

Influência de carboidratos e do íon citrato na fermentação e na síntese de polissacarídeos extracelulares insolúveis da placa dentária *in vitro*

Influence of carbohydrates and citrate ion on fermentation and synthesis of extracellular insoluble polysaccharides of dental plaque *in vitro*

Almenara de Souza FONSECA-SILVA*
Carlos Eduardo PINHEIRO**

*Doutora em Clínica Odontológica, área de Prótese Dental – Faculdade de Odontologia de Piracicaba/UNICAMP
** Professor Titular da Área de Bioquímica da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP.

RELEVÂNCIA CLÍNICA

Os carboidratos apresentam potencial cariogênico, por estimularem as atividades de fermentação e de síntese de polissacarídeos extracelulares insolúveis pelas bactérias. Por outro lado, o íon citrato demonstra a capacidade de inibir estas atividades *in vitro*, podendo ser considerado um possível candidato, como agente natural, no controle da placa dentária.

RESUMO

Em razão da reconhecida capacidade dos componentes da dieta afetarem o metabolismo bacteriano, foi avaliada a influência dos carboidratos frequentemente consumidos como glicose, sacarose, frutose e dextrina e do íon citrato sobre a fermentação e a síntese de polissacarídeos extracelulares insolúveis da placa dentária *in vitro*. Os resultados indicaram que a glicose mostrou a maior atividade de produção ácida e a sacarose promoveu a maior síntese de polissacarídeos extracelulares insolúveis quando comparadas com os outros carboidratos. O íon citrato foi capaz de inibir significativamente a fermentação e mostrou ser um ótimo inibidor da síntese de polissacarídeos extracelulares insolúveis.

PALAVRAS-CHAVE

Placa dentária; fermentação; síntese de polissacarídeos insolúveis; carboidratos; citrato.

INTRODUÇÃO

A placa bacteriana desempenha importante papel na produção de cáries e doenças periodontais no ser humano (Pinheiro²⁵, 1983; Van Houte³³, 1994). É constituída por um agregado heterogêneo de microrganismos sobre a superfície dos dentes, que se organizam em sítios de ecologia bem definida, em equilíbrio dinâmico com o meio ambiente. Portanto, a atividade bacteriana modifica o seu meio ambiente, sendo também, por ele influenciada (Listgarten¹⁹, 1988; Morhart

& Fitzgerald²¹, 1976; Theilade³¹, 1977).

A atividade metabólica da placa engloba inúmeros processos de degradação molecular, como também de síntese de polímeros de alto peso molecular. Contudo, no que se refere à cárie dentária, a fermentação e a síntese de polissacarídeos extracelulares insolúveis assumem papel predominante (Geddes¹³, 1975; Guggenheim¹⁶, 1970; Kleinberg¹⁷, 1970; Sonju & Rolla³⁰, 1973).

Os carboidratos de modo geral são os substratos de eleição dos microrganismos da placa, tanto como fonte energética, quanto como material para síntese de polímeros moleculares. Nesse aspecto, a sacarose tem recebido um destaque especial, pela sua alta capacidade fermentativa e de síntese de polissacarídeos extracelulares (Newbrun²³, 1972; Rolla et al.²⁷, 1985). Todavia, outros carboidratos como glicose, frutose, lactose, maltose e as próprias dextrinas, são capazes também de serem metabolizados pelos microrganismos, contribuindo para a produção final de produtos metabólicos comumente encontrados na placa bacteriana (Birkhed², 1978; Frostell¹¹, 1973; Grobler¹⁵, 1982). Por outro lado, determinados alimentos como queijo e algumas substâncias encontradas nos alimentos como taninos (chá) e citratos (frutas cítricas) são capazes de agir como agentes cariostáticos (Elvin-Lewis et al.¹⁰, 1980; Pavarini et al.²⁴, 1981; Silva et al.²⁹, 1986), contribuindo naturalmente para a prevenção da cárie.

