* e lactobacilos, sugerindo que ela funcione como um sítio de retenção para essas bactérias. Portanto, embora a composição microbiológica total da placa não tenha sido avaliada, é provável que a porcentagem dessas bactérias estivesse aumentada. Além disso, o dispositivo intrabucal estava com contato direto com a língua, que apresenta um grande número de *S. salivarius*, favorecendo a colonização da tela por contato direto com essas bactérias[82].

Uma contagem maior de estreptococos mutans na saliva dos voluntários antes do início da fase *in situ* não predispôs à presença de uma maior porcentagem de estreptococos mutans na placa bacteriana formada sobre os blocos em nenhum período experimental (Tabela 10). Diversos trabalhos estabeleceram que a contagem salivar de estreptococos mutans relaciona-se com sua contagem na placa[52, 78, 92, 98]. Entretanto, estes estudos foram realizados *in vivo*, numa condição totalmente diferente daquela gerada pelo teste *in situ*. Outro ponto a se considerar é que nenhum dos voluntários apresentou contagens de estreptococos mutans na saliva extremamente altas; assim não se pode prever se a placa

bacteriana estaria mais povoada por essas bactérias se sua disponibilidade na saliva fosse maior. Trabalhando com voluntários com níveis salivares de estreptococos mutans de no máximo 30.000 UFC/mL, SCHEIE et al.[85] também não puderam estabelecer uma relação entre esse fator e a quantidade de estreptococos mutans na placa formada *in vivo*.

A análise da relação entre a quantidade de desmineralização e a freqüência de detecção de estreptococos mutans e sua porcentagem na placa bacteriana apresentou resultados conflitantes. Primeiramente, não foi encontrada correlação entre a porcentagem de perda de dureza superficial e a porcentagem de estreptococos mutans na placa bacteriana, mesmo analisando apenas as ocasiões em que essas bactérias foram detectadas. Além disso, algumas correlações estudadas foram negativas (Tabela 9), resultado surpreendente que sugere que a ocorrência de desmineralização não foi de forma alguma influenciada pela quantidade de estreptococos mutans na placa. Por outro lado, independentemente da porcentagem, as placas que apresentaram essas bactérias causaram uma maior desmineralização, que foi estatisticamente significante no período de 4 dias (Tabela 12). A relação complexa entre desmineralização e estreptococos mutans na placa fica ainda mais evidente pela observação da Tabela 11: em 12 ocasiões, ocorreu desmineralização mesmo nos blocos cobertos por placa bacteriana onde os estreptococos mutans não foram detectados; em 3 ocasiões, a presença de estreptococos mutans não causou desmineralização.

Como já descrito anteriormente, os estreptococos mutans são considerados as bactérias mais cariogênicas devido às suas características e associação com a ocorrência de cárie, demonstrada em diversos estudos. VAN HOUTE et al.[104] encontraram uma porcentagem de estreptococos mutans sobre manchas brancas da ordem de 2,9%, contra 0,3% em superfícies hígidas. MACPHERSON; MACFARLANE; STEPHEN[68] observaram uma clara tendência de aumento na porcentagem e freqüência de detecção de estreptococos mutans nas placas bacterianas com o aumento na desmineralização sob elas.

Entretanto, outros estudos *in vivo* e *in situ* já relataram dificuldades em estabelecer uma relação direta entre cárie e estreptococos mutans na placa. SCHEIE et al.[85] encontraram *in vivo* uma tendência de maior queda do pH nas placas com mais de 0,1% de estreptococos mutans em relação às bactérias totais, mas um de seus voluntários apresentou uma alta queda do pH sem a presença de estreptococos mutans na placa. Além disso, nas áreas onde houve o desenvolvimento de manchas brancas, não foi possível identificar características peculiares na microbiota ou acidogenicidade da placa. Mesmo no estudo de VAN HOUTE et al.[104], em alguns casos houve uma alta queda do pH em placas

com baixa porcentagem de estreptococos mutans. Seus resultados indicam que a relação entre o potencial de queda do pH da placa dental humana e sua composição microbiológica é complexa, sugerindo o envolvimento de outros microorganismos acidogênicos, que segundo eles estariam entre o grupo dos estreptococos. BOYAR et al.[10] encontraram dissolução do esmalte sob uma banda ortodôntica, mesmo em áreas onde não foram detectados estreptococos mutans. Esses autores também não detectaram uma associação entre número de estreptococos mutans e dissolução do esmalte, embora a freqüência de isolamento tenha sido maior nos locais onde ocorreu alteração.

Por outro lado, OSTROM et al.[82] observaram que um de seus voluntários apresentou uma alta porcentagem de mutans na placa e uma pequena quantidade de desmineralização *in situ*. Assim como no presente estudo, os pesquisadores não conseguiram estabelecer uma relação entre a proporção de estreptococos mutans na placa formada sobre blocos de esmalte cobertos por uma tela e a desmineralização *in situ*. Em 1978, DUCHIN; VAN HOUTE[26] demonstraram a presença de estreptococos mutans mesmo nas placas bacterianas coletadas de superfícies hígidas dos dentes. Além disso, eles relataram que sua porcentagem em relação ao total de bactérias mesmo na placa que causa desmineralização está em torno de 1%, o que sugere que outras bactérias também estejam envolvidas no processo, embora não se tenha provado que uma porcentagem baixa de estreptococos mutans não possa causar desmineralização.

MARGOLIS et al.[73] encontraram diferenças na queda do pH e na saturação quanto aos minerais do esmalte entre placas bacterianas de indivíduos livres de cárie e cárie ativos, mas a porcentagem de estreptococos mutans na placa variou de 0 a 2,5% nos primeiros e de 0,1% a mais de 10% nos últimos, demonstrando a variabilidade na proporção dessas bactérias na placa de indivíduos livres de cárie e cárie ativos. MACPHERSON; MACFARLANE; STEPHEN[68] demonstraram relação entre a desmineralização do esmalte humano *in situ* e a porcentagem de estreptococos mutans na placa bacteriana. Entretanto, essas bactérias estavam presentes em 52% das placas bacterianas onde houve desmineralização mínima, mas 27% de placas que causaram desmineralização considerável não apresentaram estreptococos mutans, sugerindo a ação de outras bactérias no processo. HARDIE[41] também sugeriu que outros microorganismos estejam envolvidos no desenvolvimento de cárie, tentando explicar a ocorrência de cárie na ausência de estreptococos mutans e sua presença na ausência de cárie.

A implicação de outros microorganismos presentes na placa bacteriana no desenvolvimento de cárie, como sugerido por DUCHIN; VAN HOUTE[26], MACPHERSON;

MACFARLANE; STEPHEN[68], VAN HOUTE et al.[104] e HARDIE[41], já foi investigada por alguns pesquisadores. OSTROM et al.[82] não encontraram correlação entre *S. mutans* e desmineralização *in situ*, mas sim entre *S. salivarius* e lactobacilos e desmineralização. ZERO; VAN HOUTE; RUSSO[113] demonstraram, utilizando o teste *in situ* de BRUDEVOLD et al.[12], que cepas de *S. mitis* e *S. sanguis* eram capazes de causar desmineralização *in situ*, principalmente a partir do polissacarídeo intracelular de reserva. Posteriormente, os mesmos autores[114] encontraram que *S. salivarius*, *S. sanguis* e *S. mitis* podem ter seu potencial de desmineralização aumentado pela presença de grande quantidade de matriz extracelular na placa bacteriana, produzida por eles ou pelos *S. mutans* a partir da sacarose.

