

Maria Landre Diogo Marçal
Farmacêutica - Bioquímica

**ESTUDO COMPARATIVO ENTRE ALGUNS TESTES BACTERIOLÓGICOS
QUE INDICAM ATIVIDADE CARIOGÊNICA**

Orientador: Prof. Dr. **Pedro Bertolini**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do grau de Mestre em Biologia e Patologia Buca-Dental (Microbiologia e Imunologia).

PIRACICABA
Março de 1981

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Aos meus pais,

Geraldo e Maria,

a base de minha carreira, minha gratidão.

Aos meus irmãos,

Sílvis e Lúcia

Senlis e Maria Antônia

Flammarion e Maria Angela

pelo apoio e dedicação.

Ao meu esposo, Marçal, pelo

grande incentivo,

com carinho.

As minhas filhas,

Sílves Helena

Marisa Cristina

Ana Elisa

dedico este trabalho

com carinho e afeição.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor, Dr. PEDRO BERTOLINI, Professor Titular da Área de Microbiologia e Imunologia, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas. Amparada pela sua orientação é que consegui vencer nesta luta, por conseguinte, minha gratidão.

Ao Professor, AÉCIO JOSE DA SILVA, pela minha consolidação na hora em que eu tateava os primeiros passos para galgar a escada de conhecimentos na carreira de professora.

Ao Professor Dr. ANTONIO CARLOS NÉDER, D.D. Diretor da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, UNICAMP, pela oportunidade da execução deste trabalho e também à Universidade Estadual de Campinas através de seu Reitor Dr. PLÍNIO ALVES DE MORAIS.

Ao Prof. Dr. HÉLIO DE SOUZA, D.D. Diretor da Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas, pelo incentivo na elaboração deste trabalho.

Ao Professor Dr. ANTONIO CARLOS FERRAZ CORRÊA, Coordenador do Curso de Pós-Graduação do Departamento de Biologia e Patologia Buco-Dental, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, pelo apoio e atenção.

Ao Professor Dr. VÍNIO BARBOSA TAMBURINI, D.D. Vice-Diretor da Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas, pela sua contribuição através de estímulos e conselhos.

Ao Professor Dr. EDUARDO ARAÚJO SANTOS, Responsável pelo Departamento de Parasitologia e Microbiologia da Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas, pelo apoio prestado.

Aos Professores ALCIDES GUIMARÃES e JAIME APARECIDO CURY pela ajuda prestada durante o curso.

À Professora Dra. SÔNIA VIEIRA, pela realização da a
nálise estatística.

A Senhora IVANY DO CARMO GUIDOLIN GEROLA, pela revi-
são bibliográfica.

À Senhora SUELY SOLIANI, pela atenção e amizade.

À MARIA APARECIDA NALIN, pela ajuda prestada durante
o curso.

À BENEDICTA TEREZINHA MOREIRA, pela gentileza que sem
pre me dedicou.

Aos meus COLEGAS DE PÓS-GRADUAÇÃO, pela amizade e ca
rinho durante o curso, e, em especial:

À ÁGUILA BERNARDES MARTINS, pela amizade.

Ao JOSÉ LUIZ VIEIRA DA SILVA, pela dedicação.

À MARTHA HELENA PEREIRA, pelo companheirismo.

À ONDINA DE SOUZA TERRA, pela atenção.

Ao SELMO DE ÁVILA LIMA, pelo incentivo.

Ao WALTER ROCHA, pelo apoio.

Aos caros amigos do Departamento de Biologia e Patolo-
gia Buco-Dental, Professores e Funcionários, pela amável a-
colhida.

À jovem, ZELY MARIA SILVEIRA, pela ajuda no trabalho de datilografia.

À jovem, ADELINA VIRGÍNIA DOS SANTOS, pela dedicação para com minhas filhas durante o curso.

À minha sogra, D. MARIAZINHA, pela colaboração e apoio.

S U M Á R I O

| | Pág. |
|---|------|
| I - INTRODUÇÃO | 1 |
| 1. Teste Colorimétrico de Snyder..... | 2 |
| 2. Produção de Placa "In Vitro"..... | 4 |
| 3. Formação de Polissacarídeo Intracelular..... | 8 |
| 4. <i>Streptococcus mutans</i> e Cárie Dental..... | 10 |
| II - PROPOSIÇÕES | 12 |
| III - MATERIAL E MÉTODOS | 13 |
| 1. Seleção dos Pacientes..... | 13 |
| 2. Colheita de Material de Placa Dental..... | 13 |
| 3. Formação de Polissacarídeo Intracelular..... | 14 |
| 4. Formação de Placa "In Vitro"..... | 15 |
| 5. Inoculação e Leitura do Teste de Snyder..... | 15 |
| 6. Contagem e Identificação de <i>Streptococcus mu</i> <i>tans</i> | 16 |
| 7. Meios de Cultura..... | 17 |
| 7.1. Ágar-Mitis-Salivarius..... | 17 |
| 7.2. Meio para o Teste Colorimétrico de Sny der..... | 17 |

| | |
|---|----|
| 7.3. Meio para Verificar a Formação de Polissacarídeo Intracelular..... | 18 |
| 7.4. Meio para Formação de Placa "In Vitro". | 19 |
| 7.5. Meio Básico para Fermentação de Carboidratos - CTA ("Cystina-Trypticase-Ágar", BBL)..... | 19 |
| 7.6. Solução de Iodo Reveladora de Polissacarídeo Intracelular..... | 20 |
| IV - RESULTADOS | 21 |
| V - DISCUSSÃO | 30 |
| VI - CONCLUSÕES | 41 |
| VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 42 |

LISTA DAS TABELAS

| <u>TABELA</u> | <u>PÁGINA</u> |
|---|---------------|
| 1 - Índice CPOD, número de colônias de <i>Str. mutans</i> , colônias iodofílicas de germes acidogênicos, tempo de viragem do teste de Snyder e quantidade de placa formada "in vitro", em 40 pacientes de ambos os sexos e da faixa etária entre 9 e 14 anos..... | 22 |
| 2 - Frequências relativas do teste de SNYDER em função da viragem do indicador em diferentes períodos de tempo..... | 24 |
| 3 - Distribuição dos indivíduos segundo a intensidade de formação de placa "in vitro"..... | 25 |
| 4 - Valores do Coeficiente de Correlação (r), entre o CPOD e as variáveis em análise | 26 |

LISTA DAS FIGURAS

| <u>FIGURA</u> | | <u>PÁGINA</u> |
|--|--|---------------|
| 1 - Representação gráfica da porcentagem média (\bar{x}) e da amplitude (a) dos dados relativos ao número de colônias iodofílicas, em pacientes com cárie ativos e inativos..... | | 23 |
| 2 - Representação gráfica da frequência relativa do teste de SNYDER em função do tempo..... | | 24 |
| 3 - Representação gráfica da frequência relativa de formação de placa "in vitro"..... | | 25 |
| 4 - Diagrama de dispersão entre a correlação e os pares de variáveis (CPOD - <i>Str. mutans</i>)..... | | 27 |
| 5 - Diagrama de dispersão entre a correlação e os pares de variáveis (CPOD - colônias iodofílicas).. | | 28 |
| 6 - Diagrama de dispersão entre a correlação e os pares de variáveis (CPOD - SNYDER)..... | | 28 |
| 7 - Diagrama de dispersão entre a correlação e os pares de variáveis (CPOD - formação de placa "in vitro")..... | | 29 |

I - INTRODUÇÃO

I - INTRODUÇÃO

A descalcificação do esmalte determinada por microorganismos presentes na cavidade oral, constitui a essência da teoria químico-parasitária, emitida por MILLER em 1890, para explicar a etiologia da cárie dental; segundo a mesma, os açúcares introduzidos com a dieta alimentar são transformados em ácido lático pelas enzimas bacterianas locais.

A partir daquela data, os investigadores procuraram estudar qualitativa e quantitativamente a flora da boca, e em especial, os germes acidogênicos e acidúricos. Foi possível, assim, caracterizar alguns dos elementos bacterianos presentes em número elevado na língua, sulco gengival, e placa dental, e ainda suas variações face aos processos cariosos ou doenças periodontais.

Durante algumas décadas um número elevado de pesquisas foi realizado no sentido de provar que germes do gênero *Lactobacillus* seriam os responsáveis pela cárie, por uma série de razões e ainda porque são formadores de ácidos (acidogênicos) e capazes, também, de se desenvolverem em pH baixo (acidúricos).

Surgiu então a idéia de se medir a atividade cariogênica através de método bacteriológico, que permitisse detectar condições propícias ao desenvolvimento da cárie.

De fato, o uso de algum método que revelasse as fases pré-clínicas da cárie dental permitiria aplicar os

recursos de prevenção e controle com a intensidade necessária e suficiente para bloquear a destruição do esmalte, dentina e conseqüências sobre a polpa dental.

1.1 - TESTE COLORIMÉTRICO DE SNYDER

Este teste foi proposto por SNYDER em 1940, baseado no fato de que a ação cariogênica estaria intimamente relacionada com o aumento ou diminuição do número de lactobacilos encontrado na saliva.

Através dele, também é possível demonstrar o aumento ou diminuição correspondente da quantidade de ácidos produzidos em meio seletivo inoculado com saliva. O meio contém glicose e verde-bromo-cresol, que em pH = 5,0 mantém essa coloração; a inoculação de flora acidogênica determina viragem para o amarelo (pH = 4,2 - 3,8) pela metabolização do carboidrato.

Segundo SNYDER, para evitar dúvidas na interpretação dos resultados, o teste positivo seria indicado pelo desaparecimento do verde como cor dominante, o que se verifica na faixa de pH = 4,2 a 4,0.

O autor procurou simplificar um recurso que permitisse seu emprego clínico, baseado nos trabalhos do grupo de Michigan, nos quais fora descrita a ocorrência de grande nū

mero de lesões de cárie em função da dieta.