Este trabalho teve como objetivo, o estudo da atividade metabólica da placa bacteriana *in vitro*, considerando a fermentação e a síntese de polissacarídeos extracelulares insolúveis, frente a diferentes tipos de carboidratos sob influência do íon citrato.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta de placa

Dez voluntários (quatro do sexo feminino e seis do sexo masculino), com idade entre dez e treze anos, participaram do estudo. Foi instruído a eles que não escovassem seus dentes durante três dias antes da coleta da placa, sendo esta realizada nos laboratórios da Faculdade de Odontologia de Piracicaba -

Unicamp, utilizando-se, para isso, espátulas de Hollebacks números 3 e 3s, passando-as sobre a superfície dentária e removendo a placa. A seguir foi feito um "pool" o qual foi armazenado em frascos de vidro esterilizados e imersos em gelo picado para serem efetuados os testes e análises químicas referentes à fermentação e à síntese de polissacarídeos insolúveis.

Preparo da suspensão de placa dentária

Após a pesagem realizada em uma balança eletrônica digital (Acate, modelo BCM 1100), a placa dentária foi homogeneizada em tampão fosfato 0,01M, pH 7,0, na concentração de 1ml de tampão para 10mg de placa fresca e por meio de um pistilo de teflon, adaptado em um tubo de vidro, com oito a dez movimentos no sentido vaivém executados manualmente.

Posteriormente, a suspensão obtida foi colocada em um béquer, armazenada em gelo picado e mantida em constante agitação por meio de um agitador magnético em baixa velocidade.

Fermentação

O meio de incubação, para os testes de fermentação, consistiu de: tampão fosfato 0,01M em pH 6,5 (1,0ml); solução de carboidrato (glicose, sacarose e frutose) 0,12M ou dextrina 0,5% (0,5ml); água destilada (2,5ml) e suspensão de placa (1,0ml). Nos testes de inibição, foi adicionado citrato de sódio nas concentrações finais de 0,05 ou 0,1M, em substituição à água destilada.

Os meios de incubação colocados em frascos Erlenmeyer, previamente esterilizados, foram levados à estufa a 37°C, por duas horas. Os frascos tempo zero (sem fermentação), após a adição da suspensão de placa, foram titulados com uma solução de hidróxido de sódio 0,05N, até o ponto de viragem, utilizando como indicador uma solução alcoólica de vermelho de cresol a 0,1%. O mesmo procedimento foi realizado com os frascos testes, após o período de incubação.

A quantidade de ácidos formados pela fermentação da placa foi obtida pela diferença entre a titulação dos frascos tempo zero e dos frascos testes levados à estufa.

Síntese de polissacarídeos extracelulares insolúveis

O meio de incubação para a síntese de polissacarídeos extracelulares insolúveis (PEI) consistiu de: tampão fosfato 0,1M em pH 7,0 (0,2ml); solução de carboidrato (glicose, sacarose e frutose) 1M ou dextrina 5% (0,2ml); água destilada (0,1ml) e suspensão de placa (0,5ml). Nos testes de inibição, foi utilizado o citrato de sódio nas concentrações finais de 0,05 e 0,1M em substituição à água destilada.

Os meios de incubação foram colocados em tubos de centrifugação de plástico com tampa, capacidade para 1,5ml e levados à estufa a 37°C, por dezoito horas. Os tubos tempo zero foram levados ao congelador.

Após o período de incubação dos tubos testes e o descongelamento dos tubos tempo zero, ambos foram centrifugados a 10.000 rpm durante dez minutos. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado suspenso em 1,0ml de água destilada e centrifugado novamente. O sobrenadante foi novamente descartado, as paredes do tubo adequadamente secas com papel absorvente e o precipitado foi suspenso em 0,5ml de solução de hidróxido de potássio a 1N, homogeneizado por vibração e levado à estufa a 37°C, durante uma hora.

Para dosagem de carboidratos totais (Dubois et al.⁶, 1956)

foi retirado 0,1ml da suspensão alcalina e transferida para um tubo de ensaio onde foram adicionados: água destilada (0,5ml); solução de fenol a 5% (0,5ml); ácido sulfúrico (5,0ml).

A leitura espectrofotométrica foi feita em 490nm, após 30 minutos da adição de ácido sulfúrico. A curva padrão para dosagem de carboidratos totais foi feita com solução padronizada de glicose.

Análise estatística

A presença de valores significativos entre os diferentes carboidratos na ausência e na presença de citrato foi detectada pela análise de variância a dois critérios e a comparação de médias entre os grupos pelo teste de Tukey, ambos ao nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Os resultados da fermentação dos diferentes carboidratos pela placa bacteriana *in vitro*, na ausência e na presença do citrato, estão expressos na Tabela 1. A comparação entre os carboidratos mostrou que na ausência de citrato a fermentação da glicose produziu a maior quantidade de ácidos, seguida pela sacarose. A fermentação variou com diferenças significantes entre si, com exceção entre a frutose e dextrina. Na presença do citrato, nas concentrações de 0,05 e 0,1M, houve uma redução proporcional na fermentação de todos os carboidratos.