HARPER; LOESCHE[42] demonstraram que cepas de *S. sanguis*, *S. salivarius* e *S. mitis* são acidogênicas, porém menos acidúricas que *S. mutans* e *Lactobacillus*. Entretanto, o trabalho de SANSONE et al.[84] comprovou que outros estreptococos, coletados da placa bacteriana de indivíduos cárie ativos e livres de cárie, também eram capazes de produzir pH tão baixo quanto os estreptococos mutans. As cepas mais acidogênicas desses estreptococos "não mutans" capazes de baixar o pH estavam presentes em maior quantidade em indivíduos cárie ativos; na placa dos indivíduos livres de cárie as cepas encontradas em sua maioria apresentaram um valor final de pH mais alto. A variação entre indivíduos cárie ativos e livres de cárie mostra como a placa bacteriana tem composição específica, determinada pelas condições do ambiente bucal. Esse trabalho demonstra que, embora não tenham sido até hoje associados com a ocorrência de cárie devido à falta de evidências que suportem essa relação[100], outros estreptococos, como os *S. mitis* e *S. sanguis*, também podem estar envolvidos com a desmineralização do esmalte, devido à sua capacidade de baixar o pH.

Os resultados obtidos a partir da análise da placa bacteriana demonstram que este biofilme apresenta uma composição microbiológica e interações complexas e muito pouco compreendidas. Diferentes cepas de *S. mutans* coletadas de indivíduos distintos apresentam cariogenicidade diferente[71]. Além disso, a quantidade de matriz extracelular interfere na porosidade e capacidade tampão da placa, determinando a queda do pH[103]. Por outro lado, não apenas a queda do pH influencia a desmineralização do esmalte, mas também o grau de saturação da placa com relação ao cálcio e fosfato[21, 22]. Portanto, além da composição microbiológica, a composição bioquímica da placa também influencia sua cariogenicidade.

A deficiência no estabelecimento de uma relação entre os estreptococos mutans na placa e a desmineralização *in situ* questiona a hipótese da placa específica, que considera

esses microorganismos como os principais vilões no desenvolvimento da cárie. As características que elevam estas bactérias como as número 1 em matéria de desmineralização do esmalte podem não ser tão importantes em alguns casos. A hipótese da placa ecológica, descrita por MARSH[74], parece ser a mais adequada para entender as relações entre o ambiente bucal e a ocorrência de cárie. Para FEJERSKOV[34], os níveis de estreptococos mutans na placa são nada mais que indicadores de que o pH do meio está baixo, devido à sua aciduricidade, e não devem ser o foco principal de atenção na prevenção da cárie. O acúmulo da placa bacteriana é que deve ser considerado nos programas preventivos, pois a cárie é fruto de um desequilíbrio nos processos de des e remineralização resultante do metabolismo bacteriano sobre a superfície do dente.

7. CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos e considerando-se o delineamento experimental utilizado, pode-se concluir que:

- Após 4 dias a placa bacteriana acumulada *in situ*, em condição de alto desafio cariogênico, já causou desmineralização do esmalte, avaliada através da microdureza superficial. A cariogenicidade aumentou progressivamente com o aumento do período de acúmulo de placa;

- O fluxo salivar e a capacidade tampão da saliva não apresentaram relação com a desmineralização do esmalte *in situ* nos períodos avaliados;

- Os níveis salivares de estreptococos mutans não apresentaram relação com a desmineralização do esmalte *in situ* nos períodos avaliados e não foi possível estabelecer influência desses níveis na colonização dos blocos de esmalte com essas bactérias;

- Não foi encontrada relação entre a desmineralização do esmalte *in situ* e a presença de estreptococos mutans nas amostras de placa bacteriana ou a sua porcentagem em relação às bactérias totais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. ABELSON, D.C.; MANDEL, I.D. The effect of saliva on plaque pH *in vivo*. **J. dent. Res.**, v.60, n.9, p.1634-8, Sept. 1981.
2. AMAECHI, B.T.; HIGHAM, S.M.; EDGAR, W.M. Efficacy of sterilisation methods and their effect on enamel demineralisation. **Caries Res.**, v.32, n.6, p.441-6, Nov./Dec. 1998.
3. ARENDS, J.; SCHUTHOF, J.; JONGEBLOED, W.G. Microhardness indentations on artificial white spot lesions. **Caries Res.**, v.13, n.5, p.290-7, 1979.
4. ARENDS, J.; SCHUTHOF, J.; JONGEBLOED, W.G. Lesion depth and microhardness indentations on artificial white spot lesions. **Caries Res.**, v.14, p.190-5, 1980.
5. BALAKRISHNAN, M.; SIMMONDS, R.S.; TAGG, J.R. Dental caries is a preventable infectious disease. **Aust. dent. J.**, v.45, n.4, p.235-45, Dec. 2000.
6. BENELLI, E.M. et al. *In situ* anticariogenic potential of glass ionomer cement. **Caries Res.**, v.27, p.280-4, 1993.
7. BIER, O. **Microbiologia e imunologia.** 24.ed. São Paulo, Melhoramentos, 1985.
8. BOWDEN, G.H. The role of microbiology in models of dental caries: reaction paper. **Adv. dent. Res.**, v.9, n.3, p.255-69, Nov. 1995.
9. BOWDEN, G.H. Does assessment of microbial composition of plaque/saliva allow for diagnosis of disease activity of individuals? **Comm. Dent. oral Epid.**, v.25, n.1, p.76-81, Feb. 1997.
10. BOYAR, R.M. et al. The microflora associated with the development of initial enamel decalcification below orthodontic bands *in vivo* in children living in a fluoridated-water area. **J. dent. Res.**, v.68, n.12, p.1734-8, Dec. 1989.
11. BRETZ, W.A. et al. Relationship of microbial and salivary parameters with dental caries in Brazilian pre-school children. **Comm. Dent. oral Epid.**, v.20, n.5, p.261-4, Oct. 1992.
12. BRUDEVOLD, F. et al. Development of a new intraoral demineralization test. **Caries Res.**, v.18, p.421-9, 1984.
13. CALDWELL, R.C. et al. Semiquantitative studies of *in vitro* caries by microhardness

* Normas recomendadas para uso no âmbito da Universidade de São Paulo, com base no documento "Referências bibliográficas: exemplos", emanado do Conselho Superior do Sistema Integrado de Bibliotecas da USP, em reunião de 20 de setembro de 1990.

tests. **J. dent. Res.**, v.37, n.2, p.301-5, Apr. 1958.