O esquema de interpretação do teste colorimétrico foi mencionado por SNYDER (1942), reproduzindo a conclusão dos resultados acumulados nos ensaios com a inoculação de 0,2 ml de saliva no meio de teste, conforme consta da tabela abaixo:

| Atividade Cariogênica | Tempo de Incubação | | |
|--------------------------|--------------------|----------|----------|
| | 24h | 48h | 72h |
| Máxima | teste positivo | - | - |
| Moderada | teste negativo | positivo | - |
| Discreta | teste negativo | negativo | positivo |
| Negativa | teste negativo | negativo | negativo |

Com referência ainda a interpretação do teste colorimétrico, SNYDER (1951) discorreu minuciosamente sobre o indicador do meio, verde-bromo-cresol, apresentando uma notação para suas várias alterações de cor decorrentes da reação ácida do meio.

| | |
|----------------|---|
| Teste Negativo | 0 - indicador não ativado |
| | + - ligeira alteração na cor verde (pH 5,0 - 4,4) |
| Teste Positivo | ++ - verde não é mais cor dominante |
| | +++ - alteração incompleta para o amarelo (pH 4,2 - 3,8) |

LIMA e col. (1968) estudaram, no meio de SNYDER, o comportamento de culturas puras de microrganismos isolados dos vários nichos da boca, e ainda, a possibilidade da placa dental, material de sulco e de língua contribuírem com microrganismos acidogênicos para a saliva. Verificaram que as amostras de *Lactobacillus*, enterococos e *Staphylococcus* determinaram modificações do verde-bromo-cresol distribuídas nas três gradações do teste positivo de SNYDER. Material de sulco gengival e da língua inoculado no meio de SNYDER também produziu alteração do verde-bromo-cresol, resultado significativo para mostrar que não somente a placa dental contribui com microrganismos acidogênicos para a saliva.

1.2 - PRODUÇÃO DE PLACA "IN VITRO"

A partir de 1965 foi demonstrado que certas amostras de estreptococos humanos determinavam cáries em hamsters convencionais ou ratos gnotobiotos, enquanto que outras amostras não eram cariogênicas (ZINNER e cols., 1965; KRASSE, 1966; GIBBONS e col., 1966).

Os estreptococos de rato, bem como os humanos, sintetizam grandes quantidades de polissacarídeos extracelular, principalmente a partir da sacarose, enquanto que os não cariogênicos formam quantidades mínimas. A produção deste po-

lissacarídeo em caldo sacarosado origina uma massa bacteriana de consistência gelatinosa, que adere nas paredes do tubo sugerindo que a formação do polissacarídeo pôde ser responsável pelo acúmulo de bactérias nos animais inoculados com bactérias cariogênicas (GIBBONS e col., 1966).

Alguns desses polissacarídeos, em particular, o dextrano, podem participar da formação de placa dental (GUGGENHEIN e col., 1966; WOOD & CRITCHLEY, 1966). Os autores não observaram a formação de placa quando foi empregado caldo glicosado.

HAY (1966), verificou que a superfície dos dentes na boca, é revestida por certas proteínas salivares. Esse revestimento pode ser obtido "in vitro", misturando pó de apatita à saliva humana integral clarificada. A habilidade do dextrano de aderir a essa suspensão de apatita sugere que ela também pode aderir à superfície do dente, na boca. A segunda característica do dextrano que pode ter significado na formação da placa é a de que ele forma complexo insolúvel quando incubado com saliva. Esses complexos estão constituídos por carboidrato, proteína, cálcio e fósforo.

O dextrano é relativamente resistente a hidrólise por crescimento bacteriano misto originário de placa e saliva. Desque a matriz de placa constitui somente uma porção do peso seco total da placa, o dextrano representa uma elevada porcentagem da matriz da placa.

Essa hipótese acima referida baseia-se no fato de que alguns tipos de estreptococos formadores de placa e cariogênicos diferem na habilidade de sintetizarem polissacarídeos extracelulares, a partir de vários açúcares (GIBBONS e col., 1966; FITZGERALD & JORDAN, 1968).

A formação de dextrano insolúvel em água parece ser uma condição para o desenvolvimento de lesões cariosas de superfície lisas como indicaram a experiências em roedores inoculados com estreptococos cariogênicos (KRASSE, 1965; KRASSE e col., 1967).

Observações mais recentes indicam que algumas bactérias orais possuem afinidade para polímeros salivares (GIBBONS & SPINELL, 1969) bem como para hidroxiapatita ou esmalte humano pulverizado (MCGOUGHEY & FIELD, 1969; HILLMAM e col., 1970).

Esses fatos parecem indicar que a afinidade de bactérias orais por esmalte ou pela película adquirida pode ser uma determinante da sua presença na superfície dental no início da formação da placa.

A sacarose permite a formação de placa "in vitro" (JORDAN & KEYES, 1966); em animais de laboratório (KRASSE, 1966; GUGGENHEIM e col., 1966) e no homem (CARLSSON & EGGELBERG, 1965).

Recentemente, GIBBONS & BANGHART (1967) referiram que a passagem seriada de estreptococos (Strain 3) em solução sacarosada aumentava capacidade das mesmas em formar dex

trano.

A deposição de material na coroa e raiz dos dentes tem sido relacionada com cárie e doença periodontal, desde 1899 por WILLIAMS e ARMIN em 1963. Contudo, são poucas as referências sobre a capacidade de algumas bactérias aderirem, mais que outras, aos dentes. Pesquisando essa propriedade, MC CABET e col. (1967), modificaram o método proposto por JORDAN & KEYES (1966). De acordo com os mesmos, um fio de níquel-cromo era preso à extremidade inferior da rolha de borracha que tampava o tubo e mergulhado no caldo contendo glicose, ou sacarose, ou amido.

Em 1967, JURGENSEN & ARAÚJO, relataram a formação de placa "in vitro" por estreptococos cariogênicos para hamsters na superfície de bastão e lamínula, incubados em caldo contendo 5% de sacarose (modificação do Ágar-Mitis-Salivarius, BBL).

Com intervalos de 48 horas, lamínulas e bastão eram transferidos para caldo sacarose até completar 15 dias. Com três dias de incubação, pequenos nódulos depositaram-se, com 15 dias, grande quantidade de massa gelatinosa se acumulava sobre o bastão e lamínula.

Concluindo, podemos dizer que a biossíntese de polissacarídeo extracelular parece ser uma das características requerida para que uma bactéria seja considerada cariogênica.

1.3 - FORMAÇÃO DE POLISSACARÍDEO INTRACELULAR

Formada a placa dentária, uma grande variedade de microrganismos se incorpora na mesma, numa inter-relação entre eles mesmos e ainda com a própria superfície do esmalte, que passa a ser descalcificada pela ação de germes acidogênicos, que fazem baixar consideravelmente o pH.

Em 1944, STEPHAN mostrou que existe uma diferença quantitativa na intensidade e duração de acidez produzida por decomposição de carboidratos nos dentes de indivíduos livres e portadores de cárie. Segundo o autor, as massas bacterianas da placa com uma concentração máxima de enzimas, em pequeno espaço, diante de pequena atividade tampão, produzem ácidos com grande velocidade e conseqüentemente uma queda elevada de pH. Além da ação bacteriana, outras causas controlam o pH da placa, como o fluxo e a capacidade tampão da saliva, as espécies e quantidades de bactérias presentes, bem como a atividade acidogênica e ainda, as quantidades de carboidratos ingeridos e mais especialmente os retidos na boca e placa dental. A maneira pela qual esses fatores agem isoladamente ou combinados, ainda é obscura. O que se sabe é que há diferenças entre as placas de indivíduos cárie-resistentes e cárie suscetíveis. Neste sentido, é interessante citar as conclusões de BLAYNEY e col. (1963) mostrando diversificação da flora microbiana na placa dos dois tipos de pacientes citados. Em 1950, STRALFORS mostrou que um aumento na concentração de bactérias está associado com aumento da formação de á-

cidos por unidade de tempo. Concluiu que a concentração de bactérias e o coeficiente de difusão dos ácidos nas placas, é de importância decisiva na ocorrência ou não, da descalcificação. Como consequência dessa variação de flora bacteriana, provavelmente ocorrem condições diferentes no metabolismo dos carboidratos e o tempo de ação dos produtos resultantes com a superfície do dente. Sabe-se que a lavagem da boca com solução de glicose produz queda de pH a menos de 5,1. No entanto, para que se estabeleça a descalcificação do esmalte é necessária a permanência da acidez por longos períodos de tempo. Isso é possível com a ingestão freqüente de açúcares através de alimentos ricos em carboidratos ou através da retenção de polissacarídeo na superfície do esmalte; em favor desta última ponderação falam bem claro as pesquisas de GIBBONS e col. (1955) DOESTSCH e col. (1957). De acordo com esses autores, bactérias capazes de sintetizarem polissacarídeo intracelular do tipo glicogênio-amilopectina, em presença de carboidratos, podem metabolizá-lo quando o açúcar exógeno foi consumido, mantendo assim, a acidez residual por período de tempo maior nos indivíduos sujeitos a cáries do que nos sem cáries.

Ainda em favor desta hipótese corroboram as afirmações de GIBBONS & SOCRANSKY (1962), que admitem a possibilidade do polissacarídeo intracelular sintetizado por algumas bactérias concorrer para o estabelecimento de cárie. Estudando microrganismos de placas, dotados dessa propriedade, relacionaram estreptococos, difteróides e *Fusobacterium*, como

capazes de metabolizarem o polissacarídeo intracelular formado, com produção de ácido lático. Placas de pacientes cárie ativos continham microrganismos fortemente iodofílicos em proporção mais elevada que aqueles de placas de indivíduos sem cáries. Para estudar a maneira pela qual as bactérias acumulam polissacarídeos esses autores empregando uma amostra de *Str. mitis*, verificaram a ocorrência da elaboração e armazenamento de grandes quantidades de polissacarídeo em presença de açúcar fermentável, como a glicose, mas sob condições de crescimento limitado. Em virtude da metabolização do carboidrato produziram-se grandes quantidades de ácido suficientes para baixar o pH a menos de 6,0, acidez que se manteve por várias horas, mesmo diante de um fluxo contínuo de solução tampão de pH 7,0. Na ausência de fluxo da solução tampão o pH produzido estava abaixo de 5,0. Esses achados sugerem que os polissacarídeos armazenados pelos organismos possam ser responsáveis pela manutenção de pH baixo nas placas quando o carboidrato exógeno foi consumido.