Avaliando o efeito do citrato sobre a atividade fermentativa, observa-se que não houve diferenças significativas entre as duas concentrações testadas. O aumento de duas vezes na concentração do inibidor, não acarretou aumento da inibição (Tabela 2).

A comparação dos resultados da síntese de PEI a partir de carboidratos pela placa *in vitro*, na ausência e na presença de citrato, estão expressos na Tabela 3. Na ausência de citrato houve uma diferença significativa entre a síntese de PEI da glicose, sacarose e dextrina. As diferenças entre frutose e glicose e frutose e dextrina, não foram significativas. Houve também, uma mudança de comportamento na síntese de PEI entre os carboidratos na presença do citrato. Os valores de glicose e sacarose apresentaram diferenças na ausência e na concentração de 0,1M de citrato, mas não apresentaram diferenças na concentração de 0,05M. Isto pode significar que a redução da síntese de PEI pela sacarose foi mais sensível à ação do citrato do que pela glicose. A frutose foi o carboidrato que se apresentou mais sensível à ação do citrato. Na concentração de 0,05M a inibição de síntese de PEI foi de 78,2% comparada com a glicose (19,2%), sacarose (30,0%) e a dextrina (20,0%).

Avaliando o efeito do citrato sobre a atividade de síntese de PEI, pode-se verificar que ao contrário dos resultados observados na fermentação, estes apresentaram diferenças significativas entre as duas concentrações do inibidor, isto é, a redução da síntese de PEI foi proporcional à concentração do inibidor (Tabela 4).

DISCUSSÃO

Os componentes da dieta indiscutivelmente modificam as características qualitativas e quantitativas da placa e o metabolismo bacteriano (Kleinberg¹⁷, 1970). A agressividade da placa bacteriana está relacionada ao seu poder acidogênico, sua adesividade e seu crescimento, que são influenciados pelo

Tabela 1 - Valores médios da fermentação de carboidratos pela placa bacteriana *in vitro*, na ausência e na presença de citrato (0,05 e 0,1 M).

Carboidratos	ml de NaOH 0,05N / 10 mg de placa		
	Citrato		
	0	0,05 M	0,1 M
Glicose	0,733 a	0,590 a	0,580 a
Sacarose	0,697 b	0,552 b	0,532 b
Frutose	0,600 c	0,482 c	0,455 c
Dextrina	0,565 c	0,450 c	0,435 c

Médias seguidas por letras distintas na vertical diferem entre si a nível de significância de 5%.

Tabela 2 - Valores médios da fermentação de carboidratos pela placa bacteriana *in vitro*, em função de diferentes concentrações de citrato.

Citrato	ml de NaOH 0,05N / 10 mg de placa			
	Carboidratos			
	Glicose	Sacarose	Frutose	Dextrina
0	0,733 a	0,697 a	0,600 a	0,565 a
0,05 M	0,590 b	0,552 b	0,482 b	0,450 b
0,1 M	0,580 b	0,532 b	0,455 b	0,435 b

Médias seguidas por letras distintas na vertical diferem entre si a nível de significância de 5%.

metabolismo dos carboidratos pelos microrganismos (Ashley & Wilson¹, 1977; Grobler¹⁵, 1982; Rolla²⁰, 1989). Por outro lado, existem componentes da dieta que podem restringir o metabolismo, atuando como fatores anticariogênicos (Bowen¹, 1994).

Considerando a fermentação da placa, foi verificado que os carboidratos avaliados possuem potencial cariogênico. Isto foi confirmado clinicamente por Neff²² (1967) e Frostell¹¹ (1973) e também por meio de trabalhos laboratoriais como aqueles realizados por Birkhed² (1978), utilizando suspensão de placa e Duguid⁶ (1985), utilizando microrganismos isolados. Entretanto foi possível observar diferenças entre eles no que se refere à produção de ácidos.

