

## Parâmetros bioquímicos e microbiológicos e suas relações com a experiência de cárie em adolescentes saudáveis

### *Microbiological and biochemical parameters and their relationship with carie in healthy teenagers*

Thayza Christina Montenegro Stamford <sup>1</sup>  
 Daniela Marinho de Souza Pereira <sup>2</sup>  
 Luciana Cabral de Alcântara <sup>3</sup>  
 Geraldo Bosco Lindoso Couto <sup>4</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Odontologia Preventiva. Universidade Federal de Pernambuco. Av. Prof. Moraes Rêgo, s.n. Cidade Universitária. Recife, PE, Brasil. CEP: 50.670-420  
 E-mail: thayzastam@hotmail.com

<sup>2,4</sup> Pós-graduação em Ciências Biológicas. Universidade Federal de Pernambuco. Recife, PE, Brasil

<sup>3</sup> Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pernambuco. Recife, PE, Brasil

<sup>5</sup> Pós-graduação em Odontopediatria. Universidade Federal de Pernambuco. Recife, PE, Brasil

#### Abstract

*Objectives:* to establish a relationship between dental caries with the degree of *Streptococcus mutans* present in the salivary flow and saliva buffer ability in 111 healthy adolescents seen at the Pediatrics Outpatient Clinic of the Hospital das Clínicas de Pernambuco.

*Methods:* Intraoral examinations were performed and dental records filled to determine DMFS-S (Decayed, missing teeth and filled permanent dental surfaces). Following, saliva was collected to determine salivary flow and buffer ability. Front teeth were scrapped to quantify *Streptococcus mutans* present in the bacterial plaque.

*Results:* the population assessed had predominantly low caries activities with buffer ability of normal saliva and deficiency of salivary flow. The numbers of *S. mutans* in the bacterial plaque exceeded 105 CFU/mg in the majority of individuals in the population studied.

*Conclusions:* caries activity was inversely proportional to the buffer capacity and directly proportional to the presence of *Streptococcus mutans* in the bacterial plaque. This low carie activity could be derived from the daily tooth-brushing with fluor dentifrices.

**Key words** Dental caries, Bacteria, *Streptococcus mutans*

#### Resumo

*Objetivos:* verificar a relação da experiência da doença cárie com o grau de ocorrência de *Streptococcus mutans*, o fluxo salivar e a capacidade tampão da saliva em 111 adolescentes saudáveis atendidos no Setor de Puericultura do Hospital das Clínicas de Pernambuco

*Métodos:* realizou-se o exame intraoral e o preenchimento de ficha clínica, para determinação do índice CPO-S (Número de superfícies dentárias cariadas, perdidas ou com extração indicada e restauradas). Em seguida coletou-se a saliva para determinação do fluxo salivar e da capacidade tampão. A raspagem dos dentes anteriores foi realizada para quantificação de *Streptococcus mutans* presente na placa bacteriana.

*Resultados:* a população avaliada foi predominantemente de baixa atividade de cárie, apresentando capacidade tampão da saliva normal e fluxo salivar deficiente. O número de *S. mutans* da placa bacteriana foi superior a 105 UFC/mg, na maioria da população estudada.

*Conclusões:* a atividade de cárie foi inversamente proporcional à capacidade tampão e diretamente proporcional a presença de *Streptococcus mutans* presentes na placa bacteriana. A baixa atividade de cárie na população estudada pode ser atribuída à boa condição do meio bucal promovida pelo número de escovações diárias com dentufícios fluoretados.