1.4 - *Streptococcus mutans* E CÁRIE DENTAL

Desde 1950, vários autores demonstraram que *S. mutans* possui a capacidade de determinar cárie em animais de laboratório (ZINNER e col., 1965; GIBBONS e col., 1966; KRASSE,

1966).

No homem, alguns trabalhos têm procurado demonstrar as relações entre cárie e a composição microbiana da placa dental, indicando quase sempre uma correlação positiva e significativa entre a presença do microrganismo em apreço e o processo carioso.

Estudando a ocorrência de estreptococos indutores de cárie em material de placa dental humana, BIRAL (1969) verificou pelos dados obtidos que estreptococos do grupo II (*Str. mutans*) estavam etiologicamente relacionados, de diferentes modos, com a cárie. O mesmo não acontecia com *Str. sanguis* apesar de serem formadores de dextrano e importantes constituintes da placa dental.

A relação entre cárie e *Str. mutans* tem sido demonstrada por um número elevado de trabalhos de investigação em várias partes do mundo [FITZGERALD e col. (1960); BERTOLINI (1969); ZINNER e col. (1965); MIRANDA (1977)].

II - PROPOSIÇÕES

II - PROPOSIÇÕES

Considerando a importância da produção de polissacarídeo extracelular, sobretudo por *Str. mutans*, e intracelular pelas bactérias orais, nos mecanismos de formação de placa dental e produção de ácidos com conseqüente descalcificação dental, propomo-nos investigar:

1. A incidência de *Streptococcus mutans* em material de placa dental de escolares.
2. O número de colônias de germes produtores de polissacarídeo intracelular.
3. A ocorrência de flora produtora de polissacarídeo extracelular através da formação de placa "in vitro".
4. O comportamento do meio de Snyder quando semeado com material de placa dental de escolares.
5. Correlacionar os resultados obtidos com Índice CPOD dos escolares.

III - MATERIAL E MÉTODOS

III - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - SELEÇÃO DOS PACIENTES

O material a ser examinado foi colhido de várias superfícies dentárias de 40 crianças cuja idade variava entre 8 e 14 anos, sendo metade do sexo masculino e outra metade do sexo feminino, de grupo escolar da cidade de Piracicaba.

Seus hábitos alimentares eram os da classe mediana a pobre e porque consumiam substâncias açucaradas.

Foi anotado o estado dos dentes através do Índice CPO-D (KLEIN & PALMER, 1937).

3.2 - COLHEITA DE MATERIAL DE PLACA DENTAL

Os dentes eram isolados com roletes de algodão para evitar contaminação pela saliva, após terem sido lavados com jato de água através de seringa.

Usando-se uma colher de dentina, previamente confeccionada para obter-se 1 mg de placa e esterilizada, raspavam-se as faces vestibular e lingual dos molares superiores e a labial dos incisivos, para obter uma mistura representativa da flora das placas. Nos dentes com cárie colhíamos o mate

rial nas faces que se apresentavam hídidas.

O material obtido era transferido para pequenos frascos contendo 10 ml de salina com extrato de levedura a 0,05% e pH 7,2 e ainda pērolas de vidro. A seguir procedíamos às diluições decimais até 10^{-7} .

A distribuição do material era feito conforme o teste a ser realizado.

3.3 - FORMAÇÃO DE POLISSACARÍDEO INTRACELULAR

A quantidade de 0,1 ml da diluição 10^{-7} do material de placa era semeada no meio de GIBBONS (1966) com auxílio de bastão de vidro em L. A incubação das placas e dos tubos das outras provas abaixo descritas, era feita em anaerobiose com jarras pelo sistema "Gaz-pack" e em microaerofilia, em dessecador, no qual se colocava um pedaço de papel em chamas (BURROWS, 1963). A temperatura de incubação era de 37°C.

Para a leitura de colônias iodofílicas, depositavam-se algumas gotas da solução de iodo reveladora sobre as colônias desenvolvidas no meio de cultura. Os resultados foram assim interpretados: cor marrom a escura, fortemente positiva; marrom apenas, fracamente positiva e amarelo clara, negativa.

3.4 - FORMAÇÃO DA PLACA "IN VITRO"

Seguimos a técnica de CAMARGO e col. (1968). Usamos tubo capilar como superfície para deposição do material mucilaginoso. A quantidade 0,1 ml da diluição inicial (10^{-4}) era semeada em tubo contendo caldo hipersacarosado e tubo capilar. A incubação era feita nas condições acima referida. De cada 48 horas, os capilares eram transferidos para novo caldo, passados antes em salina estéril para remover o crescimento não aderente ao capilar. Para grandes quantidades de material aderido ao capilar demos o sinal +++, para pequena quantidade ++ e - para ausência de placa.

3.5 - INOCULAÇÃO E LEITURA DO TESTE DE SNYDER

A quantidade de 0,2 ml da diluição inicial (10^{-4}) do material procedente de placa dental, era inoculada no meio de SNYDER, previamente fundido e resfriado a 50°C. A leitura dos tubos semeados e incubados era feita após 24, 48, 72 e 96 horas, comparando-se o tubo teste com escala colorimétrica de referência anteriormente estabelecida, cujas variações de pH foram medidas com potenciômetro.

As modificações de coloração do indicador verde-bromo-cresol em função dos diferentes pH foram conferidas

com as seguintes indicações:

| | |
|-----------------------------------|-------|
| pH 5,0 - verde azulado | (0) |
| pH 4,6 - verde | (+) |
| pH 4,3-4,2 - ligeiramente amarelo | (++) |
| pH 4,1-4,0 - acentuado amarelo | (+++) |
| pH 3,9-3,8 - intensamente amarelo | (+++) |

3.6 - CONTAGEM E IDENTIFICAÇÃO DE *Streptococcus mutans*

A quantidade de 0,1 ml da diluição 10^{-7} do material coletado foi distribuído na superfície de Mitis-Salivarius-Ágar, distribuído em placas, contendo açúcar comum(União) na concentração final de 40%, o que o torna seletivo para *Str. mutans*.

As colônias desenvolvidas, com características do referido germe foram contadas com auxílio de microscópio estereoscópico e aumento de 8 vezes; a seguir, transferiram-se essas colônias, verificado seu estado de pureza pela coloração de Gram, para tubos de fermentação de sorbitol e manitol.

IV - MEIOS DE CULTURA

IV - MEIOS DE CULTURA

4.1 - ÁGAR-MITIS-SALIVÁRIUS

| | |
|---|-----------|
| Trypticase (BBL) | 1,0 g |
| Polipeptona (BBL) | 1,0 g |
| Glicose (Carlo Erba) | 0,1 g |
| Açúcar comum (União) | 40,0 g |
| K ₂ HPO ₄ (Merck) | 0,4 g |
| Azul Trypan (Harleco) | 0,0075 g |
| Cristal violeta (Merck) | 0,00008 g |
| Ágar-ágar (Oxoid nº 3) | 1,5 g |
| Água destilada | 100 ml |

Acertar o pH a 7,2, esterilizar a 121°C por 15 minutos, resfriar a 50°C e adicionar 1 ml de solução de telurito de potássio a 1%, estéril.

4.2 - MEIO PARA O TESTE COLORIMÉTRICO DE SNYDER (1940)

| | |
|------------------------------------|---------|
| Tryptona (Difco) | 2,0 g |
| Glicose (Carlo Erba) | 2,0 g |
| Cloreto de sódio (Backer) | 0,5 g |
| Verde-bromo-cresol (Harleco) | 0,002 g |

| | |
|------------------------------|--------|
| Ágar-ágar (Oxoid nº 3) | 1,5 g |
| Água destilada | 100 ml |

Acertar o pH para 4,8 - 5,0, derreter e distribuir em tubos em quantidades de 5 ml; esterilizar a 121°C por 15 minutos.

4.3 - MEIO PARA VERIFICAR A FORMAÇÃO DE POLISSACARÍDEO INTRACELULAR (GIBBONS, 1966)

| | |
|-----------------------------------|--------|
| Trypticase soja-ágar (BBL) | 100 ml |
| Glicose (Carlo Erba) | 2,0 g |
| Extrato de levedura (Difco) | 0,2 g |
| Ágar-ágar (Oxoid nº 3) | 1,5 g |
| Água destilada | 100 ml |

Acertar o pH a 7,2, esterilizar a 121°C por 15 minutos. Distribuir 25 ml em placa de Petri de 9 cm de diâmetro.

4,4 - MEIO PARA FORMAÇÃO DE PLACA "IN VITRO" (CAMARGO E COL., 1968)

| | |
|---|-------|
| Tryptose (Difco) | 1,0 g |
| Extrato de levedura (Difco) | 0,5 g |
| K ₂ HPO ₄ (Merck) | 0,5 g |
| Açúcar comum (União) | 5,0 g |

Acertar o pH a 7,2, distribuir em tubos em cujo interior se colocam tubos capilares tendo uma das extremidades curvadas sob a forma de cabo de guarda-chuva; esterilizar como descrito para os outros meios.