A adição do citrato na concentração de 0,05M ao meio de incubação, provocou uma redução nos valores de fermentação. Este efeito também foi observado *in vivo* por Duke et al.⁹ (1988) e Duggal et al.⁷ (1995). O efeito benéfico da adição de pequenas quantidades de citrato às soluções acidogênicas baseia-se na conhecida propriedade do citrato de inibir a fosfofrutoquinase e a enolase, que são enzimas glicolíticas, reduzindo com isso os ácidos formados na placa dentária pela fermentação dos carboidratos.

Entretanto a duplicação da concentração do inibidor, não promoveu qualquer resposta na placa. O metabolismo glicolítico dos microrganismos da placa bacteriana é pouco sensível à ação do íon citrato, aproximadamente 20% para todos os carboidratos, tanto na concentração de 0,05M como de 0,1M. Isto indica que existe uma saturação do processo metabólico sensível ao inibidor. Deste fato pode ser sugerida que a ação anticariogênica do citrato não deve estar ligada ao bloqueio do ataque ácido ao esmalte.

Tabela 3 - Valores médios de síntese de PEI, a partir de carboidratos pela placa bacteriana *in vitro*, na ausência e na presença de citrato (0,05 e 0,1 M).

Carboidratos	µg de carboidrato / 10 mg de placa		
	Citrato		
	0	0,05 M	0,1 M
Glicose	222,33 b	179,53 a	102,21 a
Sacarose	266,58 a	186,82 a	58,07 b
Frutose	211,94 bc	46,12 c	22,56 bc
Dextrina	183,40 c	145,57 b	49,77 c

Médias seguidas por letras distintas na vertical diferem entre si a nível de significância de 5%.

Tabela 4 - Valores médios de síntese de PEI a partir de carboidratos, pela placa bacteriana *in vitro*, em função de diferentes concentrações de citrato.

Citrato	µg de carboidrato / 10 mg de placa			
	Carboidratos			
	Glicose	Sacarose	Frutose	Dextrina
0	222,33 a	266,58 a	211,94 a	183,40 a
0,05 M	179,53 b	186,82 b	46,12 b	145,57 b
0,1 M	102,21 c	58,07 c	22,56 b	49,77 c

Médias seguidas por letras distintas na vertical diferem entre si a nível de significância de 5%.

Os PEI da placa bacteriana conferem-lhe propriedades importantes, responsáveis pela sua adesividade, coesão e difusibilidade (Guggenheim¹⁶, 1970; Menaker et al.²⁰, 1984), portanto a avaliação da capacidade de síntese de PEI pela placa, pode dar o indicio de sua potencialidade cariogênica.

Os resultados indicam que as bactérias na presença de sacarose produziram a maior quantidade de PEI comparado aos outros carboidratos, mas nem por isso eles deixam de contribuir, para a produção total de PEI da placa. Apesar da ênfase que tem sido dado ao papel da sacarose na síntese de polissacarídeos extracelulares insolúveis pela placa, não deve ser esquecido de que outros carboidratos podem também, sintetizar estes polímeros, como demonstrado por Leach et al.¹⁸ (1969), Critcheley⁴ (1969) e Grenby et al.¹⁴ (1989). Trabalhos clínicos realizados por Scheinin & Makinen²⁸ (1971), Van der Hoeven³² (1974) e Dubois et al.⁵ (1984) demonstraram a capacidade de vários carboidratos em promover o acúmulo de placa.

Ao contrário do que foi observado na fermentação, a síntese de PEI é altamente sensível à inibição pelo íon citrato, principalmente a frutose na concentração de 0,05M e todos os outros carboidratos na concentração de 0,1M.

Julgando pelos resultados obtidos pela síntese *in vitro* de PEI, talvez a atividade anticariogênica do citrato esteja relacionada com a formação e o crescimento da placa. Se esta hipótese for confirmada por trabalhos clínicos, possivelmente no futuro, o citrato possa ser usado topicamente para o controle da placa, uma vez que ele é um produto natural e efetivo em doses baixas. De acordo com Garrocho et al.¹² (1985), o citrato usado a 2% associado à dieta cariogênica, realmente, conseguiu reduzir em 50% a incidência de cárie em ratos.

O fato da síntese de PEI pela placa *in vitro*, quando a frutose é o substrato, ser altamente sensível à inibição pelo citrato, parece não estar ainda descrito. Estudos posteriores, utilizando culturas puras de microrganismos, serão necessários para elucidar este fenômeno metabólico.

