

CATARINA MARIA COSTA VERNEY

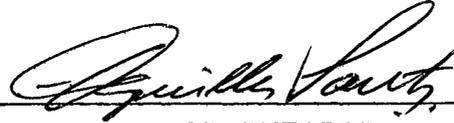
ASPECTOS BACTERIOLÓGICOS DO
DESENVOLVIMENTO DO CÁLCULO DENTAL "IN VITRO"

DISSERTAÇÃO APRESENTADA À UNIVERSIDADE
FEDERAL DE SANTA CATARINA, PARA OBTEN
ÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS
(ODONTOLOGIA OPÇÃO ODONTOPEDIATRIA).

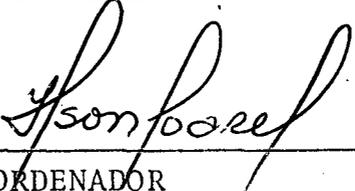
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

FLORIANÓPOLIS - 1982

Este trabalho foi julgado adequado para a obtenção do título de "Mestre em Ciências" e aprovado, em sua forma final, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia, opção Odontopediatria.



ORIENTADOR



COORDENADOR

Apresentado perante a Banca Examinadora composta pelos professores:



ORIENTADOR



MEMBRO



MEMBRO

Trabalho realizado no Laboratório de Microbiologia Oral, Departamento de Microbiologia e Parasitologia da UFSC, sob orientação do Prof. Aquiltes Amaury Cordova Santos.

A MEUS PAIS

Ao Luiz Artur, Rita de Cássia e
Luiz Fernando, meu esposo e meus
filhos, razões de tudo isto.

AGRADECIMENTOS

Para a concretização de nosso trabalho, foi valiosa e imprescindível a colaboração de várias pessoas, às quais desejamos expressar os sinceros agradecimentos.

Ao Prof. Aquiltes Amaury Cordova Santos, como orientador deste trabalho, pelo estímulo, compreensão e amizade em todas as fases da realização da tese.

Aos meus familiares, pelo grande incentivo e apoio dado durante todos os momentos de minha vida universitária.

Ao Luiz Artur Fritsch de Verney, meu esposo, amigo e companheiro, pelo seu constante estímulo e colaboração dos desenhos que ilustram o texto.

A Srta. Iracema Francisca da Conceição, pela sua expressiva ajuda, em todas as horas de nossa ausência do lar.

Aos colegas do Departamento de Microbiologia e Parasitologia, pelo carinho e amizade com que nos receberam e, em especial, ao Prof. Jundyr Ferreira Salles e à Prof.^a Ruth Hertel, pela colaboração recebida.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia Oral, na pessoa do Prof. Ilton Rogério Nunes e da Acadêmica Márcia Beltrame Squizzato, pelo elevado espírito de colaboração com que nos distinguiram durante a realização do presente trabalho.

À amiga Dra. Sílvia Giongo, pela contribuição e estímulo recebidos.

Ao pessoal técnico auxiliar do Departamento de Microbiologia e Parasitologia, em especial ao Sr. Dionísio Manuel Vidal, pela grande colaboração.

Ao Acadêmico Antonio Carlos Marine Garcia, pela grande colaboração.

À amiga Magda Lange Ramos, pelo auxílio na correção das referências bibliográficas.

À Sra. Nilza Pires Machado, pela amizade e valiosa ajuda emprestada.

Ao Prof. Querino Alfredo Flach, pela revisão do português.

Ao Sr. Francisco de Assis Martins, pela datilografia desta tese.

Finalmente a todos quantos que, direta ou indiretamente, contribuíram e colaboraram, de uma forma ou de outra, e cuja confiança nos estimulou e incentivou a um esforço sempre crescente.

ÍNDICE

	PÁG.
INTRODUÇÃO	2
REVISÃO DA LITERATURA.	4
PROPOSIÇÃO	44
MATERIAL E MÉTODOS	45
DISCUSSÃO.	74
CONCLUSÕES	80
RESUMO	81
SUMMARY.	82
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

INTRODUÇÃO

A cárie e a doença periodontal, doenças de grande prevalência no homem, levaram os pesquisadores, nos últimos anos, a estudar com mais ênfase esses dois problemas. A cárie dentária é uma doença infecciosa, transmissível, com uma alta taxa de morbidade. As inúmeras pesquisas mostraram que ela permanece entre uma das doenças de mais alta incidência, ficando a doença periodontal em segundo lugar.

Nos últimos anos a discussão tem sido voltada ao comprometimento bacteriano na doença periodontal, relacionada à placa dental, cálculo dental, endoxina, produtos catabólicos e enzimas, como fatores de agressão ao periodonto humano.. O cálculo dental se forma a partir da mineralização da placa dental, e o seu desenvolvimento assemelha-se ao de outras calcificações biológicas. O mineral orgânico deposita-se nos dentes e subseqüentemente se mineraliza através da incorporação de sais orgânicos do líquido bucal e do soro. Se o acúmulo do material orgânico for evitado, nenhum cálculo se desenvolverá. No desenvolvimento do osso, da dentina e do esmalte, a matriz orgânica parece ser secretada por um tipo de célula e a calcificação procede de forma ordenada. No desenvolvimento do cálculo, a matriz é aparentemente derivada de várias fontes, incluindo bactérias, saliva, soro, células epiteliais, leucócitos e dieta não ingerida.

A ecologia da cavidade oral tem merecido inúmeros estudos, e considerando a importância dos microrganismos na formação da placa dental e na sua evolução para o cálculo dental, e considerando, ainda, o papel deste na etiologia da doença, o presente

trabalho tem como objetivo estudar a microbiota do sulco gengival humano, com ênfase no papel dos bastonetes Gram positivos facultativos, que apresentam potencial de calcificação e a sua sensibilidade à clorhexidina.

REVISÃO DA LITERATURA

Desde há muito os pesquisadores têm dirigido seus estudos no sentido de definir o mecanismo de formação, a composição química e mesmo a possibilidade de inibição da formação do cálculo dental.

Muhlemann (1968) definiu o cálculo dental como sendo o resultado da mineralização da placa dental.

O cálculo dental, também chamado tártaro, é considerado um dos fatores etiológicos da doença periodontal. Os estudos epidemiológicos têm indicado uma relação positiva entre ambos. Esta relação é devida essencialmente à irritação mecânica e aos produtos bacterianos formados na placa (Greene, 1963; Theilade, 1964).

Bernir apud Prichard (1971), sustenta que a formação do cálculo é consequência e não causa da inflamação gengival, e que a inflamação sempre existe, inclusive em gengivas clinicamente normais. Prichard (1971) afirma que o cálculo não é o fator primário ou essencial na etiologia periodontal. Marcos (1977), contudo, discorda dessas informações afirmando que a importância do cálculo reside na sua capacidade de reter ou fixar a placa, perpetuando a doença periodontal.

A composição química do cálculo é variável, contudo a análise química tem mostrado que há predominância de cerca de 80% de substância mineral, contendo cálcio e fósforo, 20% de água e constituintes orgânicos.

Glock & Murray (1938) encontraram uma variação na taxa de cálcio e fósforo, numa razão entre 1,29 e 1,59, em espécimes individuais de cálculos. Essa variação tornou-se evidente através da técnica de difração do RX do cálculo dental.

Rowles (1964), estudando o cálculo dental pela difração do RX, identificou diferentes formas cristalinas de fosfato de cálcio. Quatro foram as formas cristalinas identificadas: hidroxiapatita, fosfato octacálcio, "whitlockite" (ou fosfato beta tricálcio) e bruxita.

Na Tabela 1, foi dada a fórmula de cada uma das amostras e a taxa molar de cálcio e fósforo. A hidroxiapatita tem uma taxa mais alta, ou seja, de 1,67, e a bruxita é a mais baixa e é igual a 1,00; a mistura dessas quatro amostras pode dar uma taxa de 1,24 a 1,59, encontrada para amostra individual de cálculo, por Glock & Murray (1938).

TABELA 1*

COMPONENTE	FÓRMULA**	RAZÃO MOLAR CA/P
Hidroxiapatita	$Ca_{10}(OH)_2(PO_4)_6$	1,67
"Whitlockite"	$Ca_3(PO_4)_2$	1,50
Fosfato octacálcio	$Ca_4(HPO_4)(PO_4)_2$	1,33
Bruxita	$CaHPO_4$	1,00

* Adaptada de Rowles (1964)

** A água de hidratação não está incluída na fórmula

Grande número de amostras de cálculo foram coletadas por Rowles (1964), durante vários anos. Ele fez uma média relativa da abundância de cada forma, variando com a idade e localização do cálculo e os resultados obtidos são dados na Tabela 2.