**Palavras-chave** Cárie dentária, Bactérias, *Streptococcus mutans*.

## Introdução

A cárie dentária é uma doença infecto-contagiosa e incurável que acomete cerca de 95% da população mundial de forma diferente para cada indivíduo.<sup>1,2</sup> Para a instalação da cárie é necessária a interação de vários fatores como: o hospedeiro (dente e saliva); a microflora (placa bacteriana); o substrato cariogênico (carboidratos fermentáveis) e o fator tempo.<sup>3-5</sup>

Estudos microbiológicos demonstram que o *Streptococcus mutans* é um dos fatores necessários para o início e a progressão da lesão cariosa em crianças, logo após a erupção dos primeiros dentes decíduos.<sup>6-8</sup> Esse microrganismo é considerado o principal agente associado com o início e o desenvolvimento da lesão cariosa em humanos, embora não seja o único envolvido no processo.<sup>9-11</sup>

O *Streptococcus mutans* é o principal e mais virulento dos microrganismos cariogênicos, devido a suas características acidogênicas e acidúricas.<sup>8,12-14</sup> O *Streptococcus mutans* pela ação da enzima glicosiltransferase sintetiza polímeros de  $\alpha$ -glucan intracelular e extracelular, solúvel e insolúvel (glucano), utilizando a sacarose como fonte de carbono.<sup>15-17</sup> O glucano apresenta forças repulsivas, e, conseqüentemente, estabelece a ligação do microrganismo de forma irreversível ao dente, favorecendo a formação da placa bacteriana.<sup>18,19</sup> A permanência da placa bacteriana na superfície do esmalte dentário acarretará perda de minerais do dente, pela ação dos ácidos produzidos pelo metabolismo bacteriano, ocasionando a instalação da doença cárie.<sup>20,21</sup>

Em condições fisiológicas as superfícies bacterianas e dentárias têm predomínio de cargas negativas, e a saliva encontra-se saturada de íons cálcio e fosfato, o que favorece o estado cristalino da hidroxiapatita do esmalte dentário.<sup>12,20,22</sup> Os ácidos decorrentes do metabolismo bacteriano atuam reduzindo o pH da placa bacteriana, e ligam-se as hidroxilas da hidroxiapatita, favorecendo a formação de fosfato de cálcio, e a subseqüente dissolução do esmalte dentário.<sup>16,20,22,23</sup> Esse processo de desmineralização pode ser revertido com o aumento da concentração de íons cálcio e a normalização do pH.<sup>15,24,25</sup>

A caracterização da atividade de cárie é uma importante prática que deve ser utilizada durante a anamnese.<sup>26,27</sup> O cirurgião dentista pode estabelecer um melhor plano de tratamento, respeitando as condições de cada caso, e também monitorar os efeitos das medidas preventivas mais utilizadas.<sup>2,12,27,28</sup>

O presente estudo teve por objetivo verificar a

relação da experiência da doença cárie com o grau de ocorrência de *Streptococcus mutans*, o fluxo salivar e a capacidade tampão da saliva em adolescentes saudáveis.

## Métodos

A pesquisa foi realizada em 111 crianças de 12 a 14 anos de idade, saudáveis, que não estavam fazendo uso de corticóides, antiinflamatórios ou drogas antimicrobianas, atendidas, no período de 1 ano, de abril de 2000 a abril de 2001, no setor de Puericultura do Hospital das Clínicas de Pernambuco, Brasil. Houve autorização prévia do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Centro de Ciências da Saúde (CCS), e os responsáveis pelos adolescentes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido. Foi utilizado um questionário, para obtenção de dados relacionados à renda familiar, dieta, escovação dentária e uso de pasta de dente e fio dental. Para atenuar a influência de fatores socioeconômicos e alimentícios, foram selecionados os pacientes com renda familiar entre dois e quatro salários mínimos que realizavam escovação dentária três vezes ao dia e tinham uma dieta cariogênica (ingestão de doces acima de três vezes ao dia entre as refeições).

As cepas de *Streptococcus mutans* foram isoladas da placa bacteriana de acordo com a metodologia descrita por Stamford *et al.*<sup>9</sup> O material coletado foi transportado em tubo de ensaio contendo meio líquido de Extrato de Triplicase Cisteína Bacitracina (TYCB), e posteriormente diluído ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ ) em solução fisiológica esterilizada. Para cada diluição foram semeadas alíquotas de 0,1 ml, em triplicata, em placas de Petri contendo 15ml do meio Agar Mítus Salivarius Bacitracina (MSB), incubadas em anaerobiose por 48 horas, a 37° C.