14. CANTISANO, M.H. et al. Determinação do número de *Streptococcus mutans* na saliva de crianças com 6 anos de idade e diferentes experiências de cárie. **Estomat. Cult.**, v.13, n.1, p.44-8, jan./jun. 1983.
15. CHANDLER, N.P. Preparation of dental enamel for use in intraoral cariogenicity experiments. **J. Dent.**, v.18, n.1, p.54-8, Feb. 1990.
16. CLARKE, J.K. On the bacterial factor in the aetiology of dental caries. **Br. J. Exp. Pathol.**, v.5, p.141-6, 1924 apud LOESCHE, W.J. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. **Microbiol. Rev.**, v.50, n.4, p.353-80, Dec. 1986.
17. COYKENDALL, A.L. Proposal to elevate the subspecies of *Streptococcus mutans* to species status based on their molecular composition. **Int. J. System. Bacteriol.**, v.27, n.1, p.26-30, 1977.
18. COYKENDALL, A.L. Classification and identification of the viridans streptococci. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.2, p.315-28, 1989.
19. CROSSNER, C.-G.; HOLM, A.-K. Saliva tests in the prognosis of caries in children. **Acta Odont. Scand.**, v.37, n.3, p.135-8, 1977.
20. CURY, J.A.; GIL, P.S.S. Identificação dos pacientes com potencial cariogênico. **Rev. gaúcha Odont.**, v.36, n.2, p.106-8, mar./abr. 1988.
21. CURY, J.A.; REBELLO, M.A.B.; DEL BEL CURY, A.A. In situ relationship between sucrose exposure and the composition of dental plaque. **Caries Res.**, v.31, n.5, p.356-60, 1997.
22. CURY, J.A. et al. Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in the presence of sucrose or glucose and fructose. **Caries Res.**, v.34, p.491-7, 2000.
23. DE SOET, J.J.; DE GRAAFF, J. Microbiology of carious lesions. **Dent. Update**, v.25, n.8, p.319-24, Oct. 1998.
24. DOWD, F.J. Saliva and dental caries. **Dent. Clin. N. Amer.**, v.43, n.4, p.579-97, Oct. 1999.
25. DREIZEN, S. et al. Sodium and potassium as constituents of human salivary buffers. **J. dent. Res.**, v.32, n.4, p.497-503, Aug. 1953.
26. DUCHIN, S.; VAN HOUTE, J. Relationship of *Streptococcus mutans* and lactobacilli to incipient smooth surface dental caries in man. **Arch. oral Biol.**, v.23, p.779-86, 1978.
27. EDGAR, W.M.; HIGHAM, S.M.; MANNING, R.H. Saliva stimulation and caries prevention. **Adv. dent. Res.**, v.8, n.2, p.239-45, July 1994.

28. EDWARDSSON, S. Characteristics of caries-inducing human streptococci resembling *Streptococcus mutans*. **Arch. oral Biol.**, v.13, p.637-46, 1968.

29. ERICSSON, Y. Clinical investigations of the salivary buffering action. **Acta Odont. Scand.**, v.17, n.2, p.131-65, Sept. 1959.

30. ERICSSON, Y.; HARDWICK, L. Individual diagnosis, prognosis and counselling for caries prevention. **Caries Res.**, v.12, p.94-102, 1978. Supplement 1.

31. FEAGIN, F.; KOULOURIDES, T.; PIGMAN, W. The characterization of enamel surface demineralization, remineralization, and associated hardness changes in human and bovine material. **Arch. oral Biol.**, v.14, n.12, p.1407-17, Dec. 1969.

32. FEATHERSTONE, J.D.B.; MELLBERG, J.R. Relative rates of progress of artificial carious lesions in bovine, ovine and human enamel. **Caries Res.**, v.15, n.1, p.109-14, 1981.

33. FEATHERSTONE, J.D.B.; ZERO, D.T. An *in situ* model for simultaneous assessment of inhibition of demineralization and enhancement of remineralization. **J. dent. Res.**, v.71, p.804-10, Apr. 1992. Special Issue.

34. FEJERSKOV, O. Concepts of dental caries and their consequences for understanding the disease. **Comm. Dent. oral Epid.**, v.25, n.1, p.5-12, Feb. 1997.

35. FEJERSKOV, O.; THYLSTRUP, A. Diferentes conceitos sobre a cárie dentária e suas implicações. In: THYLSTRUP, A.; FEJERSKOV, O. **Cariologia clínica.** 3.ed. São Paulo, Ed. Santos, 2001. Cap.9, p.209-17.

36. FITZGERALD, R.J.; KEYES, P.H. Demonstration of the etiologic role of streptococci in experimental caries in the hamster. **J. Amer. dent. Ass.**, v.61, n.1, p.9-19, July 1960.

37. FUSHIDA, C.E.; CURY, J.A. Estudo *in situ* do efeito da freqüência de ingestão de *Coca-Cola* na erosão do esmalte-dentina e reversão pela saliva. **Rev. Odont. USP**, v.13, n.2, p.127-34, abr./jun. 1999.

38. GOLD, O.G.; JORDAN, H.V.; VAN HOUTE, J. A selective medium for *Streptococcus mutans*. **Arch. oral Biol.**, v.18, n.2, p.1357-64, July/Dec. 1973.

39. GOMES, T.A.T.; CAMPOS, L.C.; TRABULSI, L.R. Diagnóstico bacteriológico. In: TRABULSI, L.R. et al., eds. **Microbiologia.** 3.ed. São Paulo, Atheneu, 1999. Cap.16, p.131-41.

40. HALL, A.F. et al. Determination of plaque pH changes within the trough of an *in situ* appliance used to study mineral changes in early carious lesions. **Caries Res.**, v.31, n.1, p.50-4, 1997.

41. HARDIE, J.M. Oral microbiology: current concepts in the microbiology of dental caries and periodontal disease. **Brit. dent. J.**, v.172, n.7, p.271-8, Apr. 1992.

42. HARPER, D.S.; LOESCHE, W.J. Growth and acid tolerance of human dental plaque bacteria. **Arch. oral Biol.**, v.29, n.10, p.843-8, 1984.

43. HAY, D.I. Salivary factors in caries models. **Adv. dent. Res.**, v.9, n.3, p.239-43, Nov. 1995.

44. HEINTZE, U.; BIRKHED, D.; BJÖRN, H. Secretion rate and buffer effect of resting and stimulated whole saliva as a function of age and sex. **Swed. dent. J.**, v.7, p.227-38, 1983.

45. HODGE, H.C.; MCKAY, H. The microhardness of teeth. **J. Amer. dent. Ass.**, v.20, n.2, p.227-33, Feb. 1933.

46. HOLDEMAN, L.V.; CATO, E.P.; MOORE, W.E.C., eds. **Anaerobe laboratory manual**. 4.ed. Blacksburg, V.P.I. Anaerobe Laboratory, 1977.

47. HOLMEN, L. et al. A polarized light microscopic study of progressive stages of enamel caries in vivo. **Caries Res.**, v.19, n.4, p.348-54, 1985.

48. HOLMEN, L. et al. A scanning electron microscopic study of progressive stages of enamel caries in vivo. **Caries Res.**, v.19, n.4, p.355-67, 1985.

49. HOLMEN, L. et al. The effect of regular professional plaque removal on dental caries *in vivo* – a polarized light and scanning electron microscope study. **Caries Res.**, v.22, n.4, p.250-6, 1988.

50. HONKALA, E. et al. Factors predicting caries risk in children. **Scand. J. dent. Res.**, v.92, n.2, p.134-40, Apr. 1984.

51. KASHKET, S.; YASKELL, T.; LOPEZ, L.R. Prevention of sucrose-induced demineralization of tooth enamel by chewing sorbitol gum. **J. dent. Res.**, v.68, n.3, p.460-2, Mar. 1989.

52. KEENE, H.J. Sampling of cariogenic microorganisms in human populations. **Oral Microbiol. Immunol.**, v.1, p.7-12, 1986.

53. KEYES, P.H. The infectious and transmissible nature of experimental dental caries. Findings and implications. **Arch. oral Biol.**, v.1, n.4, p.304-20, 1960.

54. KEYES, P.H. Recent advances in dental research. Bacteriology. **Int. dent. J.**, v.12, n.4, p.443-64, Dec. 1962.

55. KLOCK, B.; KRASSE, B. Microbial and salivary conditions in 9- to 12-year-old children. **Scand. J. dent. Res.**, v.85, n.1, p.56-63, Jan. 1977.

56. KLOCK, B.; KRASSE, B. A comparison between different methods for prediction of caries activity. **Scand. J. dent. Res.**, v.87, n.2, p.129-39, Apr. 1979.

57. KLOCK, B.; SVANBERG, M.; PETERSSON, L.G. Dental caries, mutans streptococci, lactobacilli, and saliva secretion rate in adults. **Comm. Dent. oral Epid.**, v.18, n.5, p.249-52, 1990.