TABELA 2*

COMPONENTE	PREVALÊNCIA %	ABUNDÂNCIA %	ÁREAS	VARIACÃO C/ IDADE
Hidroxiapatita	99,5	55,3	por toda a dentição	não
"Whitlockite"	80,7	24,2	posterior	aumenta
Fosfato octacálcio	94,8	20,0	anterior superior	não
Bruxita	43,6	8,9	anterior inferior	decresce

O percentual de prevalência, dado na Tabela 2, é a ilustração do fato de que estas amostras de cálculo dental apresentam geralmente três ou, quase sempre, as quatro formas do fosfato de cálcio. E o número da média de abundância não conduz a grande variação na composição que é encontrada entre as amostras individuais.

A hidroxiapatita, encontrada na calcificação normal do corpo, estava presente em todas as amostras, sendo o maior componente.

O "whitlockite" foi mais abundante do que o fosfato octacálcio, mas ocorreu menos frequentemente e é encontrado geralmente na região posterior.

A descoberta do fosfato octacálcio deu-se no cálculo dental e está presente em muitas amostras, mas em proporção mais baixa.

A bruxita é uma forma bem cristalizada do fosfato de cálcio secundário e, em contraste, ocorreu em menos da metade das amostras e, em média, compreende menos do que um décimo do fosfato de cálcio presente, sendo mais comum na região anterior inferior.

Nas calcificações precoces da placa, o mineral tem sido evidenciado pela técnica de difração de RX e contém principalmente cristais de bruxita e pouca quantidade de cristais de apatita e fosfato de cálcio (Schroeder & Bambauer, 1966; Kaufman & Kleinberg, 1973).

Foi observado por Rowles (1964) que a bruxita é mais comum em cálculo supragengival. O cálculo subgengival contém maior concentração de "whitlockite" do que o supragengival, o que, provavelmente, é o resultado da maior concentração do magnésio pre

sente no fluido gengival. O que indica ser a "whitlockite" um produto característico do cálculo maduro, pois não é encontrado com frequência no cálculo jovem. Schroeder & Bambauer (1966) comprovaram os achados de Rowles (1964), confirmando a presença de bruxita em cálculo supragengival jovem, ao contrário da "whitlockite". Schroeder & Bambauer (1966) observaram que, à medida que a placa envelhece, o depósito de bruxita diminui e o de hidroxiapatita, fosfato octacálcio e "whitlockite" aumenta. Assim pode-se perguntar se a bruxita seria uma precursora da hidroxiapatita, de fosfato octacálcio e da "whitlockite".

É conhecido, pelos estudos "in vitro", que a bruxita tende a crescer na forma metaestável e pode ser transformada em fosfato octacálcio, em meio aquoso, na temperatura entre 37°C e 40°C, quando o pH é ajustado entre 6,2 e 7,0 (Newesely apud Newesely, 1968). O fosfato octacálcio é estável "in vitro"; entretanto, se o pH é aumentado, ou se o flúor é adicionado proporcionalmente entre 10 e 100 ppm, o fosfato octacálcio é transformado em hidroxiapatita, enquanto a bruxita não é sensível à presença do flúor (Newesely apud Newesely, 1968). Por outro lado, se o sistema "in vitro" contendo bruxita, é suplementado com magnésio, ela se transforma em "whitlockite", em vez de fosfato octacálcio (Trautz & Zapanta - Legeros apud Schroeder & Bambauer, 1966). Assim, pode-se realmente afirmar que a bruxita é precursora do fosfato octacálcio, da hidroxiapatita e da "whitlockite".

Little *et al.* (1966) observaram que o conteúdo em N e a composição de aminoácido do cálculo de diferentes áreas dos dentes variam, enquanto que o conteúdo de carboidrato foi relativamente constante. Não é possível identificar a matriz do cálculo com qualquer composto químico. o que não é surpreendente, uma vez

que consiste de materiais derivados da saliva e das bactérias an fibiônticas.

A matriz orgânica é composta principalmente de proteína e contém cerca de 12-20% de carboidrato, incluindo 6% de várias hexoses, 4% de fucose (Hampar *et. al.*, 1961; Little *et al.*, 1961).

É interessante notar que entre os carboidratos estão presentes o ácido condroitim sulfúrico, ácido hialurônico e o sulfato de heparina, substâncias não encontradas na saliva e nem na placa, mas que estão presentes na gengiva.

A ocorrência de 3% de lipídio no cálculo sugere uma ori gem bacteriana, visto que esta concentração é maior do que aquela verificada na saliva, Osuoji & Rowles (1972).

Mandel (1963) demonstrou que todos os carboidratos da matriz do cálculo, exceto arabinose, xilose e ramnose, estão pre sentes também na mucina salivar. A autor também detectou a pre sença de ácido siálico, arabinose e xilose no cálculo supragengi val, e assim confirma que a matriz do cálculo é de origem micro biana. É interessante notar que foi identificada, na saliva das glândulas parótidas e submaxilares, a presença da glicose, galac tose, fucose, hexosamina e ácido siálico. A xilose e ramnose so mente foram encontradas na saliva da glândula submaxilar e a ara binose na parede da célula bacteriana. Little *et al.* (1966) con firmam os achados de Mandel (1963) e observaram que a composição do cálculo varia nas diferentes áreas dos dentes. Os autores con cluíram que a matriz do cálculo era semelhante à matriz da placa. Middleton apud Dawes & Shaw (1968) mostrou que as bactérias da placa, realmente, degradam a fucose das glicoproteínas salivares, e isto é possível, desde que a proteína permaneça na placa.

Segundo Little *et al.* (1963), a quantidade de Ca e P, em placas pré-cálculo, aumenta rapidamente com o tempo. Em 1966 Little

et al. mostraram que o material cristalino do cálculo contém, primariamente, fosfato de cálcio, em cerca de 30-35% de Ca e 15-18% de P. A relação Ca/P varia de 1,75-2,00, dependendo da idade e da localização do cálculo.

Schroeder (1963), estudando a formação de depósito supragengival, em folhas de prata, ligadas à superfície lingual dos incisivos centrais inferiores, durante 12 dias, determinou que a taxa de formação de depósito variou individualmente, mas indicou, na média, uma progressão linear.

O conteúdo de cálcio e fósforo, nas cinzas, aumentou, proporcionalmente, de dois para três dias de depósito e foi relativamente alto. A composição química da placa coletada em folha ou diretamente da superfície do dente são similares.

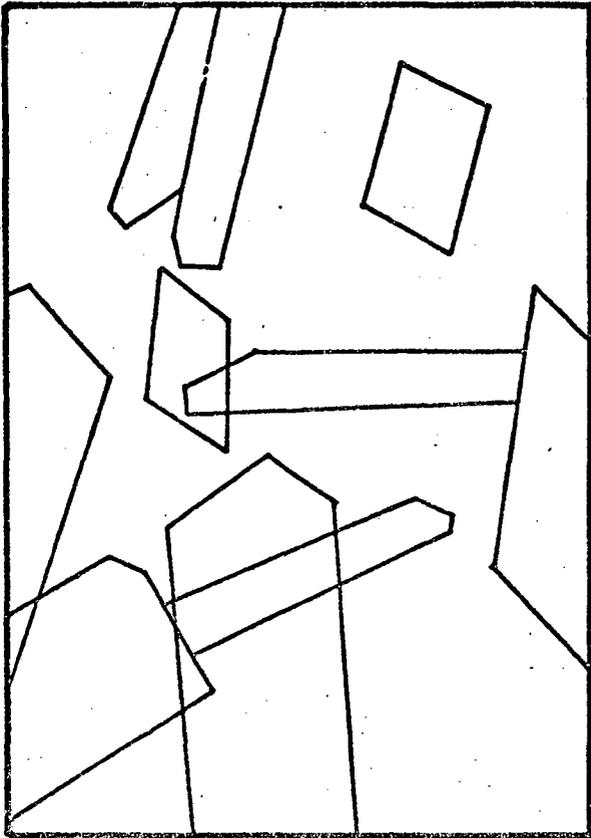
Little & Hazen (1964), comparando as concentrações de Ca e P do cálculo marginal, supragengival e subgengival profundo, concluíram que eles possuem maior concentração de Ca, não sendo evidenciadas diferenças nas concentrações de fosfato. As relações de Ca/P determinadas para o cálculo subgengival profundo, supragengival e marginal, foram 2,04; 1,75 e 1,89, respectivamente.

As concentrações de fluoreto são bastante elevadas no cálculo, sendo várias vezes maiores do que na placa e na saliva. As concentrações de Mg^{++} podem alcançar até 0,9%.