As colônias de *Streptococcus mutans* isoladas foram identificadas em três etapas abrangendo as seguintes fases: características morfológicas, microscopia ótica (microscópio Modelo Wild-M20EB) e testes bioquímicos com o Kit API 20Strep System (Bio Mérieux Marcy-Létoile, France). Os sorotipos de *Streptococcus mutans* foram identificados por testes bioquímicos descritos por Shklair e Keene.<sup>29</sup> A contagem de *S. mutans* foi realizada levando-se em consideração apenas os sorotipos "c" e "d/g", os quais apresentam alta virulência relacionada ao processo carioso devido as suas características bioquímicas.

A saliva foi coletada pelo método descrito por Krasse.<sup>2</sup> A salivação foi estimulada pela mastigação de uma goma de mascar de parafina (sem sabor).

Inicialmente a goma foi colocada na boca do paciente e deixada por dois minutos, sendo a saliva acumulada nesse período e em seguida expelida. Depois a goma foi mastigada pelo paciente durante cinco minutos e toda a saliva produzida, nesse período, foi expelida em tubos de plástico (50 ml) estéreis e transportadas imersas em gelo para posteriores estudos laboratoriais.

O fluxo salivar foi calculado em ml/minuto, levando-se em consideração o tempo total (minutos) de estimulação e a quantidade final da saliva armazenada nos tubos de plástico estéreis (ml). A capacidade tampão foi determinada misturando-se 1,0 ml de saliva com 3,0 mL de HCl 5 mM, em tubos de ensaio, verificando-se então o pH final. A interpretação e a determinação dos escores atribuídos foram realizados de acordo com Krasse.<sup>2</sup>

Foi realizado exame clínico intra-oral com o auxílio de odontoscópio e sonda exploradora estéril, sob iluminação artificial, para determinar as condições de integridade das superfícies dentais. A determinação do CPO-S foi realizada e analisada como descrito pela World Health Organization (WHO).<sup>30</sup>

Os dentes presentes na cavidade bucal foram divididos em superfícies da seguinte forma: molares e pré-molares, com cinco superfícies cada (oclusal, mesial, distal, vestibular e lingual ou palatina); incisivos e caninos, com quatro superfícies cada (mesial, distal, vestibular, lingual ou palatina). No caso de diagnóstico de extração ou extração indicada, anotaram-se todas as faces nessa condição. Superfícies que apresentavam manchas brancas ativas ou inativas também foram consideradas como comprometidas pelo processo cariioso.

Os exames foram realizados por três cirurgiões-dentistas, previamente calibrados. Para esse treinamento, empregou-se a técnica do consenso. Segundo essa técnica, havendo discordância, os examinadores discutem até chegar a um consenso quanto à interpretação do critério relativo àquela condição. A Organização Mundial da Saúde (OMS)<sup>31</sup> considera aceitável, para a maioria das avaliações, a discordância em torno de 10% a 15%. Em relação à condição dental, as discordâncias interexaminadores foram de 2,9%.

Para o cálculo das discordâncias interexaminadores, foram realizados 11 re-exames de um total

de 111 exames, o que equivale a 10% de elementos amostrais re-examinados. Em relação à condição dental, as discordâncias interexaminadores foram de 0,6%, valor que permite assegurar confiabilidade estatística aos resultados.

A análise da significância estatística das dependências entre as relações verificadas foi realizada com o teste qui-quadrado de Pearson. Os cálculos de todos os testes foram realizados com a ajuda do SPSS for Windows, release 12.0 e apenas as relações com valor de  $p$  menor ou igual a 0,05 foram consideradas estatisticamente significantes.

O arquivo de dados foi trabalhado em função das variáveis existentes na ficha clínica como Índice CPO-S, fluxo salivar, capacidade tampão da saliva e grau de ocorrência do *S. mutans* sorotipo "c" e "d/g".