4,5 - MEIO BÁSICO PARA A FERMENTAÇÃO DE CARBOIDRATOS CTA ("CYSTINA-TRYPTICASE-ÁGAR", BBL)

| | |
|---------------------------------|----------|
| Cistina (Merck) | 0,05 g |
| Trypticase (BBL) | 2,0 g |
| Ágar-ágar (Oxoid nº 3) | 0,25 g |
| Cloreto de sódio (Backer) | 0,5 g |
| Sulfito de sódio (Merck) | 0,0017 g |
| Vermelho de fenol | 0,0017 g |
| Água destilada | 100 ml |

Acertar o pH a 7,2, esterilizar a 118°C por 15 minutos.

Esse meio foi empregado para as provas de fermentação dos carboidratos, manitol e sorbitol, na concentração final de 1%, e prova de crescimento ou não em manitol com 2 UI de bacitracina.

4.6 - SOLUÇÃO DE IODO REVELADORA DE POLISSACARÍDEO INTRACELULAR

| | |
|--------------------------|--------|
| Iodo metálico | 6,2 g |
| Iodeto de potássio | 2,0 g |
| Água destilada | 100 ml |

Guardar a solução em frasco escuro.

V - RESULTADOS

V - RESULTADOS

A tabela 1 encerra os diversos dados referentes aos 40 escolares dos quais se colheu material de placa. Aí se encontram referidos o sexo, idade, índice CPOD, nº de colônias de *Str. mutans*, nº de colônias iodofílicas, o tempo de viragem do indicador do meio de SNYDER e ainda a intensidade da formação de placa "in vitro".

TABELA 1 - Índice CPOD, nº de colônias de *Str. mutans*, colônias iodofílicas de germes acidogênicos, tempo de viragem do teste de Snyder e quantidade de placa formada "in vitro", em 40 pacientes de ambos os sexos e da faixa etária entre 8 e 14 anos.

| Nº de Pacientes | Sexo | Idade | CPOD | Colônias de <i>Str. mutans</i> * | Colônias Iodofílicas* | Teste de Snyder | Formação de placa "in vitro" |
|-----------------|------|-------|------|----------------------------------|-----------------------|-----------------|------------------------------|
| 1 | M | 8 | 0 | 15 | 10 | 72h | - |
| 2 | M | 8 | 3 | 19 | 34 | 96 | - |
| 3 | M | 8 | 17 | 68 | 52 | 24 | +++ |
| 4 | M | 11 | 0 | 18 | 33 | 96 | - |
| 5 | M | 9 | 0 | 26 | 12 | 96 | - |
| 6 | M | 10 | 8 | 140 | 25 | 24 | +++ |
| 7 | M | 14 | 6 | 12 | 20 | 96 | ++ |
| 8 | F | 13 | 14 | 12 | 48 | 24 | +++ |
| 9 | F | 12 | 5 | 6 | 29 | 72 | + |
| 10 | F | 9 | 15 | 28 | 72 | 24 | ++ |
| 11 | F | 13 | 6 | 114 | 29 | 72 | +++ |
| 12 | F | 12 | 4 | 12 | 20 | 72 | - |
| 13 | M | 12 | 5 | 35 | 44 | 96 | ++ |
| 14 | F | 11 | 4 | 304 | 21 | 96 | +++ |
| 15 | M | 13 | 6 | 360 | 32 | 24 | +++ |
| 16 | M | 12 | 4 | 4 | 26 | 96 | - |
| 17 | M | 13 | 3 | 8 | 15 | 48 | - |
| 18 | F | 10 | 5 | 120 | 20 | 48 | ++ |
| 19 | F | 11 | 4 | 27 | 25 | 72 | - |
| 20 | F | 11 | 20 | 85 | 49 | 24 | +++ |
| 21 | F | 10 | 3 | 13 | 22 | 96 | +++ |
| 22 | F | 9 | 5 | 8 | 28 | 96 | - |
| 23 | F | 9 | 3 | 9 | 14 | 96 | - |
| 24 | F | 9 | 3 | 15 | 12 | 72 | - |
| 25 | F | 10 | 3 | 121 | 14 | 96 | ++ |
| 26 | M | 9 | 5 | 15 | 10 | 72 | ++ |
| 27 | M | 9 | 3 | 3 | 22 | 72 | - |
| 28 | M | 10 | 4 | 7 | 19 | 96 | - |
| 29 | M | 12 | 7 | 118 | 21 | 96 | +++ |
| 30 | M | 9 | 2 | 10 | 12 | 96 | - |
| 31 | M | 13 | 25 | 356 | 54 | 24 | ++ |
| 32 | F | 8 | 4 | 10 | 33 | 96 | - |
| 33 | F | 8 | 3 | 8 | 15 | 72 | + |
| 34 | F | 8 | 2 | 46 | 11 | 72 | + |
| 35 | M | 10 | 4 | 52 | 24 | 96 | ++ |
| 36 | F | 9 | 12 | 183 | 20 | 48 | ++ |
| 37 | M | 8 | 6 | 244 | 52 | 96 | + |
| 38 | M | 10 | 15 | 455 | 50 | 48 | +++ |
| 39 | F | 10 | 0 | 6 | 21 | 96 | - |
| 40 | F | 10 | 5 | 313 | 32 | 24 | + |

* Nº de colônias x 10⁹.

A figura 1 representa em gráfico, a porcentagem média e a amplitude dos dados relativos ao número de colônias iodofílicas.

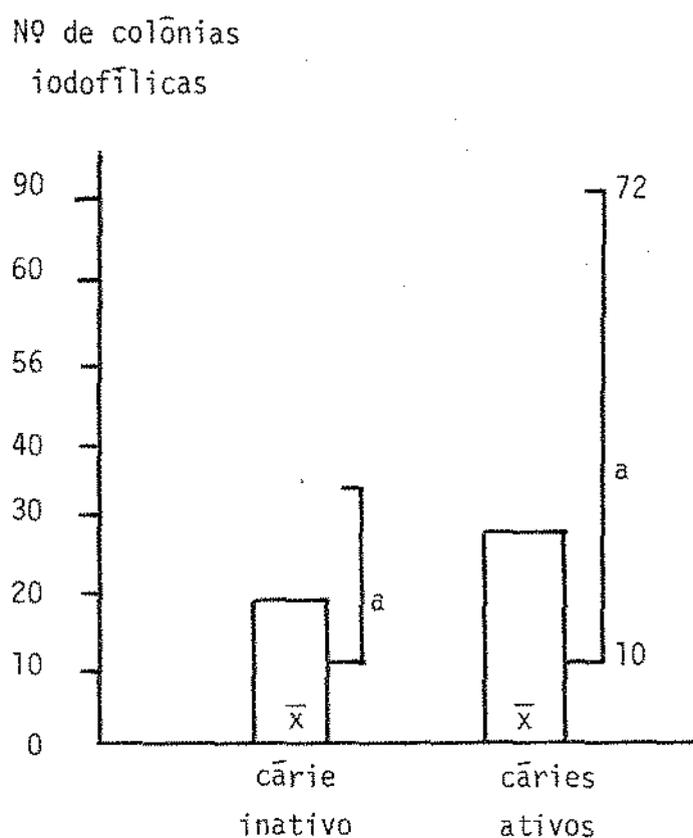


FIGURA 1 - Representação gráfica da porcentagem média (\bar{x}) e da amplitude (a) dos dados relativos ao nº de colônias iodofílicas, em pacientes cárie ativos e inativos.

As freqüências relativas do teste de SNYDER em função do tempo de viragem de cor do indicador do meio de cultura incidente em números variáveis de crianças estão assinaladas na tabela 2 e na representação gráfica da figura 2.

TABELA 2 - Freqüências relativas do teste de SNYDER em função da viragem do indicador em diferentes períodos de tempo.

| Horas | Número de crianças | Freqüência relativa (%) |
|-------|--------------------|-------------------------|
| 24 | 8 | 20 |
| 48 | 4 | 10 |
| 72 | 10 | 15 |
| 96 | 18 | 45 |
| TOTAL | 40 | 100 |

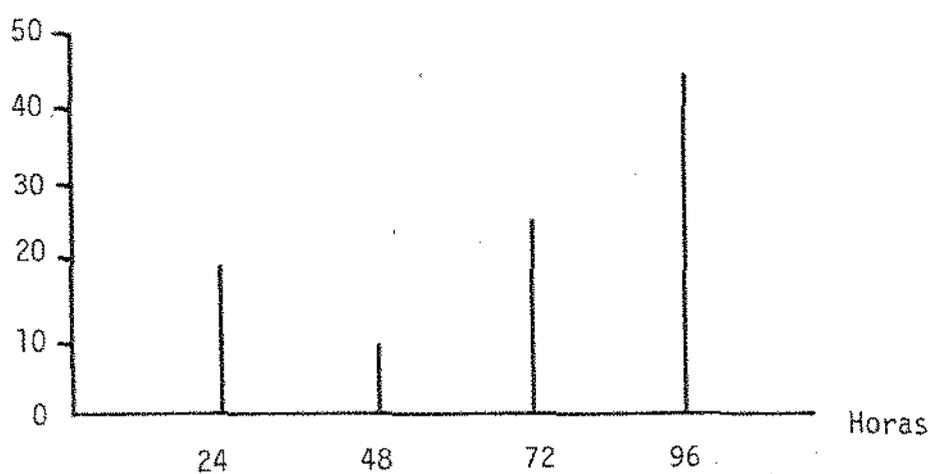


FIGURA 2 - Representação gráfica da freqüência relativa do teste de SNYDER em função do tempo.

A tabela 3 e a representação gráfica da figura 3 indicam a intensidade ou quantidade de placa formada "in vitro" nas crianças estudadas.