Os resultados obtidos sugerem que tanto as atividades de fermentação como de síntese de PEI são estimuladas pelos carboidratos, normalmente encontrados na dieta e por conseguinte, todos eles são cariogênicos. O íon citrato mostrou ser um ótimo inibidor da síntese de PEI *in vitro*, portanto pode ser considerado como um recurso no controle da placa bacteriana.

CONCLUSÃO

Diante do exposto e de acordo com a metodologia empregada no presente estudo, podemos concluir:

1. A glicose produziu a maior quantidade de ácidos e a sacarose a maior quantidade de polissacarídeos extracelulares insolúveis, com diferenças significativas quando comparadas aos outros carboidratos.
2. O íon citrato foi capaz de inibir significativamente a fermentação e a síntese de polissacarídeos extracelulares insolúveis.

ABSTRACT

By reason of the recognized ability of the diet components affect the bacterial metabolism, it was evaluated the influence of carbohydrates usually consumed as glucose, sucrose, fructose and dextrin, and the action of citrate on fermentation and synthesis of extracellular insoluble polysaccharides of dental plaque, *in vitro*. The results indicated that the glucose showed the largest acid production activity and sucrose promoted the greatest synthesis of insoluble polysaccharides, when compared with the other carbohydrates. The citrate was able to inhibit the carbohydrate fermentation and showed itself a great inhibitor of synthesis of extracellular insoluble polysaccharides.

KEY WORDS

Dental plaque; fermentation; insoluble polysaccharides synthesis; sugars; citrate.