## Resultados

Na Tabela 1 pode-se verificar que a população avaliada apresenta predominância de baixa atividade de cárie (41,8%) e de alto índice de *S. mutans* (45,8%). Os adolescentes avaliados como ausentes de cárie mostram reduzido índice de *S. mutans* na placa bacteriana (13,5%). Condição oposta é observada na população com alta atividade de cárie (14,5%). Por outro lado, 22,5% da população com baixa atividade de cárie apresenta alto índice da bactéria. A análise estatística mostra que existe uma interdependência proporcional ( $p < 0,05$ ) entre a atividade de cárie e o número de *S. mutans* presentes na placa bacteriana.

Com relação aos parâmetros salivares, pode-se observar nas Tabelas 2 e 3 que a população estudada apresenta predominância de capacidade tampão normal (71,2%) e xerostomia (43,2%). Ao relacionar a experiência de cárie com o fluxo salivar e a capacidade tampão da saliva verifica-se que 35,2% dos adolescentes têm baixa atividade de cárie a capacidade tampão normal (Tabela 2), sendo a relação entre esses dois fatores estatisticamente significativa ( $p = 0,003$ ). Entretanto, como mostrado na Tabela 3, a população estudada apresenta baixa atividade de cárie e xerostomia (13,5%) e baixo fluxo salivar (18,9%) não sendo observada interdependência significativa entre a experiência de cárie e o fluxo salivar ( $p = 0,084$ ).

Tabela 1

Distribuição da frequência da atividade de cárie (CPO-S) em relação à contagem de *S. mutans* presente na placa bacteriana.

| Atividade de cárie | Contagem de <i>Streptococcus mutans</i> por adolescente |      |                       |      |              |      |       |       |
|--------------------|---|------|-----------------------|------|--------------|------|-------|-------|
|                    | Baixa   |      | Média                 |      | Alta         |      | Total |       |
|                    | (<100.000)  |      | (100.000 a 1.000.000) |      | (>1.000.000) |      |       |       |
|                    | n   | %    | n                     | %    | n            | %    | n     | %     |
| Sem atividade      | 15  | 12,5 | 5                     | 4,5  | 3            | 2,7  | 23    | 20,7  |
| Baixa              | 14  | 12,6 | 8                     | 7,2  | 25           | 22,5 | 47    | 42,3  |
| Média              | 3   | 2,7  | 12                    | 10,8 | 7            | 6,3  | 22    | 19,8  |
| Alta               | 0   | 0    | 3                     | 2,7  | 16           | 14,5 | 19    | 17,2  |
| Total              | 32  | 27,8 | 28                    | 25,2 | 51           | 46,0 | 111   | 100,0 |

 $p < 0,001$ 

Tabela 2

Distribuição da frequência da atividade de cárie (CPO-S) em relação a capacidade tampão da saliva.

| Atividade de cárie | Capacidade tampão por adolescente |      |        |      |       |       |
|--------------------|-----------------------------------|------|--------|------|-------|-------|
|                    | Baixa                             |      | Normal |      | Total |       |
|                    | (<5)                              |      | (>5)   |      |       |       |
|                    | n                                 | %    | n      | %    | n     | %     |
| Sem atividade      | 4                                 | 3,6  | 19     | 17,1 | 23    | 20,7  |
| Baixa              | 8                                 | 7,2  | 39     | 35,2 | 47    | 42,4  |
| Média              | 9                                 | 8,1  | 13     | 11,7 | 22    | 19,8  |
| Alta               | 11                                | 9,9  | 8      | 7,2  | 19    | 17,1  |
| Total              | 32                                | 28,8 | 79     | 71,2 | 111   | 100,0 |

 $p = 0,003$ 

Tabela 3

Distribuição da frequência da atividade de cárie (CPO-S) em relação ao fluxo salivar.