TABELA 3 - Distribuição dos indivíduos segundo a intensidade de formação de placa "in vitro".

| Placa "in vitro" | Frequência | Frequência relativa (%) |
|------------------|------------|-------------------------|
| - | 16 | 40,0 |
| + | 5 | 12,5 |
| ++ | 9 | 22,5 |
| +++ | 10 | 25,0 |
| TOTAL | 40 | 100,0 |

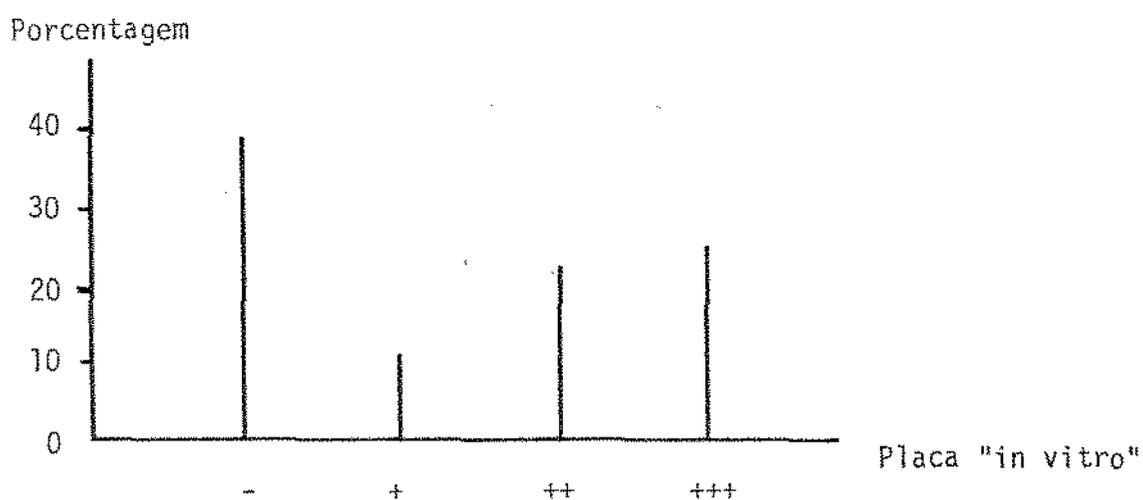


FIGURA 3 - Representação gráfica da frequência relativa de formação de placa "in vitro".

Os diferentes valores do coeficiente de correlação (r) entre o CPOD e as demais variáveis estudadas encontram-se na tabela 4.

Os diagramas de dispersão das figuras 4, 5, 6 e 7, indicam a correlação entre os pares de variáveis.

Para verificar o grau de correlação entre CPOD e as demais variáveis em estudo foi calculado o coeficiente de correlação conforme mostra a tabela 4.

TABELA 4 - Valores do coeficiente de correlação (r), entre o CPOD e as variáveis em análise.

| Variáveis | $r(\%)$ |
|-------------------------------------|---------|
| CPOD - col. de <i>Str. mutans</i> | 41,89 |
| CPOD - col. iodofílicas | 73,07 |
| CPOD - teste de SNYDER | -26,89 |
| CPOD - formação de placa "in vitro" | 58,24 |

Para melhor visualizar a correlação entre os pares de variáveis, foram constituídos os diagramas de dispersão apresentados nas figuras 4, 5, 6 e 7.