58. KNOOP, F.; PETERS, G.C.; EMERSON, W.B. A sensitive pyramidal diamond tool for indentation measurements. **J. Res. Nat. Bur. Stds.**, v.23, p.39-61, 1939 apud NEWBRUN, E.; PIGMAN, W. The hardness of enamel and dentine. **Aust. dent. J.**, v.5, n.4, p.210-7, Aug. 1960.

59. KOULOURIDES, T.; CHIEN, M.C. The ICT *in situ* experimental model in dental research. **J. dent. Res.**, v.71, p.822-7, Apr. 1992. Special issue.

60. KOULOURIDES, T.; HOUSCH, T. Hardness testing and microradiography of enamel in relation to intraoral de- and remineralisation. In: LEACH, S.A.; EDGAR, W.M., eds. **Demineralisation and remineralisation of the teeth.** Oxford, IRL Press, c1983. p.255-72.

61. KOULOURIDES, T.; VOLKER, J.F. Changes of enamel microhardness in the human mouth. **Al. J. Med. Sci.**, v.1, p.435-7, 1964 apud KOULOURIDES, T.; CHIEN, M.C. The ICT *in situ* experimental model in dental research. **J. dent. Res.**, v.71, p.822-7, Apr. 1992. Special issue.

62. KOULOURIDES, T. et al. An intraoral model used for studies of fluoride incorporation in enamel. **J. oral Pathol.**, v.3, p.185-96, 1974.

63. KRASSE, B. **Risco de cáries**. 2.ed. São Paulo, Quintessence, 1988.

64. LAGERLÖF, F.; OLIVEBY, A. Caries-protective factors in saliva. **Adv. dent. Res.**, v.8, n.2, p.229-38, July 1994.

65. LARMAS, M. Saliva and dental caries: diagnostic tests for normal dental practice. **Int. dent. J.**, v.42, n.4, p.199-208, Aug. 1992.

66. LINGSTRÖM, P. et al. Effect of frequent consumption of starchy food items on enamel and dentin demineralization and on plaque pH *in situ*. **J. dent. Res.**, v.73, n.3, p.652-60, Mar. 1994.

67. LOESCHE, W.J. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. **Microbiol. Rev.**, v.50, n.4, p.353-80, Dec. 1986.

68. MACPHERSON, L.M.D.; MACFARLANE, T.W.; STEPHEN, K.W. An intra-oral appliance study of the plaque microflora associated with early enamel demineralization. **J. dent. Res.**, v.69, n.11, p.1712-6, Nov. 1990.

69. MACPHERSON, L.M.D. et al. The effect of sucrose application and implantation of mutans streptococci on the microbial composition of three-week experimental plaque – an *in situ* study. **J. dent. Res.**, v.69, n.11, p.1706-11, Nov. 1990.

70. MACPHERSON, L.M.D. et al. Comparison of the plaque microflora from natural and appliance-borne enamel surfaces. **Caries Res.**, v.25, n.1, p.58-64, 1991.

71. MACPHERSON, L.M. et al. Assessment of the cariogenic potential of *Streptococcus mutans* strains and its relationship to *in vivo* caries experience. **Oral Microbiol. Immunol.**, v.7, n.3, p.142-7, June 1992.

72. MANNING, R.H.; EDGAR, W.M. Intra-oral models for studying de- and remineralization in man: methodology and measurement. **J. dent. Res.**, v.71, p.895-900, Apr. 1992. Special issue.

73. 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.**, v.27, n.6, p.467-73, 1993.

74. MARSH, P.D. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. **Adv. dent. Res.**, v.8, n.2, p.263-71, July 1994.

75. MARSH, P.D. The role of microbiology in models of dental caries. **Adv. dent. Res.**, v.9, n.3, p.244-54, Nov. 1995.

76. MELLBERG, J.R. Hard-tissue substrates for evaluation of cariogenic and anti-cariogenic activity *in situ*. **J. dent. Res.**, v.71, p.913-9, Apr. 1992. Special issue.

77. MILES, A.A; MISRA, S.S.; IRWIN, J.O. The estimation of the bactericidal power of the blood. **J. Hyg.**, v.38, p.732-49, 1938.

78. MUNDORFF, S.A. et al. Correlations between numbers of microflora in plaque and saliva. **Caries Res.**, v.24, p.312-7, 1990.

79. NEWBRUN, E.; PIGMAN, W. The hardness of enamel and dentine. **Aust. dent. J.**, v.5, n.4, p.210-7, Aug. 1960.

80. NEWBRUN, E.; TIMBERLAKE, P.; PIGMAN, W. Changes in microhardness of enamel following treatment with lactate buffer. **J. dent. Res.**, v.38, n.2, p.293-300, Mar./Apr. 1959.

81. OGAARD, B.; ROLLA, G.; ARENDS, J. *In vivo* progress of enamel and root surface lesions under plaque as a function of time. **Caries Res.**, v.22, p.302-5, 1988.

82. OSTROM, C.A. et al. Microbial characterization of an experimental cariogenic plaque in man. **J. dent. Res.**, v.56, n.6, p.550-8, June 1977.

83. PICKERILL, H.P. **The prevention of dental caries and oral sepsis.** Londres, Baillière, Tindall & Cox, 1912 apud NEWBRUN, E.; PIGMAN, W. The hardness of enamel and dentine. **Aust. dent. J.**, v.5, n.4, p.210-7, Aug. 1960.

84. SANSONE, C. et al. The association of mutans streptococci and non-mutans streptococci capable of acidogenesis at a low pH with dental caries on enamel and root surfaces. **J. dent. Res.**, v.72, n.2, p.508-16, Feb. 1993.

85. SCHEIE, A.A. et al. Microbial composition, pH-depressing capacity and acidogenicity of 3-week smooth surface plaque developed on sucrose-regulated diets in man. **Caries Res.**, v.18, n.1, p.74-86, 1984.

86. SEPPÄ, L.; PÖLLÄNEN, L.; HAUSEN, H. *Streptococcus mutans* counts obtained by a dip-slide method in relation to caries frequency, sucrose intake and flow rate of saliva. **Caries Res.**, v.22, n.4, p.226-9, 1988.

87. SHIP, J.A.; FOX, P.C.; BAUM, B.J. How much saliva is enough? 'Normal' function defined. **J. Amer. dent. Ass.**, v.122, n.3, p.63-9, Mar. 1991.

88. SOUDER, W. SCHOONOVER, I.C. Abrasion and solution of teeth: a sensitive, visual method for detecting these injuries. **J. Amer. dent. Ass.**, v.30, n.20, p.1725-34, Nov. 1943.

89. SREEBNY, L.M. Saliva in health and disease: an appraisal and update. **Int. dent. J.**, v.50, n.3, p.140-61, June 2000.

90. STAAT, R.H. et al. Effect of dietary sucrose levels on the quantity and microbial composition of human dental plaque. **J. dent. Res.**, v.54, n.4, p.872-80, July/Aug. 1975.

91. STOOKEY, G.K. Reactor paper concerning patient selection and appliance design in intra-oral models. **J. dent. Res.**, v.71, p.911-2, Apr. 1992. Special issue.

92. SULLIVAN, A. et al. Number of mutans streptococci or lactobacilli in a total dental plaque sample does not explain the variation in caries better than the numbers in stimulated whole saliva. **Comm. Dent. oral Epid.**, v.24, n.3, p.159-63, June 1996.