| Atividade de cárie | Fluxo salivar por adolescente |      |             |      |        |      |       |       |
|--------------------|-------------------------------|------|-------------|------|--------|------|-------|-------|
|                    | Xerostomia                    |      | Baixo       |      | Normal |      | Total |       |
|                    | (<0,5)                        |      | (0,5 - 1,0) |      | (>1,0) |      |       |       |
|                    | n                             | %    | n           | %    | n      | %    | n     | %     |
| Sem atividade      | 14                            | 12,6 | 4           | 3,6  | 5      | 4,5  | 23    | 20,7  |
| Baixa              | 15                            | 13,5 | 21          | 18,9 | 11     | 10,0 | 47    | 42,4  |
| Média              | 13                            | 11,7 | 6           | 5,4  | 3      | 2,7  | 22    | 19,8  |
| Alta               | 6                             | 5,4  | 6           | 5,4  | 7      | 6,3  | 19    | 17,1  |
| Total              | 48                            | 43,2 | 37          | 33,3 | 26     | 23,5 | 111   | 100,0 |

 $p = 0,084$

## Discussão

A população avaliada apresenta predominância de baixa atividade de cárie e alto índice de *S. mutans*. Tal fato pode ser atribuído ao número de escovações diárias com dentífrico fluoretado, em torno de três vezes ao dia, promovendo uma adequação do meio bucal, com controle da flora bacteriana. De acordo com Rodrigues e Guedes-Pinto<sup>12</sup> a prática correta da higiene após as refeições reduz o acúmulo de placa bacteriana, e conseqüentemente evita a ação cariogênica da placa. Naval *et al.*<sup>4</sup> constataram diminuição da prevalência de cárie em 68,2% (índice CPO-D) dos escolares na faixa etária de 12 anos, no Município de São Paulo entre os anos 1970-1996, e que durante esse período houve um aumento dos Programas Odontológicos Preventivos nas escolas, com implementação de escovódromos. Tomita *et al.*<sup>28</sup> verificaram melhoria da higiene bucal em adolescentes, independente de sua inserção social, quando utilizados programas educativos em saúde bucal que aplicam metodologia participativa.

Resultados concordantes foram obtidos por Stamford *et al.*<sup>9</sup> que encontraram relação entre indivíduos com níveis superiores a 105 UFC/mg de *S. mutans* e alta atividade de cárie. Sánchez Pérez e Sáenz Martínez<sup>14</sup>, em estudo com 60 crianças entre 8 e 10 anos de idade, verificaram correlação entre níveis de *S. mutans* presente na placa dental e atividade de cárie. Em contrapartida Couto *et al.*<sup>6</sup> ao compararem o índice de cárie entre mães e filhos, observaram que mesmo apresentando contagem superior a 105 UFC/mL de *S. mutans*, as crianças tinham baixo índice de cárie. Almeida *et al.*<sup>11</sup> em 2002 verificaram através de análise microbiológica colorimétrica em 21 escolares, ausência de relação entre a atividade de cárie e níveis de *S. mutans*.

Tenório,<sup>10</sup> em estudo com 101 adolescentes, observou alto índice de cárie em indivíduos com alta taxa de placa bacteriana e menor concentração de fósforo e flúor, contudo esses resultados não foram estatisticamente significantes. A concentração de cálcio na placa dental foi maior nos adolescentes com baixa atividade, sendo esse o parâmetro que melhor se relacionou com a experiência de cárie.

Leitão *et al.*,<sup>8</sup> Velmovitsky<sup>24</sup> e Franchini *et al.*<sup>25</sup> afirmam que o fluoreto utilizado nos dentífricos e na água de abastecimento previnem a desmineralização do esmalte dentário e inibem a atividade de bactérias cariogênicas, principalmente o *S. mutans*.

Segundo Balzar *et al.*,<sup>22</sup> e Chaves e Vieira-da-Silva,<sup>21</sup> os fluoretos apresentam ação bactericida, uma vez que, ao penetrarem na célula bacteriana, afetam o metabolismo de carboidrato, pela inibição da enzima enolase, atuando de forma irreversível. Marsh e Bradshaw<sup>19</sup> relatam que o flúor reduz a produção de ácidos decorrentes do metabolismo bacteriano e diminui a virulência do *S. mutans*. De acordo com Krasser<sup>2</sup> os fluoretos atuam diminuindo a tensão superficial da superfície dentária e, conseqüentemente, a capacidade de adesão nos dentes pelos microrganismos, além de atuar com efeito antienzimático.