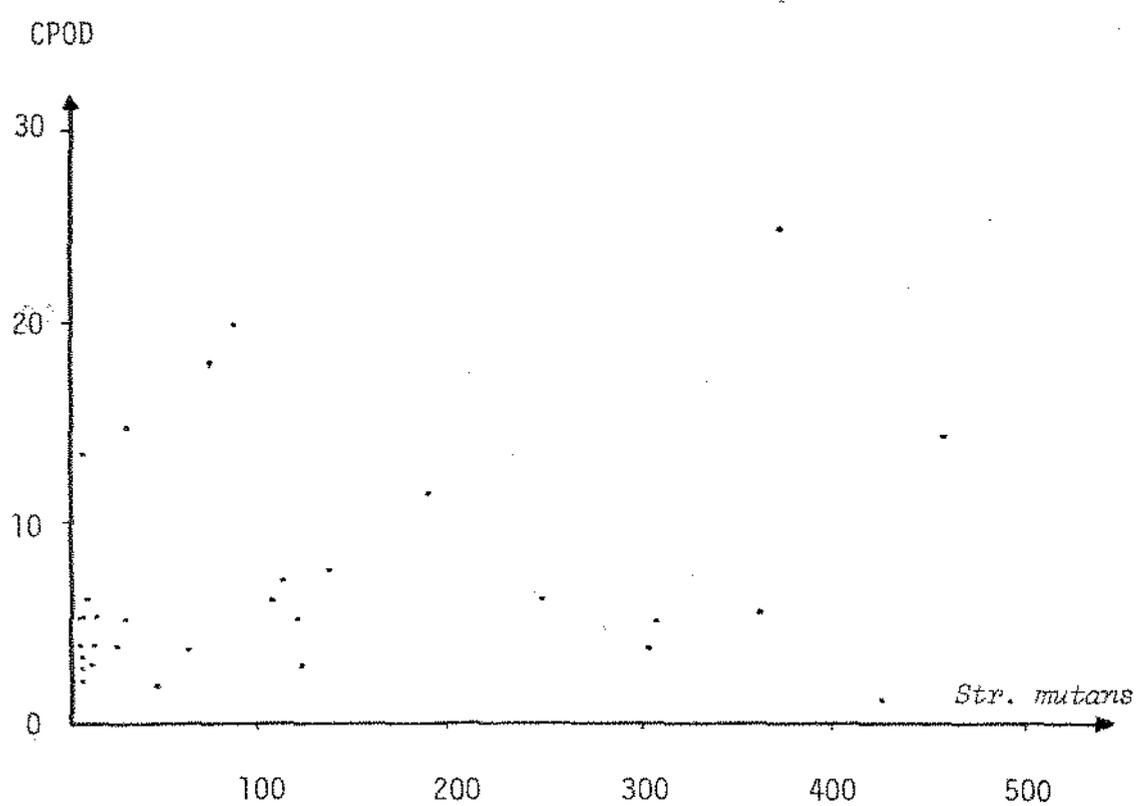


FIGURA 4

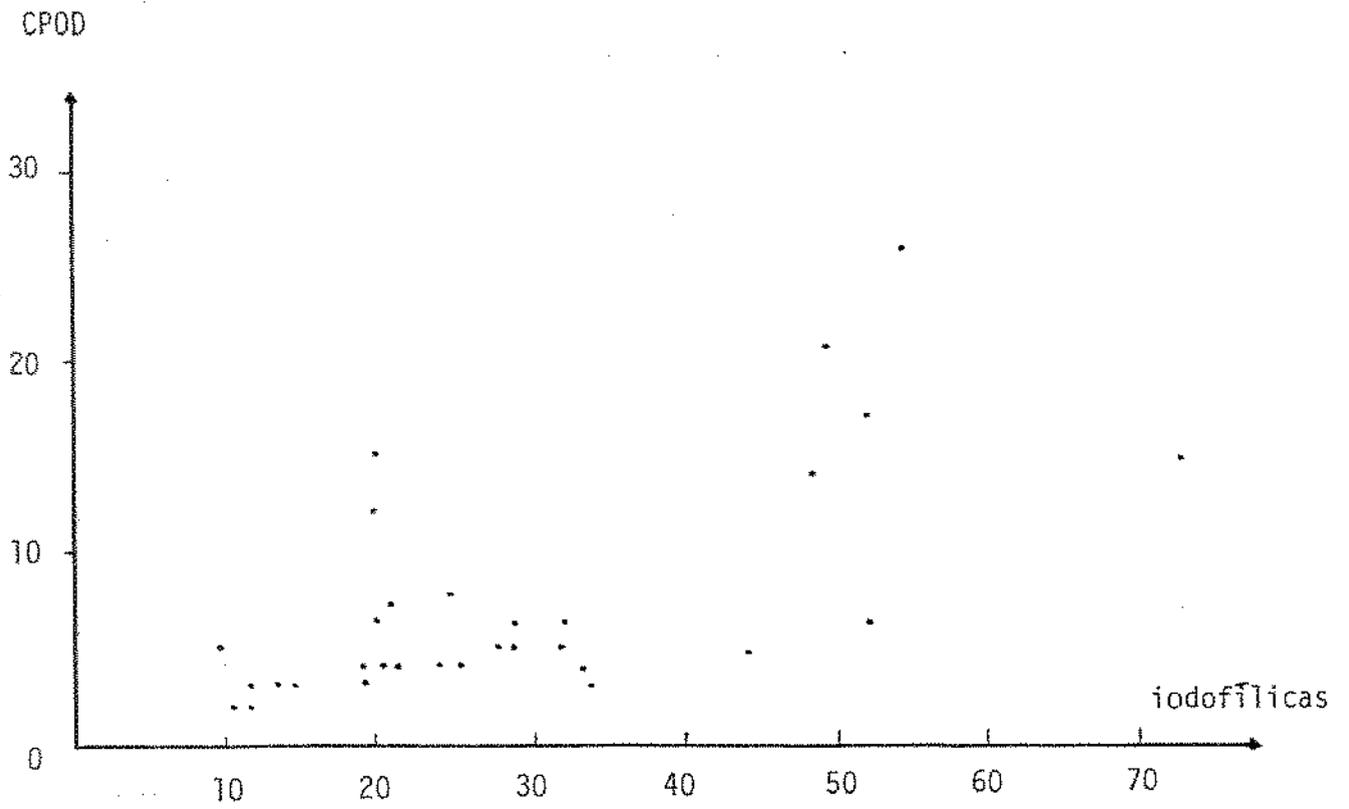


FIGURA 5

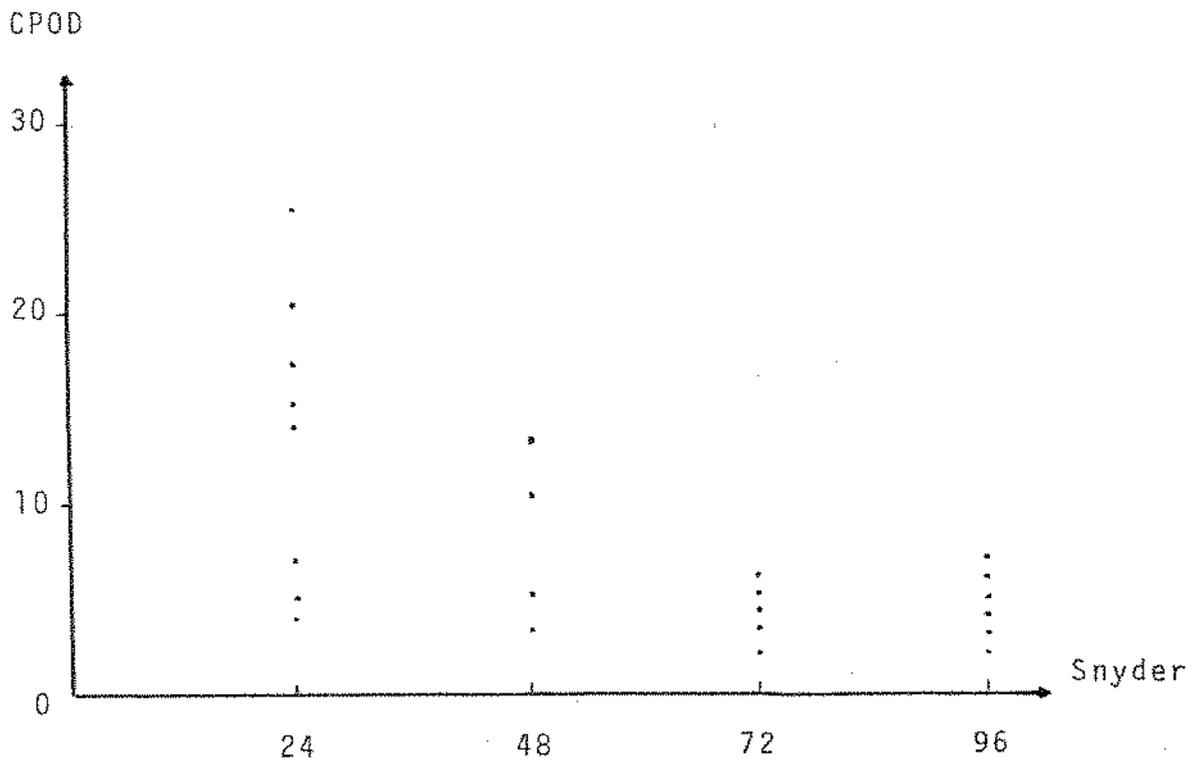


FIGURA 6

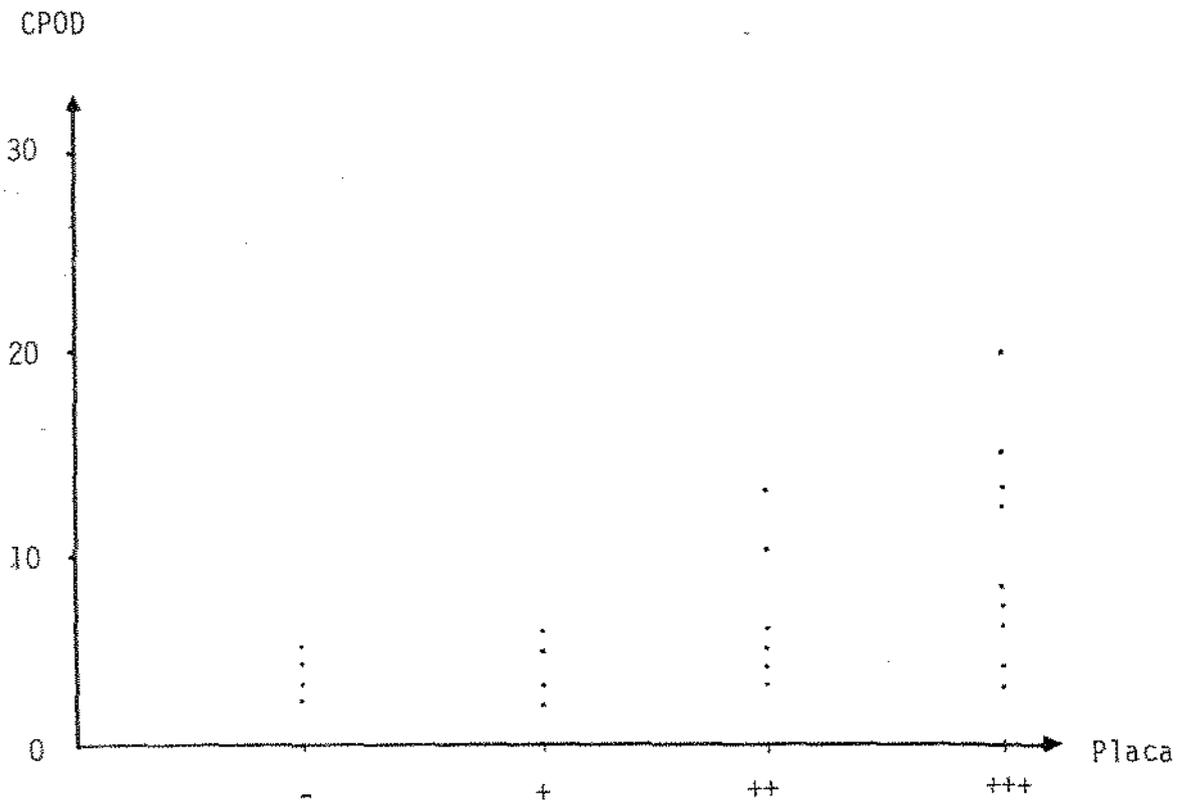


FIGURA 7

VI - DISCUSSÃO

VI - DISCUSSÃO

Parece certo, segundo os conceitos mais atuais, que a cárie resulta, realmente, de um processo de descalcificação do esmalte dental por ácidos elaborados por microrganismos, sobretudo da placa dental.

Uma série de fatores concorrem para a alteração dessa estrutura do dente. De início, é necessária a presença de microrganismos dotados da propriedade de metabolizarem os açúcares da dieta e conseqüente produção de ácido láctico, fato sobejamente demonstrado por vários investigadores. Por outro lado, é necessário que este ataque ácido seja constante, mesmo quando carboidratos, que tem acesso à cavidade oral, já foram consumidos, o que ocorre nos intervalos das refeições e durante o sono.

Esse fato pode ser explicado através das bactérias que metabolizam fontes exógenas de carboidratos diversos, armazenando-os como fontes de reserva sob a forma de carboidrato de reserva semelhante ao glicogênio - amilopectina.

Além de microrganismos acidogênicos, que produzem ácidos, portanto, e dos que o fazem à custa de reservas intracelulares, há que se considerar aqueles que aproveitam a sacarose, dando origem ao início da placa, pela transformação da mesma em glucanos, principalmente o dextrano, de propriedades adesivas.

Essa substância parece ser a principal reponsã

vel pela formação da placa dental e pois, de uma estrutura, to da ela contendo os elementos que contribuem para a formação da cárie. São estes os motivos porque alguns testes bacteriológicos que indicam atividade de cárie foram idealizados.

Informações relacionadas com a cárie e esses testes têm sido obtidas, mas separadamente, ou seja, pelo estudo de cada um deles em trabalhos diversos por autores diferentes.

Por isso ocorreu-nos realizá-los, concomitante mente, a fim de obtermos dados próprios de cada método em função do material de placa colhido de um mesmo paciente. Ao mesmo tempo poderíamos verificar as relações entre os resultados obtidos e o Índice da CPOD de cada criança.

Talvez essas averiguações nos proporcionassem a indicação da maior eficiência de um ou outro teste, para ve rificar a atividade cariogênica.

Para isso, colhemos material de placa dental das faces vestibular e lingual dos molares superiores e labial dos incisivos de escolares de Piracicaba, com Índices CPOD variáveis, e de faixa etária situada entre 8 e 14 anos.

Os resultados que encontramos, acham-se expres sos nas diversas tabelas e gráficos apresentados.

O trabalho realizado teve alguns objetivos, dos quais o primeiro foi verificar a incidência de *Str. mutans* nos locais escolhidos. A análise dos dados mostrou que esses microrganismos sempre foram isolados em quantidades variáveis.

A sua identificação em gênero e espécie baseou-se na morfologia que as colônias apresentavam no meio de Mitis-Salivarius-Ágar, e nas provas de fermentação de sorbitol e manitol em meio de CTA, contendo esses açúcares conforme descrito em material e métodos.

A propriedade de produzir polissacarídeo intracelular foi estudada, semeando-se as amostras de material de placa no meio de Gibbons que possui, na sua composição, glicose em concentração final de 2%. Depois de 24 a 48 horas de incubação as placas eram banhadas com solução iodo iodetada (1u gol). As colônias formadoras de amilopectina coravam-se desde o marrom claro a escuro. Consideramos todas elas como positivas nas contagens realizadas. Esse carboidrato pode aumentar a duração da produção de ácido, quando a fonte exógena de carboidratos foi consumida. Trabalhos neste sentido foram realizados pelos autores BERMAN & GIBBONS (1966) e FITZGERALD & JORDAN (1968).

GIBBONS e col. (1962) semearam germes diversos em meio básico suplementado com glicose, maltose, sacarose e glicogênio a 2%. Verificou como capazes de produzirem o referido carboidrato, os seguintes organismos: *Str. mitis*; *Str. salivarius*; difteróides facultativos e anaeróbios, *Lactobacillus*, *Fusobacterium* e *Bacteroides* sp. A habilidade da flora oral humana de formar polissacarídeo intracelular parece variar com a atividade de cárie e dieta rica em carboidratos. Demonstraram, ainda, uma correlação significativa entre a ativi

dade de cárie e a porcentagem de bactérias de placa capazes de sintetizarem o referido carboidrato. Estabelecendo um paralelo entre as colônias formadoras de polissacarídeo intracelular e o número de cáries de 72 crianças, LOESCH e col.(1967), verificaram que havia estrita correlação entre ambos. Das crianças com maior número de lesões cariosas foi possível obter maior número de colônias formadoras do referido polissacarídeo. Nas bocas sem cáries de 10 crianças as colônias deste tipo perfaziam 3,1% e nas bocas com número igual ou superior a cinco cáries, a porcentagem se elevou para 5,2%.