93. SUMMANEN, P. et al. **Wadsworth anaerobic bacteriology manual**. 5.ed. Belmont, Star Publishing Company, 1993.

94. TANZER, J.M. On changing the cariogenic chemistry of coronal plaque. **J. dent. Res.**, v.68, p.1576-87, Nov. 1989. Special issue.

95. TEN CATE, J.M.; VAN DE PLASSCHE-SIMONS, Y.M.; VAN STRIJP, A.J.P. Importance of model parameters in the assessment of intra-oral remineralization. **J. dent. Res.**, v.71, p.879-83, Apr. 1992. Special issue.

96. TENOVUO, J. Salivary parameters of relevance for assessing caries activity in individuals and populations. **Comm. Dent. oral Epid.**, v.25, n.1, p.82-6, Feb. 1997.

97. THYLSTRUP, A. et al. A light and scanning electron microscopic study of enamel decalcification in children living in a water-fluoridated area. **J. dent. Res.**, v.69, n.10, p.1626-33, Oct. 1990.

98. TOGELIUS, J. et al. *Streptococcus mutans* in saliva: intraindividual variations and relation to the number of colonized sites. **Acta Odont. Scand.**, v.42, n.3, p.157-63, 1984.

99. TUKIA-KULMALA, H.; TENOVUO, J. Intra- and inter-individual variation in salivary flow rate, buffer effect, lactobacilli, and mutans streptococci among 11- and 12-year-old schoolchildren. **Acta Odont. Scand.**, v.51, n.1, p.31-7, Feb. 1993.

100. VAN HOUTE, J. Bacterial specificity in the etiology of dental caries. **Int. dent. J.**, v.30, n.4, p.305-26, 1980.

101. VAN HOUTE, J. Microbiological predictors of caries risk. **Adv. dent. Res.**, v.7, n.2, p.87-96, Aug. 1993.

102. VAN HOUTE, J. Role of micro-organisms in caries etiology. **J. dent. Res.**, v.73, n.3, p.672-81, Mar. 1994.

103. 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.**, v.68, n.3, p.451-9, Mar. 1989.

104. VAN HOUTE, J. et al. *In vitro* acidogenic potential and mutans streptococci of human smooth-surface plaque associated with initial caries lesions and sound enamel. **J. dent. Res.**, v.70, n.12, p.1497-502, Dec. 1991.

105. VERNON, P.G. et al. The effect of study design on *in situ* treatment of carious enamel lesions. **J. dent. Res.**, v.71, p.814-8, Apr. 1992. Special issue.

106. VON DER FEHR, F.R.; LÖE, H.; THEILADE, E. Experimental caries in man. **Caries Res.**, v.4, n.2, p.131-48, 1970.

107. WEYNE, S. Cariologia. In: BARATIERI, L.N. et al. **Dentística:** procedimentos preventivos e restauradores. 2.ed. São Paulo, Ed. Santos, 1992. Cap.1, p.1-42.

108. WHILEY, R.A. et al. *Streptococcus downei* sp. nov. for strains previously described as *Streptococcus mutans* serotype h. **Int. J. System. Bacteriol.**, v.38, n.1, p.25-9, Jan. 1988.

109. WHITE, D.J. Reactivity of fluoride dentifrices with artificial caries. I. Effects on early

lesions: F uptake, surface hardening and remineralization. **Caries Res.**, v.21, p.126-40, 1987.

110. WILSON, R.F.; ASHLEY, F.P. Identification of caries risk in schoolchildren: salivary buffering capacity and bacterial counts, sugar intake and caries experience as predictors of 2-year and 3-year caries increment. **Brit. dent. J.**, v.167, n.3, p.99-102, Aug. 1989.

111. ZERO, D.T. Adaptações na placa dental. In: BOWEN, W.H.; TABAK, L.A. **Cariologia para a década de 90.** São Paulo, Ed. Santos, 1995. p.333-49.

112. ZERO, D.T. *In situ* caries models. **Adv. dent. Res.**, v.9, n.3, p.214-30, Nov. 1995.

113. ZERO, D.T.; VAN HOUTE, J.; RUSSO, J. Enamel demineralization by acid produced from endogenous substrate in oral streptococci. **Arch. oral Biol.**, v.31, n.4, p.229-34, 1986.

114. ZERO, D.T.; VAN HOUTE, J.; RUSSO, J. The intra-oral effect on enamel demineralization of extracellular matrix material synthesized from sucrose by *Streptococcus mutans*. **J. dent. Res.**, v.65, n.6, p.918-23, June 1986.

ANEXOS

ANEXO 1

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Bauru, 6 de abril de 2001

Ilmo Sr.
Prof. Dr. José Eduardo de Oliveira Lima
FOB - USP

Senhor Professor

O projeto de pesquisa denominado **Papel da saliva na remineralização de lesões iniciais de cárie, formadas in situ pela placa de 12, 24 e 48 horas**, de autoria da C.D. Lívia Maria Andaló Tenuta e desenvolvido sob sua orientação, foi submetido à apreciação deste Comitê e aprovado na reunião de 25 de fevereiro de 1999.

Recentemente recebemos a informação da autora de que havia a necessidade de modificar o projeto devido a questionamentos surgidos na avaliação dos resultados de estudo piloto desenvolvido, ao mesmo tempo em que solicitava a reavaliação quanto aos aspectos éticos.

O projeto foi devolvido ao relator inicial que reavaliou as modificações propostas incluindo a alteração do título que passou a ser: **Influência de fatores salivares e microbiológicos na desmineralização do esmalte in situ.**

O parecer do relator, aprovando as modificações, foi apresentado e discutido na reunião do Comitê do dia 29 de março último, tendo sido aceito por unanimidade

Atenciosamente

Prof. Dr. Roberto L. Maringoni
Coordenador

ANEXO 2

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

CARTA DE INFORMAÇÃO AO VOLUNTÁRIO

I. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Embora muito se saiba a respeito da cárie dentária, alguns aspectos com relação ao seu desenvolvimento continuam obscuros, como o tempo mínimo necessário para a ocorrência da desmineralização do esmalte e para sua posterior remineralização. Além disso, a relação entre nível salivar de bactérias cariogênicas e sua contagem na placa bacteriana com desmineralização do esmalte ainda não é totalmente entendida.

Os estudos *in situ* têm sido amplamente utilizados na pesquisa de fatores envolvidos no desenvolvimento de cáries, pois simulam as condições da cavidade bucal e os riscos envolvidos podem ser controlados.

Considerando a necessidade de informações adicionais a respeito do processo de desenvolvimento de cárie, o objetivo deste trabalho é avaliar a desmineralização do esmalte que ocorre *in situ* pela ação da placa bacteriana de 4 dias, 7 dias e 10 dias, bem como relacionar a ocorrência da desmineralização com o nível salivar e na placa bacteriana de estreptococos mutans.

II. PROCEDIMENTOS QUE SERÃO REALIZADOS NA PESQUISA

Quinze voluntários serão selecionados através de anamnese e exame clínico, sendo eliminados aqueles que preencherem pelo menos um critério de exclusão.

Dez dias antes e durante o experimento os voluntários realizarão sua higiene bucal normal, mas deverão apenas utilizar dentifrício não fluoretado fornecido pela pesquisadora responsável.

Os blocos de esmalte bovino que serão utilizados *in situ* foram armazenados por no mínimo 30 dias em uma solução de formol a 2% pH 7,0.

Os voluntários utilizarão um dispositivo palatino de acrílico contendo 4 blocos de esmalte bovino cobertos por uma tela plástica durante os períodos de 4 dias, 7 dias e 10 dias. Entre um período e outro será dado um intervalo de no mínimo 4 dias. Durante os períodos experimentais, os voluntários deverão gotejar sobre os blocos de esmalte, em

horários previamente determinados, uma solução de sacarose a 20%, necessária para o desenvolvimento de placa bacteriana cariogênica sob a tela plástica e sobre os blocos. Após cada período experimental, o dispositivo palatino será recolhido para coleta da placa bacteriana e dos blocos desmineralizados, que serão submetidos à avaliação da perda da microdureza.