Com relação aos parâmetros salivares, constatou-se que a capacidade tampão influencia a experiência de cárie, enquanto que o mesmo não é observado com o fluxo salivar. Soriano *et al.*<sup>5</sup>, em estudo com 39 crianças de 8 a 12 anos de idade, verificaram correlação entre os indicadores salivares e a experiência de cárie. Almstahl e Wikstrom<sup>7</sup> observaram maior acúmulo de placa bacteriana nas superfícies dos dentes e maior atividade de cárie em indivíduos com xerostomia ou secreção salivar reduzida. Por outro lado, Tenuta *et al.*,<sup>20</sup> avaliaram o efeito de fatores salivares e da composição da placa dental na progressão da cárie *in situ* e concluíram que a desmineralização do esmalte dentário depende do tempo e está mais relacionada à composição do biofilme formado do que com aos fatores salivares.

Segundo Krasse<sup>2</sup>, baixo fluxo salivar e baixa capacidade tampão não promovem a redução dos microrganismos e restos alimentares no meio bucal, o que prejudica a neutralização de ácidos e reduz a tendência a remineralização das lesões iniciais do esmalte dentário, promovendo a instalação da doença cárie.

## Referências

1. Freysleben GR, Peres, MAA, Marcenes W. Prevalência de cárie e CPO-D médio em escolares de doze a treze anos de idade nos anos de 1971 e 1997, região Sul, Brasil. *Rev Saúde Pública* 2000; 34: 304-8.
2. Krasse B. Exame da saliva. In: Risco de cáries: guia prático para controle e assessoramento. São Paulo: Quintessence; 1988.
3. Loretto NRM, Saixas ZA, Jardim MC, Brito RL. Cárie dentária no Brasil aspectos sociais, políticos e econômicos. *Rev ABO Nacional* 2000; 8: 45-9.
4. Naval PC, Castellanos RA, Frazão P. Prevalência de cárie em dentes permanentes de escolares do Município de São Paulo, SP, 1970-1996. *Rev Saúde Pública* 2001; 34: 196-200.
5. Soriano G, Doño R, Piovano S, Macucho M, Tognaccioli L, García M. Relación entre los estudios salivares y estado dentário em ninas. *Bol Asoc Argent Odontol Niños* 2002; 31: 19-23.
6. Couto GBL, Rodrigues MJ, Ximenes EC, Vasconcelos MVB, Silva ATO. Comparações clínico-amnésicas e microbiológicas entre mães e filhos relacionadas com a transmissão da doença cárie. *Rev Fac Odontol Univ Fed Pernambuco* 2000; 10: 14-9.
7. Almstahl A, Wikstrom M. Oral microflora in subjects with reduced salivary secretion. *J Dent Res* 1999; 78: 1410-6.
8. Leitão DPS, Fonseca MJV, Polizello ACM, Spadaro ACC. Evaluation of the influence of cetylamine fluoride and sodium fluoride on acid production by *S. mutans*. *Rev Bras Cienc Farm* 2001, 37: 364-72.
9. Stamford TCM, Pereira DM, Grinfeld S, Rebêlo C. Risco de cárie e grau de conhecimento da saúde oral em gestantes do Instituto Materno Infantil de Pernambuco, IMIP. *Rev IMIP* 2000; 14: 73-8.
10. Tenório MDH. Parâmetros bioquímicos, velocidade de formação da placa dental e sua relação com a experiência de cárie em escolares de 11 a 13 de idade [tese doutorado]. Camaragibe: Departamento de Odontopediatria da Fundação Universidade de Pernambuco; 1999.
11. Almeida RVD, Padilha WVN, Pereira MSV, Sampaio TPD. Avaliação de teste salivar microbiológico colorimétrico no risco à cárie dentária. *Rev Bras Cien Saúde* 2002; 6: 259-68.