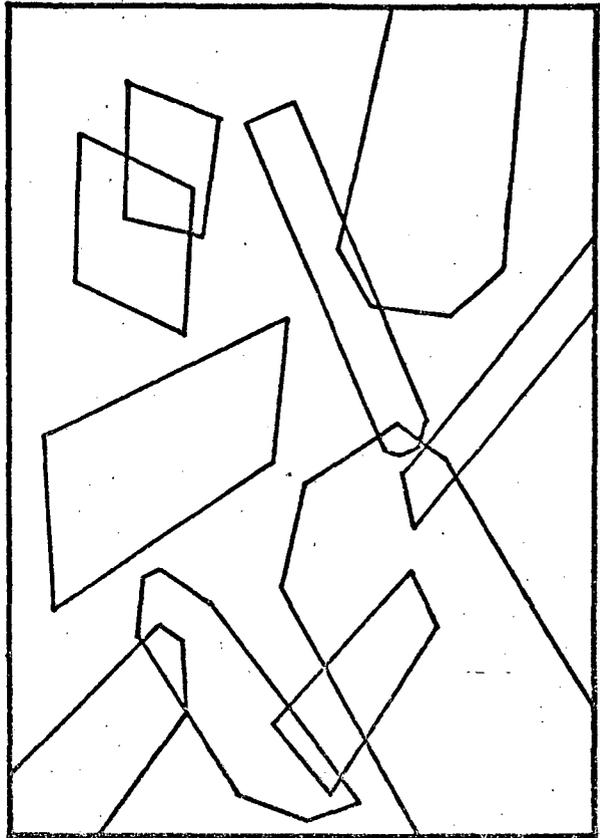
Em 1964, Schroeder observou que os menores cristais de apatita, em forma de agulha ou semelhantes à folha, são concentrados dentro da célula bacteriana, ao passo que cristais maiores, agregados aos fragmentos pobremente formados, estão impressados entre as células descalcificadas (Figura 1).

Newesely (1968) citou em seu trabalho que a maioria dos microscopistas eletrônicos tem observado nas regiões mineralizadas da placa, cristais em forma de agulha, cristais de forma volumosa

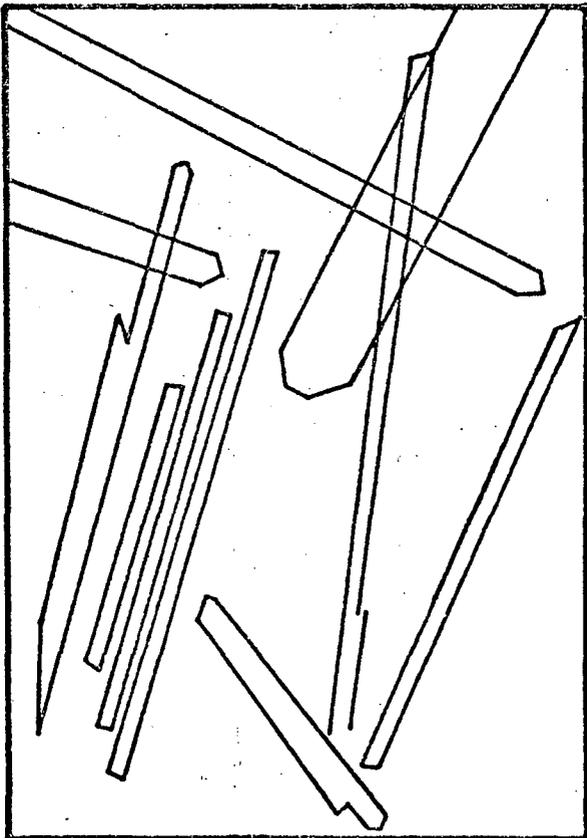
Bruxita



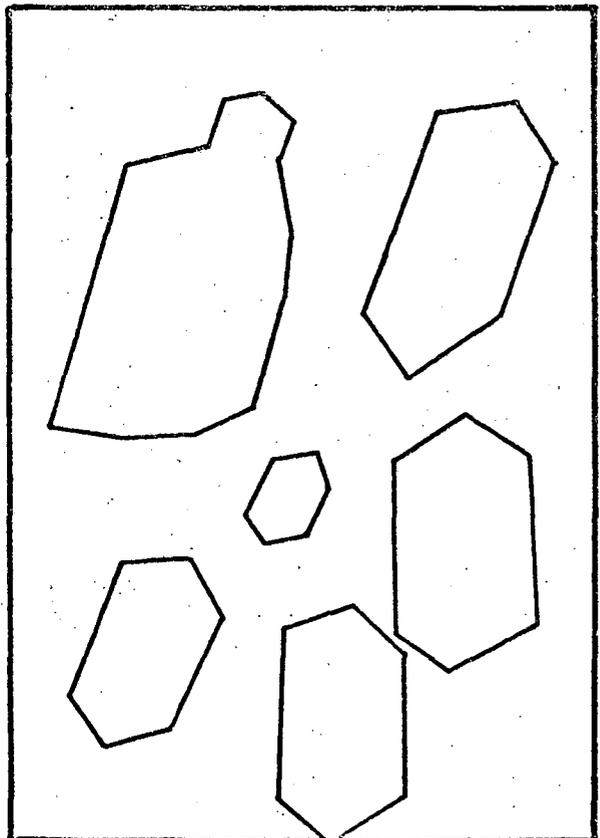
Fosfato Octacálcio



Hidroxiapatita



Whitlockite



Adaptada de Newesely (1968)

(isométrica) e cristais lameliformes ou vários desses tipos ao mesmo tempo. E observou que o cristal de fosfato de cálcio sintetizado "in vitro", em condições similares ao encontrado na placa, respeitando o pH e a concentração, determinou condições para transformação das estruturas de fosfato de cálcio (isto é, hidroxiapatita, "whitlockite", fosfato octacálcio e bruxita) na camada mineralizada da superfície do dente.

Schroeder (1969) descreveu dois centros de calcificação A e B. Tais centros deram reações histoquímicas diferentes e não se comportaram da mesma maneira sob a luz polarizada. Centros do tipo A são encontrados somente quando uma matriz microbiana extracelular está presente, embora a formação do cristal possa ser iniciada intra ou extracelularmente (a última é a mais frequente). O cristal de centro A são cristais em forma de agulha. O centro B representa um tipo diferente de mineralização. Eles aparecem no microscópio como agregados monocristais sem nenhuma matriz entre eles e nem microrganismo.

O autor descreveu três tipos de cristais: a) cristais em forma de agulha foram encontrados em centro tipo A e posteriormente no espaço extracelular e representam os cristais de hidroxiapatita, e é difícil distingui-los; b) grandes cristais rasos, acumulados juntos como fibras, e esses são similares aos cristais de fosfato octacálcio e c) cristais em forma de coluna, com uma secção hexagonal em cruz, a qual forma grandes agregações (centro B). Estes são considerados como bruxita.

A composição química do cálculo pode ser resumida assim: uma parte orgânica e uma inorgânica. A inorgânica é formada de cálcio, fósforo (na forma de hidroxiapatita, "whitlockite", fosfato octacálcio e bruxita), magnésio e flúor. A parte orgânica é

formada de proteínas, lipídios, mucopolissacarídeos, glicoproteínas salivares, células epiteliais e restos bacterianos.

TIPOS DE CÁLCULO DENTAL

O cálculo dental pode ser classificado, quanto à localização, em cálculo supragengival e subgengival.

O cálculo supragengival é chamado, algumas vezes, ptiológico ou salivar devido à origem dos sais minerais ser da saliva. E o cálculo subgengival é denominado piológico, sérico ou hematogênico devido a sua formação ser à expensas de elementos minerais do exsudato gengival (líquido de Brill).

O cálculo supragengival é de consistência dura, de cor branco-amarelada, podendo ser corado por pigmentos alimentares. Incide mais em áreas próximas às saídas das glândulas salivares. É mais abundante na face lingual dos dentes anteriores e na face vestibular dos molares superiores. Geralmente é encontrado em estágios diferentes de calcificações nos diversos dentes, o que indica tratar-se de uma estrutura dinâmica. Pode apresentar-se depositado em placas contínuas ou núcleos de calcificações. E quando sua retenção no esmalte é feita através de uma película orgânica, sua remoção é fácil, e quando há entrosamento entre seus cristais e os dentes, sua remoção é dificultada (Lascale & Moussalli, 1981).

O cálculo subgengival é mais denso e duro, e sua cor varia do marrom, ao esverdeado ou preto. Não mostra tendência a estar localizado próximo aos ductos salivares. De acordo com sua retenção na superfície dentária poderá ser removido com maior ou menor dificuldade. Esta dificuldade de remoção pode ser agravada, quando houver entrosamento entre seus cristais e os da superfície dentária, o que comumente ocorre.