Os resultados das observações que procuramos realizar nesse sentido estão consubstanciados na tabela 1. A média e a amplitude dos dados relativos ao número de colônias iodofílicas estão na representação gráfica da figura 1. De acordo com as mesmas é possível verificar que a prevalência desse tipo de microrganismo se situa em número de colônias que vão de 10 a 72.

Os nossos achados concordam em parte com os de GIBBONS (1962). Esses autores encontraram em 11 pacientes com ausência de cárie (Índice CPOD = 0) porcentagem de colônias iodofílicas entre 14 a 47% com média de 29,8%; os outros pacientes considerados como portadores de atividade cariosa apresentavam Índice CPOD variável, de 12 a 28, e as porcentagens das colônias iodofílicas variavam de 48 a 64%, com média de 54,3%. As diferenças entre as médias dos dois grupos era estatisticamente significativa ao nível de 0,1%.

O gráfico 1 indica-nos que em 4 pacientes cárie inativos, o número de colônias varia entre 10 e 33 com uma porcentagem igual a 19%.

Nos indivíduos cárie ativos as contagens variavam entre 11 e 72 colônias, com a média de 28,5%.

Esses resultados concordam com os de GIBBONS no que se refere à demonstração da ocorrência de uma maior porcentagem de colônias iodofílicas em relação à incidência de cárie (CPOD mais elevado). No entanto, as porcentagens encontradas pelos referidos autores são mais significativas, exprimindo uma nítida diferença entre a composição da flora iodofílica de placas dentais de pacientes cárie ativos em relação a mesma flora de pacientes cárie inativos.

A formação de placa "in vitro" por amostras de microrganismos orais permite uma hipótese de trabalho para explicar as relações de bactérias indutoras de cárie e lesões cariosas ativas, que ocorrem nas superfícies lisas do esmalte.

O estudo da formação de placa "in vitro" permitiu observar uma variação na quantidade de material mucilaginoso formado em torno dos tubos capilares parcialmente imersos em caldo sacarosado.

Embora essas quantidades sejam avaliadas de maneira subjetiva, é possível estabelecer, previamente, os padrões com os quais são comparados os volumes obtidos experimentalmente. Para isso, usamos a cultura GS-5 de *Str. mutans*, enviada pelo Dr. R. FITZGERALD, incubada nas mesmas condições

em que o foram as amostras das diferentes placas coletadas e portadoras de volumes crescentes durante passagens consecutivas.

A formação de placa "in vitro" pelo material de placa dental que colhemos, não foi observada nos tubos incubados em dessecador onde o consumo de oxigênio se fez por queima de papel. Só ocorreu em anaerobiose (incubação em jarras "gaz-pack"), onde já podia ser anotada a partir de 24 horas. A transferência para novos tubos de caldo sacarosado era feita, lavando-se previamente, o capilar em salina levedurada; nesta manipulação a placa não se deslocava do capilar, o contrário ocorrendo quando se tratava de simples depósito de crescimento bacteriano, sem a aderência, características encontrada na placa. Através da coloração pelo Gram era possível observar uma predominância de formas circulares em cadeia. Semeadas em Mitis-Salivarius-Ágar caracterizaram-se como estreptococos diversos. Nos tubos em que havia formação de placa ocorria também a aderência do crescimento bacteriano nas paredes dos mesmos. De acordo com a tabela 3 é possível verificar que de 40 amostras de placa, 16 não formaram depósito, cinco delas formaram depósito discreto, nove revelaram depósito saliente e as outras 10 deram depósitos abundantes. Esses resultados foram discriminados após três passagens sucessivas com período de incubação de 48 horas cada um.

Ainda, pôde-se notar, que a frequência relativa das amostras que formam placa "in vitro" desde depósito dis

creto a abundante, perfazem um total de 60%.

A figura 3 nos permite uma visão de conjunto de intensidade de formação dos depósitos "in vitro".

Essas variações nos resultados e seus reflexos com o aparecimento de cárie ou não, dependem, provavelmente, do fato de que dentro dos vários ecossistemas da cavidade oral as interações microbianas podem ter um potencial capaz de afetar a formação total da placa.

Estudando a formação de placa em 64 pacientes OLIVEIRA (1974) encontrou cerca de 79,6% de positividade e 20,3% em que não ocorreu a formação. Nós, em 40 pacientes, obtivemos porcentagem menor de colônias formadoras de placa (60%). Talvez maior número de resultado positivo fosse obtido se o inóculo empregado fosse maior. Esse fato é realçado por OLIVEIRA (1974), que em seu trabalho experimental semeou 2 a 3 mg de material de placa.

Salienta o autor que nestas condições as possibilidades de se encontrar microrganismos formadores de placa são maiores.

Por outro lado, esse autor refere-se que coletou material das superfícies dentárias indiscriminadamente, sem prévia seleção de áreas cariadas ou restauradas, enquanto que nós o fizemos de superfícies lisas e íntegras apenas.

Essas porcentagens aqui discutidas referem-se da mesma forma que o autor citado, à presença ou ausência de microrganismos formadores de placa, com a diferença de que nós

procedemos a uma quantificação desses microrganismos em cada paciente, o que não ocorreu na investigação referida.

Em trabalho realizado por KRASSE e col. (1968), no qual os autores empregaram o esquema proposto por JORDAN e col. (1968), o isolamento de estreptococos indutores de cárie ocorreu em porcentagem elevada para escolares com 7 anos (82%) e 13 anos de idade (93%) e em estudantes de odontologia com 21 anos (77%) e 24 anos (59%). Os resultados que encontramos se aproximam mais daqueles obtidos por JORDAN e col. (1969). Esses autores encontraram em escolares de 12 a 14 anos 70% e 48% e algumas cidades dos Estados Unidos e em outras cidades, cerca de 69% e 59%.

Os diversos autores que estudaram essa característica de estreptococos indutores de cárie, realçam a importância da presença da sacarose para que ocorra a síntese de substância mucilagínosa, que confere a esses microrganismos a capacidade de se colonizarem nas superfícies lisas, como nas paredes do tubo e nos capilares em forma de bengala.

A velocidade de produção de ácido por bactérias orais, em determinados meios de cultura está diretamente relacionada com o seu número. Baseado nesse fato, SNYDER (1940) demonstrou que as contagens de lactobacilos podem ser substituídas por um teste colorimétrico simples, que indica a produção de ácido.

Fazendo uma avaliação dos testes de atividade de cárie (SNYDER e col., 1962, 1963) verificaram uma estreita

correlação entre o teste que idealizaram e as contagens de lactobacilos.

A prevalência de lactobacilos nas placas dentais é bem pequena, da ordem de 0,001% (BURNETT & SHERP, 1968). No entanto, nos processos cariosos iniciais com descalcificação incipiente do esmalte do número desses microrganismos aumenta de maneira significativa porque eles passam a encontrar, em tais circunstâncias, condições favoráveis ao seu desenvolvimento.

Todavia, em 1968, LIMA e col., estudando o desenvolvimento de amostras puras de vários microrganismos no meio de SNYDER contestaram as afirmações desse autor de que exclusivamente lactobacilos modificariam o verde-bromo-cresol, pela capacidade de metabolizar a glicose em pH 5,0. Verificaram que certos estreptococos (enterococos) e estafilococos também o fazem.

Concluíram ainda, que os microrganismos de placa poderiam oferecer testes representativos de acentuada atividade cariogênica, em sete placas, moderada atividade cariogênica, em quatro placas, e discreta atividade em duas placas das 18 analisadas. Ao todo, portanto, conseguiu viragem do meio de SNYDER em 13 placas de um total de 18, embora essas viragens tenham ocorrido nos tempos de 24, 48 e 72 horas.

Para a aplicação desse teste como indicativo de atividade de cárie, semeamos 0,2 ml da diluição inicial (10^{-4}) de material de placa cada paciente, no meio de SNYDER, distri

buído em tubos em quantidades de 5 ml, após a sua liquefação e resfriamento a 50°C.

A incubação se processou a 37°C e as leituras foram efetuadas diariamente até as 96 horas.

Na tabela 2 estão expressas as frequências relativas do teste de SNYDER em função da viragem do indicador nos vários tempos de incubação. A figura 2 é uma representação gráfica das condições experimentais indicadas nessa tabela. As porcentagens de positividade foram de 20% indicando acentuada atividade cariogênica, de 10% para atividade cariogênica moderada e de 25% para atividade cariogênica discreta.

As leituras com viragem após 96 h, num total de 45% indicam ausência de atividade de cárie e pois, pequeno número de germes acidogênicos.

Completando nosso trabalho procuramos correlacionar as diversas variáveis em estudo com o índice CPOD, calculando o coeficiente de correlação conforme mostra a tabela 4.

Para melhor visualizar a correlação entre os pares de variáveis, foram constituídos os diagramas apresentados nas figuras 4, 5, 6 e 7.

Da sua análise verifica-se, que as porcentagens de correlação permitem ordenar, em escala decrescente, os testes constantes de contagens de colônias iodofílicas (73,07%), formação de placa "in vitro" (58,24%), contagens de colônias de *Str. mutans* (41,89%) e teste de SNYDER (-26,89%).

Com relação a este último teste verificou - se uma correlação negativa, ou seja, quando aumenta o CPOD, o tempo de viragem diminui. Nos quatro tipos de testes comparados ocorre um aumento do número de colônias quando o índice CPOD também aumenta.