Durante os períodos de 4 dias, 7 dias e 10 dias, os voluntários deverão comparecer à clínica odontológica a cada 2 dias para receberem uma solução de sacarose a 20% recém-preparada.

Os voluntários deverão seguir com atenção as instruções fornecidas, devendo estar cientes de que o não cumprimento dessas instruções poderá prejudicar os resultados da pesquisa.

III. RISCOS POSSÍVEIS

O experimento não oferece riscos aos voluntários. O período experimental é curto e não há prejuízo pela utilização do dentifrício não fluoretado, visto que todos os voluntários são alunos e funcionários do curso de odontologia e possuem instruções adequadas de higiene bucal.

O gotejamento da solução de sacarose sobre os blocos será feita com o dispositivo palatino fora da cavidade bucal, sem risco de potencial cariogênico para os outros dentes.

IV. FORMA DE ACOMPANHAMENTO E ASSISTÊNCIA

A qualquer momento os voluntários poderão requerer explicações ou informações à respeito do experimento.

Os voluntários terão total liberdade de se recusarem a participar ou retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalidade alguma e sem prejuízo ao seu cuidado.

ANEXO 3

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Pelo presente instrumento que atende às exigências legais, o(a) senhor(a) _____, portador da cédula de identidade número _____, após leitura minuciosa da carta de informação ao voluntário, devidamente explicada pela profissional em seus mínimos detalhes, ciente dos serviços e procedimentos aos quais será submetido, não restando quaisquer dúvidas a respeito do lido e explicado, firma seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO em concordância em participar da pesquisa proposta no que lhe é cabível, conforme a carta de informação ao voluntário.

Fica claro que o voluntário ou seu representante legal, podem a qualquer momento retirar seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO e deixar de participar do estudo alvo da pesquisa e ciente que todo trabalho realizado torna-se informação confidencial guardada por força do sigilo profissional (Art. 9º do Código de Ética Odontológica).

Por estarem entendidos e conformados, assinam o presente termo.

Maringá, de de 2000.

_____ _____

Voluntário

Lívia Maria Andaló Tenuta
Pesquisadora Responsável

ANEXO 4

INSTRUÇÕES AOS VOLUNTÁRIOS

1. O dispositivo intrabucal deve ser utilizado durante todo o dia e à noite, sendo removido da boca apenas durante às refeições ou quando o voluntário for ingerir alguma coisa, inclusive água.
2. Quando estiver fora da boca, em nenhum momento o dispositivo deve ser deixado à seco. Guarde-o no porta-aparelho, com um pedaço de algodão molhado na água deionizada fornecida sobre a área dos blocos de esmalte.
3. Procure evitar que o dispositivo fique fora da boca por um período prolongado, restringindo-se ao tempo necessário para a alimentação (máximo de 1 hora).
4. Anote na "Descrição de Uso" os horários em que o dispositivo ficou fora da boca.
5. Durante toda a fase experimental, utilize o dentifrício não fluoretado fornecido.
6. Realize a higiene bucal normalmente.
7. Escove **apenas** a porção do dispositivo que **não** contém os blocos de esmalte; para isso, utilize o **dentifrício não fluoretado** e enxágüe com a **água deionizada** fornecida.
8. **Não** utilize produtos para bochecho ou outros agentes tópicos de qualquer natureza na cavidade bucal durante a fase experimental.
9. **Não** utilize vitaminas ou suplementos sistêmicos que contenham flúor durante a fase experimental.
10. Quando o dentifrício não fluoretado, algodão ou água deionizada estiverem acabando, entre em contato com a pesquisadora responsável para que sejam repostos.
11. Qualquer dúvida, entre em contato com a pesquisadora responsável.

Fase de desmineralização

1. Goteje a sacarose a cada 1h 30min, totalizando 10 vezes por dia, seguindo os horários descritos na "Descrição de Uso".
2. Para fazê-lo, remova o dispositivo da boca, coloque sobre o porta-aparelho e goteje uma gota da solução sobre cada bloco de esmalte, sem tocar a ponta do conta-gotas no dispositivo para evitar a contaminação da solução. Aguarde 5 minutos, para que a sacarose se difunda pela placa bacteriana, e retorne à cavidade bucal.

3. Se o primeiro gotejamento do dia não puder ser realizado às 8 horas, atrase todos os outros gotejamentos de acordo com o horário do primeiro, com um intervalo de 1h 30min entre eles, até totalizar 10 por dia.
4. Anote na "Descrição de Uso" o horário em que realizou o gotejamento.
5. Quando o horário de gotejamento coincidir com um período em que o dispositivo estiver fora da boca, realize o gotejamento 5 minutos antes de retornar o dispositivo para a boca. Os gotejamentos seguintes devem ser realizados no horário pré-determinado. **Não** goteje a sacarose e deixe por mais de 5 minutos sem colocar o dispositivo na boca.
6. A solução de sacarose deverá ser trocada a cada 2 dias, quando o voluntário devolve o frasco anterior e recebe um novo com sacarose recém-preparada.
7. O acúmulo de placa bacteriana sob a tela plástica nesta fase é desejável; **não** tente removê-la. A placa bacteriana será analisada quanto à sua composição microbiológica.

ANEXO 5 - Modelo de ficha de descrição de uso do dispositivo intrabucal

Descrição de uso do dispositivo intrabucal

Nome:
Fase: 4 dias
Período de descrição: / /00 a / /00

1. Anote aqui os horários em que você retirou o dispositivo da boca e o motivo:

Data	Horário remoção	Horário retorno	Motivo

2. Escreva o horário em que você realizou a aplicação de sacarose a 20%, procurando seguir o horário padrão:

Horário	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5
8:00					
9:30					
11:00					
12:30					
14:00					
15:30					
17:00					
18:30					
20:00					
21:30					

3. Anote aqui qualquer observação ou intercorrência durante o uso do dispositivo intrabucal que você julgar importante.

_____
_____
_____
_____

ANEXO 6 - Média e desvio padrão da microdureza Knoop inicial e final de cada bloco de esmalte utilizado por 4 dias.

Volunt.	Local	4 dias			
		inicial		final	
		Média	D.P.	Média	D.P.
1	**1**	355,91	8,93	232,54	49,61
1	**2**	311,33	10,08	179,28	11,78
1	**3**	351,09	5,26	289,44	14,93
1	**4**	333,44	14,48	282,75	17,08
2	**1**	320,64	15,69	341,57	13,08
2	**2**	345,03	15,76	348,65	15,24
2	**3**	354,20	2,81	351,00	12,57
2	**4**	354,11	11,91	340,23	23,95
3	**1**	361,96	6,36	398,23	11,70
3	**2**	351,49	8,88	368,36	10,37
3	**3**	341,95	6,61	378,01	12,89
3	**4**	307,09	12,99	310,15	5,18
4	**1**	357,48	8,11	278,60	32,64
4	**2**	324,33	17,87	238,01	9,34
4	**3**	339,94	9,26	287,33	10,05
4	**4**	348,19	11,81	317,23	12,17
5	**1**	319,87	16,28	62,66	13,27
5	**2**	330,23	18,79	183,78	45,58
5	**3**	360,66	15,08	224,64	8,18
5	**4**	345,61	8,02	121,35	30,18
6	**1**	338,25	11,64	370,47	13,02
6	**2**	304,68	10,03	296,98	25,45
6	**3**	374,63	1,88	322,10	40,66
6	**4**	351,49	8,63	346,21	7,51
7	**1**	333,17	7,94	342,45	12,59
7	**2**	324,44	8,79	261,08	24,49
7	**3**	356,79	6,18	361,01	7,27
7	**4**	352,94	13,82	356,73	13,76
8	**1**	358,11	7,78	177,93	49,39
8	**2**	324,47	26,16	220,79	37,83
8	**3**	343,68	13,31	264,94	13,22