Mandel (1963) mostrou que o cálculo poderá se restringir às porções supra e subgengival. Assim, o cálculo supragengival pode cobrir toda a unidade dental, inclusive a porção coronária, e desenvolver-se numa área cariada.

FORMAÇÃO DO CÁLCULO DENTAL

O cálculo dental é formado pela impregnação da placa dental com cristais de fosfato de cálcio (Theilade & Schroeder, 1966).

O tempo que uma placa demora para atingir o conteúdo inorgânico de 75% a 80% é chamado de "tempo de formação" do cálculo (Mühlemann & Schroeder, 1964). A análise química histoquímica tem indicado que o tempo de formação do cálculo é de doze dias, para os formadores de cálculo, embora ele difira entre os indivíduos (Schroeder, 1963).

O mecanismo, pelo qual a formação do cálculo é iniciado, ainda não é conhecido, contudo várias teorias têm surgido, mas nenhuma foi comprovada. A possibilidade de que as bactérias ou seus produtos sejam os principais responsáveis pela formação do cálculo foi colocada em dúvida por Fitzgerald & Mc Daniel (1960) que verificaram, em animais "germ free" (que não possuem bactérias), a formação de fina camada de cálculo. Além do mais, foi descrito anteriormente que a formação do cálculo geralmente começa, de preferência, na matriz e não no citoplasma da célula bacteriana. No entanto, em condições naturais, é certo que as bactérias e seus produtos influenciam o crescimento da massa do cálculo.

A saliva é saturada com cálcio e fosfato, e disto surgiu a hipótese de que a precipitação de cálcio e fósforo, a partir da saliva, é um resultado do aumento do pH salivar. Estas mudanças poderiam ser devidas à perda de CO_2 que ocorre, assim que a sali

va entra na cavidade oral, ou à produção de álcalis durante o metabolismo da uréia salivar. Assim se explica a localização preferencial do cálculo dental ao nível da desembocadura das glândulas salivares do canal de Stenon e de Wharton.

É possível que o aumento de Ca e P dentro da placa possa iniciar a cristalização. Isto pode ser devido à liberação do cálcio ligado à proteína, pela ação da fosfatase da placa. O conceito mais admitido é o que se baseia no mecanismo epitáctico, cuja formação é iniciada pela ajuda de outro composto, que providenciaria sítios para deposição e alinhamento de Ca e PO_4^3- , em uma configuração correspondente à do cristal. Este cristal inicial funciona, então, como uma semente ou núcleo para que o processo de mineralização continue por sucessivas precipitações de Ca e PO_4^3- .

Mandel (1963) é de opinião que qualquer teoria, para explicar a formação do cálculo dental, precisa ser suficientemente abrangente para incluir o cálculo de glândula salivar. A explicação da precipitação, quando o pH, cálcio e fosfato são suficientes, não concorda com o conceito prevalente da calcificação em qualquer parte do organismo. Este autor concorda também com o conceito epitáctico e reconhece que a concentração de íons, cálcio e fosfatos não é suficientemente alta, em fluido tissular e salivar, para precipitar espontaneamente, mas é suficiente para suportar o crescimento de cristais. Uma vez formado o cristal inicial, Fleisch & Bisaz apud Mandel (1963) consideram que a calcificação ocorre somente em locais específicos, isto é, no dente e no osso, por causa da existência de mecanismos inibitórios. Qualquer que seja o mecanismo, é evidente que o fluido tissular do corpo contém suficiente cálcio e fosfato para prover a calcificação. Quando se formam calcificações ectópicas, é razoável admi

tir que o delicado equilíbrio, normalmente estabelecido, foi perturbado.

Há muita variação na taxa de formação do cálculo em diferentes indivíduos, e disto tem provocado o estudo de suas razões. A possibilidade de que a concentração salivar de cálcio e fosfato deva estar envolvida no processo de calcificação, tem sido estudada, mas os resultados são contraditórios. Mandel & Thompson (1967) encontraram uma alta concentração de uréia e proteína na saliva da glândula submaxilar, de formadores de cálculo, confirmando ser essa elevação um fator importante no desenvolvimento do cálculo supragengival.

A uréia na placa se constitui em um substrato para os microrganismos produtores de urease. Embora a placa dental seja sempre associada à cárie dental, é crescente o seu papel na formação do cálculo e da doença periodontal.

Kleinberg & Jenkins (1964) verificaram a coincidência do pH baixo em áreas da boca com grande incidência de cárie dental, e que as áreas alcalinas estão relacionadas com a doença periodontal, confirmando assim, os estudos de Frostell (1960). Este autor, estudando a atividade ureolítica da placa (medindo a quantidade de amônia produzida a partir da uréia), encontrou uma capacidade maior de produção de substâncias alcalinas na placa, do que de produção de ácido. Se a uréia e a glicose eram introduzidas simultaneamente, na maioria das placas o pH resultante era alcalino. Encontrou uma tendência para um aumento da atividade ureolítica em pacientes com periodontite.

Kleinberg (1970), estudando o metabolismo ácido-básico da placa dento-gengival e a sua relação com a cárie dental e a doença periodontal, observou que existe uma relação com o metabolismo de substrato de nitrogênio, especialmente uréia, o que re

substrato entrará na placa mais facilmente do que ela pode difundir.

Kleinberg (1970) demonstrou que o pH da placa pode variar de baixo (4,0) para um pH alto (aproximadamente 9,5). Sobre essa larga escala de pH, o fosfato de cálcio, que é o principal constituinte do esmalte e da dentina, cemento e cálculo dental, mostra diferença marcante na sua solubilidade. Para a parte inferior da escala, o fosfato de cálcio é altamente solúvel, enquanto que na parte superior da escala é mais insolúvel. Isto explica o fato de que a cárie dental, que é a perda de mineral do esmalte, está associada com a diminuição do pH da placa, enquanto que a formação do cálculo está associada com o pH elevado. Quando o pH está abaixo, é chamado de pH cariogênico, e quando está acima, é chamado de pH calculogênico.

Kleinberg *et al.* apud Kaufman & Kleinberg (1973) mostraram que os níveis de cálcio e fósforo são mais altos na placa de um dia. Níveis altos iniciais de Ca e P na placa podem servir, não somente como depósito destes elementos para proteger o esmalte durante o período de cárie, mas, também, prover um depósito de cálcio e fósforo para subsequente mineralização.

Mandel (1974), estudando a saliva de formadores rápidos de cálculo, encontrou que eles têm um nível de proteína salivar significativamente maior do que os não formadores. Sugeriu-se que a diferença seja qualitativa e não quantitativa. Assim, indivíduos formadores de cálculo devem possuir uma proteína adicional que aumenta a formação de cálculo. Observou-se também que formadores de cálculo têm um nível de uréia salivar maior do que os que possuem maior atividade das enzimas, esterase, pirofosfatase e fosfatase ácida (Draus *et al.*, 1968). Outra diferença é que a viscosidade

resulta na formação de base a um pH alto, que pode levar à deposição e acumulação dentro da placa do fosfato de cálcio, formando o cálculo.

A placa tem duas propriedades que favorecem a acumulação do produto final ácido ou básico, quando substrato de nitrogênio e carboidratos são catabolizados (Figura 2):

- 1 - A placa contém uma alta concentração de bactéria, como resultado, o catabolismo desses substratos, carboidrato e nitrogênio, que podem ser metabolizados pela microflora da placa, é consideravelmente acelerado.
- 2 - A entrada e o catabolismo do substrato são processos mais rápidos do que a difusão dos produtos finais da placa na vizinhança da saliva.

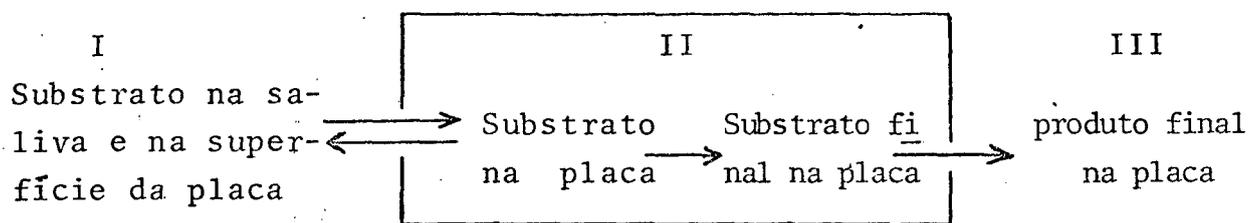


Figura 2 - Um esboço do processo cinético

O açúcar e o amido, encontrados na maioria das dietas, juntamente com o substrato de nitrogênio e uréia, tornam o passo I e o passo II mais rápidos que o III, fazendo com que haja uma acumulação do produto final e uma mudança no pH de linha base. Quando o substrato é carboidrato, a mudança do pH é abaixo (Kleinberg, 1961), enquanto que, com a uréia, a mudança está acima do pH de linha base (Kleinberg, 1967). Quando os passos I e II forem mais lentos, o produto final não acumulará.