12. Rodrigues CRMD, Fernandes FRC, Guedes-Pinto AC. Cárie dentária. In: Guedes-Pinto AC. *Odontopediatria*. São Paulo: Santos; 2003. p. 291-322.
13. Dasanayake AP, Caufield PW, Cutter GR, Roseman JH, Kohler B. Differences in the detection and enumeration of *mutans Streptococci* due to differences in methods. *Arch Oral Biol* 1978; 40: 345-51.
14. Sánchez Pérez L, Sáenz Martínez L. Cuantificación del grupo mutans em saliva y placa em el médio MSB. *Bol Med Hosp Infant Mex* 2001; 58: 694-702.
15. Campos JADB, Campos AG. Cárie e *Streptococcus mutans* em ratos alimentados com sacarose e maltose. *Rev Paul Odontol* 2002; 24: 34-6.
16. Wunder D, Bowen WH. Action of agents on glucosyltransferases from *Streptococcus mutans* in solution and adsorbed to experimental pellicle. *Arch Oral Biol* 1999; 44: 203-14.
17. Marcantoni M. Ecología de la cavidad bucal. In: Negronte M. *Microbiología estomatológica: fundamentos y guía práctica*. Buenos Aires: Medica Panamericana; 1999.
18. Hassan AN, Frank JF, Qvist KB. Direct observation of bacterial exopolysaccharides in dairy products using confocal scanning laser microscopy. *J Dairy Sci* 2002; 85: 1705-8.
19. Marsh PD, Brandshaw DJ. The effect of fluoride on the stability of oral bacterial communities in vitro. *J Dent Res* 1990; 69: 668-71.
20. Tenuta LMA, Lima JEO, Cardoso CL, Cury JA. Effect to plaque accumulation and salivary factors on enamel demineralization and plaque composition in situ. *Pesq Odontol Bras* 2003; 17: 326-31.
21. Chaves SCL, Vieira-da-Silva LM. A efetividade do dentifício fluoretado no controle da cárie dental: uma meta-análise *Rev Saúde Pública* 2002; 36: 598-606.
22. Balzar ES, Linder LE, Sund ML, Lönies H. Effect of fluoride on glucose incorporation and metabolism in biofilm cells of *Streptococcus mutans*. *Eur J Oral Sci* 2001; 109: 182-6.
23. Dawes C. What is the critical pH and why does a tooth dissolve in acid? *J Can Dent Assoc* 2003; 69: 722-4.
24. Velmovitsky L. Inibição in vitro de microrganismos cariogênicos por dentifrícios do mercado nacional [tese doutorado]. Rio de Janeiro: Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2001.
25. Franchini CC, Degasperri GR, Andrade CR, Coelho CS, Bernardes CF. Efeito da fluoretação da água na concentração de fluoreto salivar. *Pes Bras Odontopediatr Clin Int* 2002; 2: 108-12.
26. Freire MCM, Macêdo RA, Silva WH. Conhecimentos, atitudes e práticas dos médicos pediatras em relação à saúde bucal. *Pesq Odontol Bras* 2000; 14: 39-45.
27. Pinto VG. *Saúde bucal coletiva*. São Paulo: Santos; 2000.
28. Tomita NE, Lauris RA, Pereira JR, Lopes ES. Educação em saúde bucal para adolescentes: uso de métodos participativos. *Rev Fac Odontol Bauru* 2001; 9: 63-9.
29. Shklair IL, Keene HJ. A biochemical scheme for the separation of the five varieties of *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol* 1978; 19: 1079-81.
30. WHO (World Health Organization). *Oral health surveys, basic methods*. 4th ed. Geneva; 1997.
31. OMS (Organização Mundial da Saúde). *Levantamento epidemiológico básico de saúde bucal: manual de instruções*. 3. ed. São Paulo: Santos; 1991.

Recebido em 25 de agosto de 2004

Versão final apresentada em 22 de novembro de 2004

Aprovado em 28 de dezembro de 2004