ANEXO 6 - Continuação

Volunt.	Local	4 dias			
		inicial		final	
		Média	D.P.	Média	D.P.
8	**4**	345,96	9,46	359,28	13,68
9	**1**	348,78	11,25	365,66	9,55
9	**2**	321,02	3,10	352,03	5,13
9	**3**	341,10	8,54	356,52	8,00
9	**4**	355,25	8,10	381,60	14,90
10	**1**	348,94	6,09	361,65	7,05
10	**2**	327,71	5,94	264,75	9,39
10	**3**	328,88	7,66	330,00	7,19
10	**4**	365,94	7,42	261,94	9,68
11	**1**	355,65	10,80	367,12	12,84
11	**2**	318,95	8,22	303,13	8,81
11	**3**	348,35	7,27	295,11	35,18
11	**4**	335,76	14,72	358,60	12,54
12	**1**	352,74	8,82	194,77	15,39
12	**2**	342,32	9,17	190,64	32,29
12	**3**	296,10	11,13	179,88	57,56
12	**4**	362,58	3,98	367,57	6,31
13	**1**	291,91	13,05	264,25	15,26
13	**2**	335,71	5,19	264,59	24,72
13	**3**	354,29	20,86	341,12	25,15
13	**4**	359,50	10,93	273,58	17,60

ANEXO 7 - Média e desvio padrão da microdureza Knoop inicial e final de cada bloco de esmalte utilizado por 7 dias.

		7 dias			
Volunt.	**Local**	**inicial**		**final**	
		Média	D.P.	Média	D.P.
1	**1**	353,58	4,07	344,16	10,17
1	**2**	361,95	5,81	363,63	7,48
1	**3**	343,43	14,12	398,83	23,11
1	**4**	322,37	12,22	280,31	20,30
2	**1**	298,24	14,82	356,58	10,17
2	**2**	346,76	4,73	345,64	8,94
2	**3**	354,73	11,61	386,41	10,57
2	**4**	339,55	5,96	361,11	10,67
3	**1**	351,45	7,36	297,33	18,94
3	**2**	344,52	21,88	338,56	12,14
3	**3**	365,20	2,77	182,73	28,51
3	**4**	324,97	8,04	231,37	9,10
4	**1**	351,46	15,49	203,85	9,99
4	**2**	298,04	11,26	260,91	38,07
4	**3**	329,33	17,46	263,31	13,12
4	**4**	357,46	7,45	250,23	8,13
5	**1**	305,78	12,12	239,18	14,66
5	**2**	329,37	4,33	104,56	6,14
5	**3**	357,39	14,43	227,89	25,22
5	**4**	350,36	12,11	32,72	11,66
6	**1**	310,24	14,31	148,03	51,12
6	**2**	349,80	0,00	275,91	13,80
6	**3**	356,24	9,50	152,97	25,79
6	**4**	334,96	9,74	282,24	7,80
7	**1**	323,30	7,82	336,40	20,06
7	**2**	365,98	9,03	208,30	52,92
7	**3**	348,57	1,69	382,07	8,56
7	**4**	340,14	5,98	349,08	11,13
8	**1**	359,81	10,53	253,08	35,46
8	**2**	352,88	12,36	347,30	12,48
8	**3**	318,24	10,80	280,81	28,32

ANEXO 7 - Continuação

Volunt.	Local	7 dias			
		inicial		final	
		Média	D.P.	Média	D.P.
8	**4**	333,85	10,99	282,39	11,48
9	**1**	348,03	7,08	91,60	13,46
9	**2**	330,51	13,42	251,65	5,50
9	**3**	359,38	15,50	210,22	28,93
9	**4**	324,39	7,26	144,61	39,14
10	**1**	375,83	10,38	399,47	21,24
10	**2**	327,94	18,19	345,57	6,33
10	**3**	341,09	7,85	386,55	14,30
10	**4**	354,06	10,55	382,33	15,63
11	**1**	320,90	9,53	343,71	3,98
11	**2**	360,68	7,21	334,50	12,57
11	**3**	345,41	21,13	386,38	9,37
11	**4**	353,57	3,47	371,68	8,84
12	**1**	290,89	22,01	78,42	9,34
12	**2**	341,32	4,87	229,31	21,30
12	**3**	345,25	5,82	21,08	4,65
12	**4**	371,84	13,26	166,02	49,20
13	**1**	338,02	13,04	320,81	24,38
13	**2**	355,47	2,66	384,18	7,81
13	**3**	352,07	7,29	387,13	10,49
13	**4**	312,15	15,52	301,86	14,09

ANEXO 8 - Média e desvio padrão da microdureza Knoop inicial e final de cada bloco de esmalte utilizado por 10 dias.

Volunt.	Local	10 dias			
		inicial		final	
		Média	D.P.	Média	D.P.
1	**1**	350,88	9,20	46,59	10,50
1	**2**	312,00	24,49	126,73	4,63
1	**3**	379,24	8,03	133,38	22,77
1	**4**	341,15	16,22	81,54	66,01
2	**1**	333,83	20,29	315,90	3,48
2	**2**	361,96	6,25	269,01	18,76
2	**3**	322,75	14,26	304,59	17,28
2	**4**	352,34	5,17	313,48	11,37
3	**1**	320,10	10,21	200,09	24,87
3	**2**	351,73	5,71	266,20	22,52
3	**3**	335,03	11,67	220,09	22,15
3	**4**	356,73	13,65	188,78	19,93
4	**1**	358,04	4,31	176,41	4,62
4	**2**	341,56	12,56	210,10	19,02
4	**3**	292,00	31,72	293,57	28,59
4	**4**	348,31	5,71	216,45	29,25
5	**1**	349,57	6,72	34,15	6,95
5	**2**	339,27	6,90	14,49	0,08
5	**3**	307,72	9,83	126,33	18,24
5	**4**	354,92	7,60	28,20	3,70
6	**1**	346,31	10,94	20,83	6,53
6	**2**	344,16	10,03	168,32	5,93
6	**3**	366,55	4,92	14,05	0,00
6	**4**	322,25	15,36	84,49	21,58
7	**1**	359,27	13,07	241,43	54,01
7	**2**	327,68	17,87	223,51	69,19
7	**3**	328,42	10,85	161,97	62,25
7	**4**	354,01	9,04	107,99	15,37
8	**1**	345,39	10,75	299,62	7,58
8	**2**	368,10	12,28	154,90	32,46
8	**3**	329,94	4,23	25,74	4,21

ANEXO 8 - Continuação

Volunt.	Local	10 dias			
		inicial		final	
		Média	D.P.	Média	D.P.
8	**4**	296,65	26,69	40,85	9,41
9	**1**	351,08	4,18	220,48	25,34
9	**2**	363,41	11,28	289,58	8,00
9	**3**	324,89	4,39	42,01	12,68
9	**4**	341,68	7,70	245,53	16,24
10	**1**	343,58	10,77	96,03	15,74
10	**2**	320,76	12,89	220,18	17,82
10	**3**	353,56	1,42	237,53	10,03
10	**4**	355,48	4,13	216,55	41,61
11	**1**	359,99	5,30	389,53	15,93
11	**2**	318,50	20,03	280,48	26,98
11	**3**	331,64	3,27	337,69	12,08
11	**4**	348,98	7,89	393,73	11,32
12	**1**	353,49	12,09	15,29	1,35
12	**2**	324,04	12,74	154,35	27,07
12	**3**	363,88	14,70	29,21	23,51
12	**4**	338,95	5,40	78,89	11,72
13	**1**	336,71	9,76	164,12	38,28
13	**2**	302,31	12,99	252,53	53,71
13	**3**	360,62	3,71	58,45	4,58
13	**4**	348,15	10,87	304,09	7,43

ANEXO 9 - Média e desvio padrão da porcentagem de perda de dureza superficial dos quatro blocos de esmalte utilizados *in situ* nos 3 períodos experimentais. Valores negativos indicam aumento na dureza.