Havendo conversão rápida do substrato para o produto final, o gradiente de concentração entre o substrato na saliva e na placa é mais impregnado do que o oposto, em consequência, o

salivar de indivíduos formadores é menor do que a de não formadores. Por outro lado, sugere-se que a diferença, na capacidade de formação do cálculo, não é o resultado de um fator adicional, mas sim a ausência de algum constituinte da saliva. Assim, indivíduos não formadores têm um maior nível de pirofosfato em sua saliva, o que inibiria a formação de cálculo.

MICROBIOTA DO CÁLCULO

Em experiências "in vitro", verificou-se que o papel dos microrganismos, que constituem a maior parte do material da placa, na formação do cálculo, não pode ser ignorado. A micrografia e a microscopia eletrônica do cálculo, formado "in vitro", têm mostrado que as calcificações são associadas com uma variedade de microrganismos de diferente morfologia (Selvig, 1969 e Socransky, 1970).

Nos estudos de calcificações bacterianas "in vitro", as espécies Gram positivas e Gram negativas, tornam-se calcificadas, quando imersas em solução de fosfato de cálcio metaestável e, pela análise de difração de RX, a forma de fosfato de cálcio, encontrada nos depósitos, foi de hidroxiapatita (Wasserman *et al.*, 1958; Ennever, V. & Summers, 1975; Rizzo *et al.*, 1962, 1967; Bowen & Gilmour, 1961; Rosen & Weisenstein, 1964; Streckfuss *et al.*, 1974; Keefe, 1976).

Os tipos de microrganismos, presentes na placa, parecem variar de acordo com a idade do depósito. Em depósito recente, cerca de sete dias, prevalecem os microrganismos cocóides e bastonetes. Nas placas de mais de sete dias, os microrganismos filamentosos tornam-se mais distintos (Turesky *et al.*, 1961a; Theilade, 1964). Em alguns indivíduos, os microrganismos filamentosos foram os organismos igualmente predominantes nos primeiros dias de formação de

placa (Dossenbach & Mühlemann, 1961).

Mandel *et al.*, (1957) demonstraram que as bactérias participam do mecanismo de calcificação. Os autores fixaram nas faces linguais dos incisivos inferiores uma fita de poliéster ultra fina, sobre a qual poderiam acompanhar as possíveis modificações da deposição microbiana antes e após a calcificação, e, assim, descreveram três fases de formação do cálculo: a) fase acelular; b) fase celular e c) fase de mineralização.

Na fase acelular, ocorre a deposição de componentes salivares, provavelmente glicoproteínas, sobre a tira ou sobre a superfície dental. Na fase celular, os microrganismos estão dispostos em paliçada e misturados em uma matriz intermicrobiana homogênea. Na fase de mineralização, os cristais podem ser vistos inicialmente na matriz intermicrobiana, embora a cristalização possa também se iniciar dentro de alguns microrganismos. As numerosas bactérias na matriz orgânica do cálculo têm geralmente elevado a questão de sua significância no processo de mineralização.

O trabalho de Mandel *et al.*, (1957) foi contestado por Baer & Newton (1959) e Fitzgerald & Mc Daniel (1960) que verificaram a formação de cálculo em animais "germ free". Portanto, a hipótese de que a mineralização do cálculo depende sobretudo da formação de apatita dentro da bactéria foi contrariada pelos trabalhos com animais "germ free". Assim, sugere-se que o material orgânico, não bacteriano, funcione como matriz calcificante, embora a presença do microrganismo possa acelerar o processo de calcificação e o aumento da massa do cálculo.

Wasserman *et al.* (1958) mergulharam tiras de celulóide com placa bacteriana aderente e blocos de agar, contendo colônias de *Actinomyces*, tratadas com 10% de formalina, para tirar-lhes a

viabilidade e foram colocadas em uma solução calcificadora, e elas calcificaram igualmente como as células com atividades enzimáticas.

Ennever (1960) verificou que microrganismos filamentosos quando crescidos, em caldo com sais minerais, apresentavam núcleos de calcificação que, pelo estudo através da difração do RX, foram identificados como hidroxiapatita.

Bowen & Gilmour (1961) imergiram dentes mono radiculares, isentos de cárie e esterilizados, em caldo BHI com certa suplementação de cálcio e fosfato e inoculado com *Actinomyces* ou *Leptotrichia*. Observaram que os microrganismos fixaram-se no cimento, e o depósito era semelhante ao cálculo formado "in vivo". Os tubos inoculados com *Actinomyces* e *Leptotrichia* aumentaram a deposição de sais de cálcio.

Wasserman *et al.* (1958), em seu trabalho, provaram que a viabilidade do microrganismo não é um fator essencial para a mineralização; contudo para Rizzo *et al.* (1962 e 1963), a vitalidade da bactéria pode retardar a calcificação. O trabalho de Lie & Selvig (1974) parece corroborar o pensamento de Rizzo *et al.* (1962), pois em seus estudos se comprovou que deve existir alguma mudança degenerativa no microrganismo, antes da mineralização ser iniciada. Rizzo *et al.* (1967) confirmaram, mais uma vez, que as bactérias não são indispensáveis na formação do cálculo, mas garantem uma deposição mais abundante.

Rizzo *et al.* (1962) colocaram culturas puras de bactérias isoladas de cálculo e colocadas em sacos de diálise que foram implantadas dentro da cavidade peritoneal de ratos. Após quatorze dias as bactérias permaneceram viáveis e foram detectadas células, contendo cristais de apatita. Evidentemente a bactéria forma apatita no fluido tecidual, o qual aumenta a probabilidade

de que eles também possam ser formados da saliva ou fluido da placa.

Rizzo *et al.* (1963) mostraram, quanto à mineralização, que certos microrganismos, como os difteróides, calcificavam gradativamente, do citoplasma para os envoltórios, enquanto a *Veillonella* calcificava, dos envoltórios para o citoplasma.

Ennever (1962), Ennever (1963) e Takazoe *et al.* (1963), ressaltaram a importância do *Bacterionema matruchotii*, filamento aeróbio, Gram positivo na formação do cálculo, demonstrando que cristais de hidroxiapatita apareciam no citoplasma do filamento. Prepararam um extrato de microrganismo, que também calcificava, admitindo os autores, que esta fração podia ser liberada na placa dental, para conduzir a calcificação do depósito.

Rosen & Weisenstein (1964) compararam a capacidade de calcificação do *Bacterionema matruchotii* com uma variedade de microrganismos isolados da placa dental e observaram que os microrganismos não calcificaram no mesmo grau que o *Bacterionema matruchotii*, e alguns não mostraram nenhuma calcificação.

Howell *et al.* (1965) realizaram um trabalho em indivíduos que apresentavam, de moderada a intensa deposição de cálculo, com o objetivo de isolar, identificar e quantificar os microrganismos das amostras isoladas: os estreptococos foram os microrganismos predominantes. Bastonetes Gram negativos e *Neisseria* estavam presentes em números elevados. Após noventa dias, as formas predominantes são filamentosas, como *Actinomyces naeslundii* ou *Actinomyces israelii* ou ambos, e as prevalências dos estreptococos declinam. Outras espécies como *Veillonella*, *Bacteróides*, *Fusobacterium* são isoladas, mas em uma percentagem bem menor, assim como são detectadas leveduras ou outros microrganismos semelhantes.

Rizzo *et al.* (1967) colocaram dentes esterilizados e dentes misturados com bactérias em membranas de diálise. Introduziram na cavidade periotonial de ratos e mostraram que as bactérias são importantes na formação do cálculo. Sobre os dentes esterilizados havia apenas uma fina película calcificada, enquanto que, naqueles que tinham bactérias, havia massas volumosas de depósitos calcificados; portanto as bactérias não são indispensáveis, mas garantem uma deposição mais abundante.

Ennever *et al.* (1968) estudaram o possível fator responsável pela ligação do cálcio e um *Bacterionema matruchotii* calcificável. Determinaram que a fração lipídica da célula é o fator responsável pela ligação do cálcio e quando se extraía essa fração não se detectava o cálcio.