É interessante observar que o valor mais alto do coeficiente de correlação, isto é, para as variáveis CPOD e colônias iodofílicas ocorreu o valor $r = 73,07\%$. Este grau de correlação é alto, mostrando pois elevada correspondência entre esses dois dados. Esse, ao nosso ver, seria um dos testes mais representativos para indicar atividade cariogênica, dentro das condições experimentais em que foi realizado.

VII - CONCLUSÕES

VII - CONCLUSÕES

A análise dos dados obtidos permite-nos as seguintes conclusões:

1. Houve uma correlação mais elevada entre o número de colônias iodofílicas e o índice CPOD (73,07%).
2. Em porcentagens decrescentes estão melhor correlacionados com o índice CPOD os testes de formação de placa "in vitro" (58,24%), contagens de colônias de *Str. mutans* (41,89%) e o teste de SNYDER (-26,84%).
3. Há uma correlação negativa entre o teste de SNYDER e o índice CPOD.
4. De acordo com os nossos resultados a contagem de colônias iodofílicas de material de placa dental seria o teste mais indicado para demonstrar atividade cariogênica.

VIII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VIII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARMIN, S.S. The use disclosing agents for measuring tooth cleanliness. J. Periodont., 34: 227-45, 1963.
2. BERMAN, K.S. & GIBBONS, R.J. Iodophilic polysacharide synthesis by human and rodent oral bacteria. Archs oral Biol., 11: 533-42, 1966.
3. BERTOLINI, P. Incidência e características de microrganismos acidogênicos nos nichos microbianos da cavidade oral. Piracicaba, 1969. (Tese de Livre-Docência). Faculdade de Odontologia de Piracicaba.
4. BIRAL, R.R. Estreptococos das placas dentais humanas e seu significado em relação à cárie. Revta. bras. Odont., 26: 159-72, 1969.
5. BLAYNEY, J.R.; KESEL, R.G.; WACH, E.C. Dental Caries. I. New method of studying bacterial plaque. J. dent. Res., 15: 326-7, 1963.
6. BURNETT, G.W. & SCHERP, H.W. Oral microbiology and infections disease, 3.ed. Baltimore, WILLIAMS & WILKINS, 1968. p.373.
7. BURRONS, W. Textbook of microbiology. 8.ed. Philadelphia, Saunders, 1963.
8. CAMARGO, P.S.; ARAÚJO, W.C.; JURGENSEN, C.A.; OLIVEIRA, C.M. Formação de placa dental "in vitro" com estreptococos isolados de placa dental humana. Ciênc. Cult., 20: 444, 1968.

9. CARLSSON, J. & EGELBERG, J. Effect of diet on early plaque formation in man. Odont. Revy., 16: 112-25, 1965.
10. DOESTSCH, R.N.; HOWARD, B.H.; MANN, S.O.; OXFORD, A.E. Physiological factors in the production of an iodophilic polysaccharide from pentose by a sheep rumen bacterium. J. gen. Microbiol., 16: 156-8, 1967.
11. FITZGERALD, R.J. & JORDAN, H.V. Polysaccharide producing bacteria and caries. Apud GIBBONS, R.J. & BANGART, S. Variation in extracellular polysaccharide synthesis by cariogenic streptococci. Archs oral Biol., 13: 697-701, 1968.
12. _____ & KEYES, P.H. Demonstration of the etiologic role of streptococci in experimental caries in the hamster. J. Amer. dent. ass., 61: 9-19, 1960.
13. GIBBONS, R.J. & BANGHART, S.B. Synthesis of extracellular dextran by cariogenic bacteria and its presence in human dental plaque. Archs oral Biol., 12: 11-24, 1967.
14. _____ & SOCRANSKY, S.S. Intracellular polysaccharide storage by organisms in dental plaque: its relation to dental caries and microbial ecology of the oral cavity. Archs oral Biol., 7: 73-80, 1962.
15. _____ & SPINELL, D.M. Salivary induced aggregation of plaque bacteria. In: MCHUGH, W.D., ed. Symposium of dental plaque, Dundee, Scotland, 1969.
16. _____; DOESTCH, R.N.; SHAW, J.C. Further studies on polysaccharide production by bovine rumen bacteria. J. Dairy Sci., 38: 1147-54, 1965.

17. _____; BERMAN, K.S.; KNOETTNER, P.; KAPINALIS, B.
Dental caries and alveolar bone loss in gnotobiotic rats infected with capsule forming streptococci of human origin. Archs oral Biol., 11: 549-60, 1966.
18. GUGGENHEIN, B.; KONIG, K.G.; HERZOG, E; MUHLEMAN, H.R.
The cariogenicity of different dietary carbohydrates tested in rats in relative gnotobiosis with a streptococcus producing extracelular polysaccharide. Helv. Odont. Acta, 10: 101-13, 1966.
19. HAY, D. The absorption on saliva proteins on to apatite and enamel powder. IADR, 44: 154, 1966. [Abstract.]
20. HILMAN, J.D.; HOUTE, J. VAN; GIBBONS, R.J. Sorption of bacteria to human enamel powder. Archs oral Biol. (impress) Apud HOUTE, J. VAN; GIBBONS, R.J.; BANGART, S.B. Adherence as a determinant of the presence of *Str. salivarius* and *Str. sanguis* on the human tooth surface. Archs oral Biol., 15: 1025-34, 1970.
21. JORDAN, H.V. & KEYES, P.H. "In vitro" methods for the study of plaque formation and carious lesions. Archs oral Biol., 11: 793-802, 1966.
22. _____; ENGLANDER, H.R.; LIM, S. Potentially cariogenic streptococci in selected population groups in the western hemisphere. J. Amer. dent. Ass., 78: 1331-5, 1969.
23. _____; KRASSE, B.; MOLLER, A. A method of sampling human dental plaque for certain "caries inducing" streptococci. Archs oral Biol., 13: 919-27, 1968.

24. JURGENSEN, C.A. & ARAUJO, W.C. Formação da placa bacteriana "in vitro". Arqs. Cent. Est. Fac. Odont., Belo Horizonte, 4: 87-93, 1967.
25. KLEIN, H. & PALMER, C.E. Dental caries in American Indian Children. Publ. Hlthy. Bull., Wash., 239: 1-41, 1937.
26. KRASSE, B. Human streptococci and experimental caries in hamsters. Archs oral Biol., 11: 429-36, 1966.
27. _____; EDWARDSSON, S.; SVESSON, I.; TRELL, L. Implantation of caries - inducing streptococcus in human oral cavity. Archs oral Biol., 12: 231-6, 1967.
28. _____; JORDAN, H.V.; EDWARDSSON, S.; SVESSON, I.; TRELL, L. The occurrence of certain "caries inducing" streptococci in human dental plaque material with special reference to frequency and activity of caries. Archs oral Biol., 13: 911-8, 1968.
29. LIMA, M.G.G.; ARAUJO, W.C.; LIMA, J.C. Estudo sobre o teste colorimétrico de Snyder. Arqs. Cent. Est. Fac. Odont., 5: 83-114, 1968.
30. LOESCHE, W.J. & HENRY, C.A. Intracellular microbial polysaccharide production and dental caries in a Guatemalan Indian village. Archs oral Biol., 12: 189-94, 1967.
31. McCABE, R.M.; KEYES, P.H.; HOWELL, JR., A. An "in vitro" method for assessing the plaque forming ability of oral bacteria. Archs oral Biol., 12: 1653-6, 1967.

32. MC GAUGHEY, C. & FIELD, B.. Effect of salivary proteins on adsorption of cariogenic streptococci by hydroxiapatite. IADR, 47: 169, 1969. [Abstract.]
33. MILLER, W.D. The microorganisms of the human mouth. Philadelphia, S.S. White Dental manufacturing Co., 1890. Apud BURNETT, G.H. & SCHERP, H.W., op. cit. ref. 5.
34. MIRANDA, V.C. Verificação de Estreptococos em placa dental, sulco gengival e língua de crianças com dentição mista e permanente. Suas relações com o Índice de cárie e flúor. Araraquara, 1977. (Tese de Livre-Docência). Fac. de Farmácia e Odontologia, Araraquara.
35. OLIVEIRA, C.M. Isolamento e caracterização de *Streptococcus* de placa dental. Rio de Janeiro, 1974. (Tese de Doutorado). Instituto de Microbiologia, Universidade do Rio de Janeiro.
36. SNYDER, M.L. A simple colorimetric method for the diagnosis of caries actinty. J. Amer. dent. Ass., 28: 44-9, 1940.
37. _____. Correlation and comparison of laboratory findings with the clinical evidence of caries activity in a group of sixty six children. J. Amer. dent. Ass., 29: 2001-11, 1942.
38. _____. Laboratory methods in the clinical evaluation of caries actinty. J. Amer. dent. Ass., 42: 400-13, 1951.
39. _____; PORTER, D.R.; CLAYCOMB, C.K.; SINES, W. Evaluation of laboratory tests for estimation of caries actinty. J. Amer. dent. Ass., 65: 30-45, 1962.

40. _____; _____; _____; _____;
MACHO, F.R. Evaluation of laboratory tests for
estimation of caries activity. Correlation with
specific surfaces. Archs oral Biol., 8: 541-7, 1963.
41. STEPHAN, R.M. Intra-oral hydrogen - ion concentrations
associated with dental caries activity. J. dent. Res.,
23: 257-66, 1944.
42. STRALFORS, A. Investigations into the bacterial chemistry
of dental plaque. Odont. Tidskr., 58: 155-341, 1950.
43. WILLIAMS, J.L. A contribution to the bacteriology of
the human mouth. Dent. Cosmos, 41: 317-49, 1899.
44. WOOD, J.M. & CRITCHLEY, P. The extracellular polysaccharide
produced from sucrose by a cariogenic streptococcus.
Archs oral Biol., 11: 1039-42, 1966.