Voluntário	**% perda de dureza superficial**					
	4 dias		**7 dias**		**10 dias**	
	Média	D.P.	Média	D.P.	Média	D.P.
1	27,46%	13,21%	-0,22%	12,08%	71,76%	12,16%
2	-0,69%	4,40%	-8,63%	8,27%	11,93%	9,53%
3	-6,59%	4,54%	23,97%	20,55%	35,80%	9,38%
4	18,26%	7,74%	26,13%	12,79%	31,63%	22,25%
5	56,84%	19,51%	54,23%	31,09%	84,24%	17,02%
6	2,13%	9,62%	36,55%	21,13%	78,76%	21,02%
7	3,62%	10,63%	6,70%	24,44%	46,19%	17,80%
8	25,33%	22,55%	14,60%	11,62%	62,40%	36,02%
9	-6,61%	2,41%	48,62%	21,12%	43,18%	30,06%
10	10,91%	15,43%	-8,24%	3,56%	43,83%	19,11%
11	2,55%	9,81%	-4,21%	8,15%	-2,73%	10,77%
12	31,74%	22,22%	63,78%	25,96%	79,18%	19,67%
13	14,57%	9,57%	-2,41%	7,70%	41,04%	33,37%
Média (D.P.)	**13,81%** (18,10%)		**19,30%** (25,08%)		**48,25%** (26,44%)	

ANEXO 10 - Número de estreptococos do grupo mutans (mutans) e bactérias anaeróbias e facultativas (total) por mililitro de suspensão de placa bacteriana.

Volunt.	4 dias			7 dias			10 dias		
	mutans[a]	**total**[a]	**%**[b]	**mutans**	**total**	**%**	**mutans**	**total**	**%**
1	$1,0 \times 10^3$	$5,8 \times 10^6$	**0,017%**	$2,3 \times 10^3$	$1,1 \times 10^6$	**0,209%**	$2,8 \times 10^3$	$3,5 \times 10^6$	**0,080%**
2	———[c]	$5,0 \times 10^5$	———	———	$1,5 \times 10^6$	———	———	$3,0 \times 10^6$	———
3	———	$5,5 \times 10^5$	———	$5,0 \times 10^2$	$3,0 \times 10^6$	**0,017%**	———	$7,5 \times 10^5$	———
4	$5,0 \times 10^3$	$4,3 \times 10^6$	**0,116%**	———	$3,5 \times 10^6$	———	$2,5 \times 10^3$	$3,5 \times 10^6$	**0,071%**
5	$5,8 \times 10^3$	$1,7 \times 10^7$	**0,034%**	$1,7 \times 10^3$	$2,3 \times 10^6$	**0,074%**	$1,3 \times 10^4$	$4,0 \times 10^7$	**0,033%**
6	$1,3 \times 10^3$	$1,2 \times 10^6$	**0,108%**	$1,5 \times 10^3$	$9,5 \times 10^6$	**0,016%**	———	$2,0 \times 10^7$	———
7	———	$3,8 \times 10^6$	———	$1,0 \times 10^2$	$2,0 \times 10^5$	**0,050%**	———	$6,8 \times 10^6$	———
8	———	$5,8 \times 10^6$	———	———	$1,4 \times 10^6$	———	———	$1,0 \times 10^6$	———
9	———	$3,0 \times 10^6$	———	$5,0 \times 10^2$	$8,8 \times 10^5$	**0,057%**	———	$4,3 \times 10^6$	———
10	———	$5,3 \times 10^6$	———	———	$6,5 \times 10^5$	———	$1,0 \times 10^4$	$1,5 \times 10^7$	**0,067%**
11	$2,3 \times 10^3$	$2,3 \times 10^6$	**0,100%**	$2,5 \times 10^4$	$5,3 \times 10^6$	**0,472%**	———	$3,0 \times 10^7$	———
12	$2,5 \times 10^2$	$3,3 \times 10^6$	**0,008%**	$5,0 \times 10^2$	$4,3 \times 10^6$	**0,012%**	$5,0 \times 10^2$	$4,0 \times 10^6$	**0,013%**
13	$5,0 \times 10^2$	$1,9 \times 10^6$	**0,026%**	$3,5 \times 10^3$	$4,8 \times 10^6$	**0,073%**	$2,2 \times 10^3$	$1,5 \times 10^6$	**0,147%**

[a] Contagem em duplicata, realizada pela técnica da contagem na gota[77] modificada

[b] Porcentagem de estreptococos mutans em relação ao total de bactérias

[c] Ausência de crescimento (< 50 UFC/mL)

ABSTRACT

ABSTRACT

In situ enamel demineralization after 4, 7 and 10 days of plaque accumulation and possible influence of salivary and bacteriological factors

The aim of this study was to evaluate the *in situ* enamel demineralization during 4, 7 and 10 days and some of the factors influencing the process. Before the beginning of the *in situ* phase, a stimulated whole saliva sample was collected from 13 volunteers for 5 min and the salivary secretion rate, buffering capacity and numbers of mutans streptococci were estimated. A palatal appliance containing 4 polished bovine enamel blocks (4 X 4 X 2 mm) covered by a plastic mesh was worn on 3 separate periods of 4, 7 and 10 days, throughout which time a non-fluoridated dentifrice was used. A 20% sucrose solution was dripped extra-orally onto the enamel blocks 10 times a day. All enamel blocks were evaluated by the analysis of enamel surface microhardness before and after *in situ* demineralization, using a 50 g, Knoop load for 5 s. At the end of each period, plaque covering the enamel blocks was collected and analyzed for the % of mutans streptococci of the total viable counts. Paired-t test showed that initial and final microhardness were statistically different at the three periods evaluated ($p<0.05$). Change in surface microhardness (%CSMH) was 13.8%, 19.3% and 48.3% during the 4, 7 and 10-day periods, respectively. There was no statistically significant difference on the %CSMH between 4 and 7 days, according to analysis of variance and Tukey's test ($p<0.05$). Correlation between %CSMH and the salivary and bacteriological factors evaluated was determined using Pearson's and Spearman's coefficient of correlation ($p<0.05$). The %CSMH was not significantly correlated to the salivary factors determined initially. In about half of the plaque samples analyzed mutans streptococci were not detected, although the enamel showed some demineralization. The % of mutans streptococci in plaque samples was not correlated to its numbers in saliva. There was no statistically significant correlation between the %CSMH and the % of mutans streptococci in plaque over the enamel blocks. The presence of these bacteria in plaque significantly increased enamel demineralization when compared to the blocks where they were not detected only at 4 days, according to Mann-Whitney test ($p<0.05$). The results showed *in situ* enamel demineralization after short periods of plaque accumulation, which was not related to the salivary factors evaluated nor to the numbers of mutans streptococci in saliva or plaque.