Ennever *et al.* (1972) testaram, quanto à calcificação, em um meio sintético, quatorze microrganismos orais isolados do homem ou da sagüi. Quatro dos microrganismos, *Escherichia coli*, *Alcaligenes sp.*, *Enterobacter cloacae* e *Proteus mirabilis*, desenvolveram calcificação intracelular. Através da difração de RX observou-se que *E. coli*, *A. sp.* e *E. cloacae* obtiveram o padrão de apatita, e o *Proteus mirabilis* tinha o padrão de "Whitlockite".

Ennever *et al.* (1974) estudaram a calcificação da *Escherichia coli*, em um meio sintético, contendo fosfato de cálcio metaestável, e houve a formação intracelular de apatita biológica.

Theilade *et al.* (1964), com o microscópio eletrônico, observaram o cálculo dental de ratos "germ free" e convencionais e encontraram, em secções não calcificadas de ratos convencionais, numerosos microrganismos, cristais em forma de agulha, os quais foram identificados com hidroxiapatita e encontrados tanto dentro da bactéria como no meio extracelular. As secções descalcificadas, escurecidas com o paládio, mostraram uma matriz granular intermicrobiana.

O cálculo formado em ratos "germ free" continha cristais em forma de agulha agrupados ao acaso. O depósito, em alguns casos, apareceu mergulhado, e, em outros, apresentou densidade uniforme sobre grandes áreas e foi também identificado como hidroxia patita. As secções escurecidas com paládio mostraram uma camada granular interrompida por pequenos orifícios. A presença de cálculo em animais "germ free" prova que o material orgânico de ori gem não bacteriana pode também servir como matriz para deposição mineral da saliva.

Fitzgerald *et al.* (1960) submeteram ratos Sprague Dawley a uma dieta com cloranfenicol e clortetraciclina e compararam a formação de cálculo com os que receberam dieta cariogênica mais antibiótico. Foi observado em animais que receberam dieta com cloranfenicol ou clortetaciclina não exerceram efeito inibitório na deposição do cálculo, e os que receberam dieta cariogênica mais antibióticos não apresentaram alteração apreciável na deposição de cálculo e demonstraram uma inibição da formação de novas lesões cariosas.

Smith *et al.* (1963) estudaram em ratos Sprague Dawley o efeito da dieta e demonstraram que uma dieta gorda de consistên cia oleosa foi efetiva na produção de cálculo, assim como uma die ta alta em carboidrato de consistência mole. Por outro lado, Mandel *et al.* (1957) encontraram ácidos gordurosos no cálculo e tem conhecimento de que as calcificações patológicas em geral podem ocorrer em áreas onde há depressão de gordura, tubérculos, lesões ateromatosas e lipomas. Desta forma pode-se indicar que o mecanismo para formação do cálculo pode ser o mesmo das calcificações patológicas que ocorrem em outras partes do corpo. Obser vou, também, que quando se dava solução contendo sacarose "ad libitum", isso geralmente resultava em uma diminuição na formação

do cálculo e quando alimento e água eram dados ao mesmo tempo, não mostravam um decréscimo significativo na formação do cálculo, sempre que a sacarose era adicionada na água.

Baer (1964) estudou a importância do fator nutricional e hormonal na deposição do cálculo dental e observou que a dieta é importante. Baer *et al.* (1961), em experiência com ratos Sprague Dawley, colocaram os animais em uma dieta alta de carboidrato que consistia em 66% de amido, 33% de leite desnatado e 2% de pó de fígado, por um período de 30 dias. Após o período experimental verificou que o cálculo formou nos dentes molares, com mínimo de lesões de cárie, e foi notado mais cálculo no maxilar do que na mandíbula.

Plumbo *et al.* (1963) notaram, em ratos Sprague Dawley, que não há diferença significativa entre sexos, mas tem sido uma constante nos dados que as fêmeas tendem a formar mais cálculo do que os machos.

Smith *et al.* (1963) também acharam que a quantidade de fluido ingerido é importante na formação do cálculo, assim os fatores endócrinos tomam um papel importante na influência da quantidade do cálculo dental que é formado. Isso ficou provado na experiência feita por Baer *et al.* (1963) que verificou, após a extirpação das glândulas salivares, uma diminuição na formação do cálculo.

Kinoshita *et al.* (1966) prescreveram uma dieta a dez indivíduos durante um período de sete dias com caramelo "toffes" e não encontraram alteração na formação do depósito.

Turesky *et al.* (1961b), através de seus estudos histológicos e histoquímicos sobre a mudança do meio na formação do cálculo, observaram que, colocando uma tira de acetato de celulose na boca de não formadores de cálculo e depois colocando a mes

ma fita na boca de formadores, nota-se que há um aumento na formação do cálculo quando a troca é feita e, assim, sugere que a formação do cálculo é afetada pela mudança do meio salivar.

Brebou & Mühlemann (1966) fixaram uma fita de poliéster de superfície rugosa à superfície de um dente de formadores de cálculo e constataram um aumento na deposição do cálculo.

Sidaway (1978a) estudou a flora microbiana do cálculo maduro e encontrou microrganismos Gram positivos presentes em mais de 50% de todas as amostras, *Streptococcus sanguis* 96%, *Streptococcus mitior* 93%, *Actinomyces naeslundii* 78%, *Actinomyces israeli* 72%, *Rothia dentocariosa* e *Bacterionema matruchotii* 70%, *Actinomyces viscosus* 67%, as espécies Gram negativas que mais prevaleceram foram *Neisseria pharyngis* 89%, *Selenomonas* 80%, *Fusobacterium nucleatum* 78%, *Bacteroides melaninogenicus* e *Leptotrichia bucalis* 70%, *Campylobacter* 60%, *Veillonella alcalenscens* e bastonetes Gram negativos não identificados 59%, *Eikenella corrodens* 56%. Verificou ainda a ausência de *Streptococcus mutans* e predomínio aumentado de *Streptococcus sanguis* sorotipo I, II. *A. naeslundii*, *A. viscosus* e *V. alcalenscens* estavam mais predominantes em amostras subgingivais e *N. pharyngis*, *B. melaninogenicus*, em amostras supragingivais.

Sidaway (1978b), continuando seus estudos sobre cálculo dental, trabalhou com as 34 espécies de microrganismos isolados do cálculo dental humano e fez experiência de calcificação "in vitro". As culturas foram expostas em solução de fosfato de cálcio metaestável, renovando o meio a cada 20 horas, durante 7 - 17 dias. Diariamente era preparado esfregaço das amostras e corado pelo método de Von Kossa, para demonstrar o material calcificado. Verificou-se que 18 das 35 linhagens calcificaram "in vitro" e que os microrganismos Gram negativos tomam maior parte na produção do cálculo.

Sidaway (1979) fez um estudo comparativo entre calcificação de culturas vivas e mortas em formol. Trinta e cinco amostras de microrganismos isolados de cálculos humanos foram inoculados em disco de ágar e incubados. Após um período de 7 a 14 dias de incubação, foram realizados esfregaços preparados a partir de cada disco e que foram corados pela técnica de Von Kossa. Foi checada a viabilidade e pureza do material de cada disco. Os microrganismos foram imersos em 10% de formalina neutra por 24 horas. As amostras mortas foram então incubadas em vasilha contendo do fluido calcificante e trocado diariamente.

Os seguintes microrganismos foram examinados: *Micrococcus varians*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguis*, *Bacterionema matruchotii*, *Rothia dentocariosa*, *Actinomyces viscosus* ATTC 15987, *Actinomyces naeslundii*, *Actinomyces viscosus*, um bastonete Gram positivo não identificado, *Actinomyces bovis*, *Actinomyces israeli* sorotipo I, *Actinomyces israeli* sorotipo II, *Actinomyces odontolyticus*, *Propionibacterium acnes*, *Neisseria pharyngis*, *Haemophilus para influenzae*, *Haemophilus aphrophilus*, *Haemophilus segnis*, bastonetes Gram negativos não identificados, *Eikenella corrodens*, *Veillonella alcalescens*, *Leptotrichia bucalis*, *Peptostreptococcus* sp, *Bacteroides melaninogenicus*, *Eubacterium saburreum*, *Fusobacterium nucleatum*, *Campylobacter* sp e *Selenomonas* sp.

Obtiveram os seguintes resultados: vinte e uma culturas foram Von Kossa positivos, dezessete destes mortos pela formalina também foram positivos ao método de Von Kossa. O Von Kossa positivo indica que microrganismos calcificados estavam presentes.

O Von Kossa foi negativo para quatorze culturas viáveis e destas, oito mortas pelo formol também foram negativos ao método

do de Von Kossa. A análise de difração de RX mostrou que em culturas viáveis a calcificação dos microrganismos estava associada sempre com hidroxiapatita.