REFERÊNCIAS

1. ASHLEY, F.P.; WILSON, R.F. The relationship between dietary sugar experience and the quantity and biochemical composition of dental plaque in man. *Arch. Oral Biol.*, Oxford, v. 22, n. 7, p. 409-414, jul. 1977.
2. BIRKHED, D. Automatic titration method for determination of acid production from sugars and sugar alcohols in small samples of dental plaque material. *Caries Res.*, Basel, v. 12, n. 3, p. 128-136, mar. 1978.
3. BOWEN, W.H. Food components and caries. *Adv. Dent. Res.*, Washington, v. 8, n. 2, p. 215-220, jul. 1994.
4. CRITCHLEY, P. The formation of extracellular polysaccharides from glucose in monkey plaque *in vivo*. *Caries Res.*, Basel, v. 3, n. 3, p. 205-206, mar. 1969.
5. DUBOIS, L.M. et al. A comparison between the effects of sucrose and fructose intake on early plaque formation. *Clin. Prev. Dent.*, Philadelphia, v. 6, n. 6, p. 6-8, nov./dec. 1984.
6. DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for the determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, Washington, v. 28, n. 3, p. 350-356, mar. 1956.
7. DUGGAL, M.S.; TAHMASSEBI, J.F.; POLLARD, M.A. Effect of addition of 0.103% citrate to a blackcurrant drink on plaque pH *in vivo*. *Caries Res.*, Basel, v. 29, n. 1, p. 75-79, jan./feb. 1995.
8. DUGUID, R. *In vitro* acid production by the oral bacterium *Streptococcus mutans* 10449 in various concentrations of glucose, fructose and sucrose. *Arch. Oral Biol.*, Oxford, v. 30, n. 4, p. 319-324, apr. 1985.
9. DUKE, S.A. MOLYNEUX, K.; JACKSON, R.J. The effect of citrate in drinks on plaque pH. *Br. Dent. J.*, London, v. 164, n. 3, p. 80-82, feb. 1988.
10. ELVIN-LEWIS, M.; VITALE, M.; KOPJAS, T. Anticariogenic potential of commercial tea. *J. Prev. Dent.*, New York, v. 6, p. 273-284, aug. 1980.
11. FROSTELL, G. Effects of mouth rinses with sucrose, glucose, fructose, lactose, sorbitol and lysasin® on the pH of dental plaque. *Odontol. Revy.* Malmö, v. 24, n. 3, p. 217-226, out. 1973.
12. GARROCHO, A. A. et al. Efeito do citrato de cálcio a 2% na incidência de cárie em ratos. *Arq. Cent. Est. Curso Odontol. Univ. Fed. Minas Gerais*, Belo Horizonte, v. 22, n. 2, p. 65-75, jul./dez. 1985.
13. GEDDES, D.A. Acids produced by human dental plaque metabolism *in situ*. *Caries Res.*, Basel, v. 9, n. 2, p. 98-109, feb. 1975.
14. GRENBY, T.H.; PHILLIPS, A.; MISTRY, M. Studies of the dental properties of lactitol compared with five other bulk sweeteners *in vitro*. *Caries Res.*, Basel, v. 23, n. 5, p. 315-319, sept./oct. 1989.
15. GROBLER, S.R. Carbohydrate fermentation by human dental plaque. *J. Dent. Assoc. S. Afr.*, Cape Town, v. 37, n. 1, p. 13-18, jan. 1982.
16. GUGGENHEIM, B. Extracellular polysaccharides and microbial plaque. *Int. Dent. J.*, Guildford, v. 20, n. 4, p. 657-678, dec. 1970.
17. KLEINBERG, I. Formation and accumulation of acid on the tooth surface. *J. Dent. Res.*, Alexandria, v. 49, n. 6, p. 1300-1316, nov./dec. 1970.
18. LEACH, S. A. et al. Studies on the polysaccharides of the matrix of dental plaque. *Caries Res.*, Basel, v. 3, n. 3, p. 206, out. 1969.
19. LISTGARTEN, M.A. The role of dental plaque in gingivitis and periodontitis. *J. Clin. Periodontol.*, Copenhagen, v. 15, n. 8, p. 485-487, sept. 1988.
20. MENAKER, L.; MORHART, R. E.; NAVIA, J. M. *Cáries dentárias: bases biológicas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1984. 461p.
21. MORHART, R. E.; FITZGERALD, R. J. Nutritional determinants of the ecology of the oral flora. *Dent. Clin. North Am.*, Philadelphia, v. 20, n. 3, p. 473-489, jul. 1976.
22. NEFF, D. Acid production from different carbohydrate sources in human-plaque *in situ*. *Caries Res.*, Basel, v. 1, n. 1, p. 78-87, jan. 1967.
23. NEWBRUN, E. Extracellular polysaccharides synthesized by glucosyl transferases of oral streptococci: composition and susceptibility to hydrolysis. *Caries Res.*, Basel, v. 6, n. 2, p. 132-147, feb. 1972.
24. PAVARINI, A.; LIMA J.E.O.; PINHEIRO, C.E. Efeito da administração de citrato na incidência de cáries em ratos. *Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent.*, São Paulo, v. 35, n. 1, p. 78-81, jan./fev. 1981.
25. PINHEIRO, C.E. Curso de bioquímica da cárie dental. IV- Fatores etiológicos: microorganismos. *Rev. Paul. Odontol.*, São Paulo v. 5, n. 4, p. 50-61, jul./ago. 1983.
26. RÖLLA, G. Why is sucrose so cariogenic? The role of glycosyltransferase and polysaccharides. *Scand. J. Dent. Res.*, Copenhagen, v. 97, n. 2, p. 115-119, apr. 1989.
27. RÖLLA, G.; SCHEIE, A.A.; CIARDI, J.E. Role of sucrose in plaque formation. *Scand. J. Dent. Res.*, Copenhagen, v. 93, n. 2, p. 105-111, apr. 1985.
28. SCHEININ, A.; MÄKINEN, K.K. The effect of various sugars on the formation and chemical composition of dental plaque. *Int. Dent. J.*, Guildford, v. 21, n. 3, p. 302-321, sept. 1971.
29. SILVA, M.F.A. et al. Effects of cheese on experimental caries in human subjects. *Caries Res.*, Basel, v. 20, n. 3, p. 263-269, may/june 1986.
30. SÖNJU, T.; RÖLLA, G. Chemical analysis of the acquired pellicle formed in two hours on cleaned human teeth *in vivo*. *Caries Res.*, Basel, v. 7, n. 1, p. 30-38, jan. 1973.
31. THEILADE, J. Development of bacterial plaque in the oral cavity. *J. Clin. Periodontol.*, Copenhagen, v. 4, n. 5, p. 1-12, dec. 1977.
32. VAN DER HOEVEN, J.S. A slime-producing microorganism in dental plaque of rats, selected by glucose feeding. *Caries Res.*, Basel, v. 8, n. 3, p. 193-210, out. 1974.
33. VAN HOUTE, J. Role of micro-organisms in caries etiology. *J. Dent. Res.*, Alexandria, v. 73, n. 3, p. 672-681, mar. 1994.