As culturas de microrganismos viáveis induziram a formação de hidroxiapatita, ao passo que as culturas mortas produziram um tipo de hidroxiapatita, mais fraca do que aquela dada pelas culturas viáveis ou somente fosfato octacálcio ou bruxita e, algumas vezes, não era detectado o fosfato do cálcio cristalino.

Sidaway (1980), após estudar várias espécies bacterianas da cavidade oral, concluiu que: a) a maioria das espécies Gram positivas apresentaram calcificação intracelular (associada ao mesossoma); b) os Gram negativos apresentaram calcificação extracelular sugerindo que esta mineralização poderia ter um significado especial na calcificação precoce da matriz do cálculo.

A importância do *Bacterionema matruchotii* foi ressaltada por Ennever em 1962 e 1963, e Takazoe *et al.* (1963) sobre a capacidade de calcificação em diferentes condições experimentais. Posteriormente Rosen & Weisenstein (1964) compararam a capacidade de calcificação desse microrganismo com uma variedade de microrganismos isolados da placa dental e confirmaram os achados destes autores. Os microrganismos não calcificaram no mesmo grau que o *Bacterionema matruchotii* e alguns nem apresentaram calcificação. O trabalho de Sidaway (1978b) mostrou que, juntamente com o *Bacterionema matruchotii*, bastonetes Gram positivos não identificados e *Actinomyces naeslundii*, apresentaram o mesmo nível de calcificação e assim discordou dos achados de Rosen & Weisenstein (1964). Este mesmo trabalho confrontou-se com o trabalho de Ennever *et al.* (1972) que usaram *Actinomyces naeslundii* como controle negativo para calcificação. Ainda neste trabalho, Sidaway mostrou um Von Kossa positivo com as amostras de *A. naeslundii*, em apenas quatro

dias de incubação, em contato com o fluido calcificante. Provou, portanto, que o tempo em contato com a solução calcificadora não parece ser o fator determinante para calcificação. Há um conflito em relação à habilidade das espécies de *Streptococcus* para calcificação "in vitro".

Sidaway (1978b) conseguiu calcificação com as amostras de *Streptococcus salivarius* e *Streptococcus sanguis* (Tipo I), discordando assim dos achados de Streckfuss *et al.* (1974), que relataram a ocorrência de calcificação com as amostras de *Streptococcus sanguis* (Tipo I), mas não com a de *Streptococcus salivarius*. Sidaway (1978b) também testou as amostras isoladas por Ennever *et al.* (1972) e não obteve calcificação, contrariando assim os achados deste último.

Ennever *et al.* (1968) isolaram uma fração lipídica da célula do *Bacterionema matruchotii*, atribuindo a ela a responsabilidade pela calcificação desse microrganismo. Mais tarde, Ennever *et al.* (1977) deram ênfase à fração lipídica e sugeriram que o iniciador da calcificação possa ser uma proteína (complexo proteína-fosfolipídio). Sidaway (1980) sugere que outros lipídios, associados com o material encontrado nas paredes celulares, poderiam também ser considerados como iniciadores da calcificação.

Sidaway (1980), estudando o padrão da calcificação "in vitro", descobriu que a maioria das espécies Gram positivas produzem apenas calcificação intracelular. Este achado apóia o ponto de vista de Vogel & Ennever (1971) e Vogel & Smith (1976) de que as membranas duplas são as fontes de fosfolipídio bacteriano e que podem atuar como núcleo de formação de hidroxapatita intracelular. Sidaway (1980) observou, com frequência, a mineralização da parede celular em culturas de *Micrococcus varians*, *Staphylococcus epidermis* e *Neisseria pharyngis*. Takazoe *et al.* (1963)

encontraram essa mineralização nas culturas de *Bacterionema matruchotii*; portanto, Sidaway (1980) mostrou que não é somente nas culturas de *Bacterionema matruchotii* que ocorre a mineralização da parede celular.

A ligação do cálculo na superfície do dente vem sendo estudada há varios anos. Zander apud Jenkins (1979) foi o primeiro a analisar os vários modos de ligação, através de observações histológicas. Investigações subseqüentes foram feitas por Kopczyk & Conroy (1968) e por Selvig (1969), que estenderam esse estudo pela microscopia eletrônica e descreveram quatro tipos de ligação:

- 1 - Ligação na película adquirida;
- 2 - Se a película estiver ausente, liga-se a pequenas irregularidades no cimento;
- 3 - Massas de organismos que penetram no cimento estavam contínuas com aquelas no cálculo, sendo presumivelmente, presas às lesões cariosas;
- 4 - Cálculos estavam em alguns lugares fechados em áreas de reabsorção do cimento.

E assim explica porque, em alguns casos, a remoção do cálculo é mais difícil e em outros, mais fácil.

Em 1970 o mesmo autor estudou a ligação da placa e cálculo na superfície do dente, de 28 dentes extraídos recentemente, com cálculo supra e subgingival, e concluiu que a ligação de uma placa bacteriana calcificante depende, primeiro, da propriedade adesiva da matriz intercelular orgânica e, segundo, de uma força inorgânica atuando entre cristais do cálculo e substância do dente subjacente.

INIBIÇÃO E PREVENÇÃO

A prevalência da doença periodontal é grande no mundo (World Health Organization, 1961) e a sua incidência aumenta com a idade.

O cálculo dental é o maior fator na etiologia da doença periodontal e sua remoção e inibição são essenciais para o tratamento e prevenção do mesmo (Leung apud Theilade & Schroeder, 1966).

Vários pesquisadores têm tentado encontrar meios terapêuticos de inibição ou remoção do cálculo dental (Weinstein & Mandel, 1964).

Theilade & Schroeder (1966) mostraram com suas pesquisas que a calcificação da placa dental origina o cálculo dental e é uma causa importante na etiologia da doença periodontal.

Muitas experiências foram realizadas por diversos autores com agentes anticálculo que interferiam nos depósitos orgânicos da matriz.

Mühlemann (1968), estudando sobre cálculo dental "in vivo", diz que a prevenção do cálculo pode ser realizada:

- 1º - reduzindo o número de microrganismos da cavidade oral por agentes antibacterianos ou antiplaca;
- 2º - interferindo no mecanismo de aderência das bactérias na superfície do esmalte;
- 3º - interferindo na dureza e espessura dos depósitos amolecidos com agentes inibidores da nucleação e crescimento de cristais, com agentes descalcificadores do cálculo ou agentes que decompõem a matriz calcificada.

Os agentes anticálculo, testados por Mühlemann (1968), com o método da película de "nylon" aderida à superfície do dente, de acordo com seu modo de ação, foram os seguintes:

- 1º - Compostos antibacterianos e de superfície ativa habitam, cloreto de dequadina, oximetileno metil-tio uréia, antarox ricinoleato, fluoreto amino, cloreto amino quaternário de amônio, cloreto de cetil-polyvinil-pirrolidona;
- 2º - Compostos que interferem com produtos extracelulares e matriz orgânica-lisozima, ascoxal (mucolítico), rhozym (proteolítico), úbiquina (fator de difusão);
- 3º - Compostos que interferem na mineralização da placa diamox (inibidor da carbonidrase), ortofosfato, pirofosfato, fluoreto e gluconato de cálcio.

Os compostos antibacterianos e agentes ativos na superfície, administrados diariamente em bochechos, mostraram pronunciada capacidade de inibição na formação de cálculo. É possível avaliar o efeito inibidor dos agentes anticálcio pela simples determinação do conteúdo de cálcio nos depósitos das fitas.

Os pacientes que formam o cálculo rapidamente podem acumular no mínimo 0,8 mg de depósito seco por dente, em sete dias.

É possível que alguns tipos de compostos antibacterianos requeiram poucos dias para exercer seu efeito total na flora oral e marginal. Sob tais condições, é lógico começar com a administração prévia oral de agentes, antibacterianos, quatro a cinco dias antes da colocação das fitas. As observações de Mühlemann (1968) indicam que os inibidores bacterianos, com atividade de superfície, poderão ser os mais promissores agentes, destacadamente aqueles com específica afinidade para placa mineralizada. Não há acordo, na literatura, no que tange à ação do ascoxal (agente mucolítico) como agente anticálcio. Muller *et al.* (1962) acharam 38% de redução em fita de sete dias, e Kristoffersen (1963) não obteve nenhuma inibição com esse agente. Na opinião de Mühlemann (1968) a ação antibacteriana do mucolítico ascoxal é efe

tiva somente durante os primeiros dias de administração, sob a forma de bochechos, mas, com o tempo, a flora adapta-se ao agente. Isto explica o efeito inibidor nos depósitos iniciais e a falta de inibição nos cálculos adultos.

Mukerjee (1969) testou substâncias que dissolvem a parte orgânica do cálculo dental ou seus sais inorgânicos, "in vitro", como possíveis agentes anticálculo. Várias substâncias foram testadas em combinação e o efeito foi estudado por 5 a 10 minutos em misturas finas de cálculo, dentina e esmalte. Nenhuma das substâncias testadas sozinhas ou em combinação com outras tiveram um efeito seletivo no cálculo.

Utilizando-se de bochechos duas vezes ao dia com EDHP (dissódio-hidroxil, 1 difosfato) com uma concentração de P=0,125%, Mühlemann *et al.* (1970) inibiu a deposição de cálculo em fitas padronizadas em incisivos inferiores. O efeito foi mais pronunciado em pacientes que formam cálculo em pouco tempo.

Uma revisão da quimioterapia no controle da placa foi realizada por Johnson & Rozanis (1979) que relataram os vários agentes antimicrobianos, usados em diferentes concentrações, o tempo e o seu modo de aplicação. Aplicação em pomadas tópicas, bochechos, pastilhas, goma de mascar, dentifrícios, bem como a eficácia dos agentes utilizados. Entre os agentes utilizados estavam a clorhexidina, alexidine, os antibióticos, as enzimas, os compostos quaternário de amônio, iodo, fluoreto e xilitol.

A clorhexidina é um antibacteriano do grupo das biguadinas, com propriedades catiônicas. Loe & Schiott (1970) descreveram grandes reduções na formação da placa utilizando dois bochechos diários com solução aquosa de gluconato de clorhexidina a 0,2%, mas não inibiam a formação desta em todas as áreas da

cavidade bucal. No entanto, uma aplicação tópica diária de solução a 0,2% prevenia completamente a formação de placa. Quando o uso dessa substância não era contínuo, a placa reassumia sua formação normal.

As pesquisas estão sendo voltadas para o uso da clorhexidina, procurando-se entender o seu mecanismo de ação. Hugo & Longworth (1964) mostraram que a clorhexidina tem grande afinidade pelas bactérias, provavelmente, em decorrência da adsorção da molécula catiônica (positiva) da clorhexidina à parede celular bacteriana, que é aniônica (tem carga negativa). Essa adsorção aumenta a permeabilidade da membrana bacteriana, abrindo verdadeiros buracos, permitindo a penetração da clorhexidina no citoplasma, causando a morte da bactéria. A teoria de Hugo & Longworth (1964) não é mais aceita, e, em 1970, Loe & Schiott demonstraram que, "in vitro", a clorhexidina é adsorvida pela hidroxiapatita na superfície do dente e pela mucina salivar. E, em 1975, Rolla & Melsen sugeriram que a clorhexidina é um cátion que atua:

1) pelo bloqueio de grupos ácidos aniônicos em glicoproteínas salivares, reduzindo, então, a formação da película e inibindo assim a colonização da placa;

2) pela ligação à bactéria salivar e interferindo, então, com sua adsorção no dente;

3) pelo deslocamento de cálcio na placa e precipitação de fatores de aglutinação da saliva e reduzindo, em consequência, a coesão da placa.

Rolla *et al.* (1970) demonstraram a afinidade do gluconato de clorhexidina pelas mucinas salivares e pela hidroxiapatita. Nos experimentos "in vitro" a clorhexidina adsorveu-se na hidroxiapatita pura, na superfície dos dentes humanos e nas mucinas

salivares e descobriram que, ao baixar a concentração do meio, a clorhexidina era liberada. Propuseram, então, a teoria de que se formava reservatório deste produto nos dentes "in vitro", nos quais a clorhexidina era lentamente liberada prevenindo, assim, a colonização bacteriana e a formação de placas.

Flotra *et al.* (1972) empregaram o bochecho com clorhexidina, junto com a escovação habitual, em 50 soldados, durante quatro meses. Registraram uma redução substancial na quantidade de placas e gengivites, mas mostraram uma periodontite já estabelecida (isto é, gengivite associada com bolsas periodontais com mais de 3 mm de profundidade que não tinha sido influenciada pela droga). A clorhexidina provavelmente não age em placa subgengival. Contudo, após todos os soldados terem feito uma profilaxia completa, a condição gengival melhorou também nestas áreas.

Flotra apud Gjermo (1978) usou a clorhexidina em deficientes mentais por vários anos como droga de prevenção geral de placa, com certo sucesso.

Johansen *et al.* (1975), numa investigação clínica de dois anos, envolvendo 73 estudantes, concluíram que tanto o grupo clorhexidina como o grupo de controle apresentaram reduções similares na placa e que os níveis de gengivite permaneceram imutáveis.

Hansen *et al.* (1975), em experiência com a clorhexidina na forma de gel, concluíram que ela não produz efeito sobre a gengivite e apresenta leve efeito inibidor sobre a formação da placa.

Gjermo (1974) observou alguns efeitos colaterais com o uso prolongado da clorhexidina. Foram observadas nos dentes e restaurações, películas pigmentares e também uma descoloração no

dorso da língua, descamação da mucosa oral.

Witt (1978) descreveu um experimento, alterando a concentração, volume e frequência dos bochechos por dia. Utilizou uma concentração de 0,1% em 50 ml de solução, com bochechos duas vezes por dia, de gluconato de clorhexidina, e obteve resultados relevantes, concluindo que a vantagem do volume maior é permitir vários bochechos, com uma concentração menor, tornando a solução menos amarga e portanto mais tolerada.

Saxer *et al.* (1982), em experiência com dezoito estudantes do sexo feminino, que tomaram parte numa triagem clínica aleatória, parcialmente supervisionados, no qual foram usados bochechos com solução de clorhexidina e um composto quaternário de amônio D-301, durante períodos de sete dias (cinco sem higiene oral), e com um intervalo de uma semana. A formação da placa foi significativamente reduzida por ambas as soluções testes. Nas superfícies dentais, não limpas previamente, a formação da placa foi igualmente inibida pela clorhexidina e D-301. Em superfícies, limpas previamente, o D-301 inibiu significativamente a formação da placa, quando comparada com o controle. A pigmentação dos dentes e da língua foi considerada igual, depois do uso das duas substâncias. A ocorrência de distúrbios foram mínimos, mas mais frequentes durante o período em que o D-301 foi testado.

Add *et al.* (1982) estudaram o efeito de bochechos de clorhexidina pela manhã e à noite, no desenvolvimento de manchas e acúmulo de placa nos dentes. Nesse experimento, dezoito voluntários faziam bochechos uma vez à noite, ou uma vez pela manhã, com clorhexidina em um esquema no qual o "bias" era omitido. Foi prescrito o uso de bochechos por 10 dias durante dois períodos. A formação de placa foi reduzida com os bochechos à noite, e apa

receram mais manchas nos dentes com bochecho matinal e a língua apresentou manchas significativas.

Gjeramo (1974) encontrou alguns efeitos colaterais com o uso prolongado da clorhexidina como manchas nos dentes, pigmentação na língua e descamação da mucosa oral. Add *et al.* (1982) em seu estudo experimental, utilizando bochecho com clorhexidina antes de dormir, reduziu significativamente, mas não aboliu a mancha nos dentes. Portanto essa teoria seria inconsistente, como uma etiologia proposta para manchas nos dentes, associada com o uso de clorhexidina (Prayitno *et al.*, 1979). Add *et al.* (1982) registraram diferenças, não significantes, na formação de placa, com a simples lavagem pela manhã ou à noite, porém uma tendência foi observada, para mais placa, depois da lavagem pela manhã. Tal descoberta pode não ser importante; não obstante reflete uma tendência para a maior formação de placa durante o sono. Assim, com a lavagem noturna a formação de placa teria sido inibida durante o período de sono. A possibilidade de a formação de placa ser maior durante à noite não é ilógica, desde que a sua formação não seja afetada por qualquer ação de limpeza natural da boca e por qualquer efeito inibitório da saliva. Assim, o autor concluiu que não é somente o uso da clorhexidina que reduz a placa, mas, a associação da lavagem noturna, com a escovação do dente durante o dia, pode ser de grande valor.

A alexidine (QR711) pertence também ao grupo das bi-bi-guadinas e tem sido utilizada no controle da placa dental por Barnes *et al.* (1972). Foi testada em bochechos, com solução de 0,35 até 0,05% de alexidine, por Lobene *et al.* (1973) e Weatherford *et al.* (1977) que conseguiram uma redução de 40 a 45% da formação de placa. Carlson *et al.* (1977) não conseguiu redução significativa

na formação de placa, usando a alexidine em bochecho.

Foi notado em todos os estudos que, após a lavagem oral com alexidine, os dentes e a língua, algumas vezes, são manchados em castanho como no caso da clorhexidina.

Os antibióticos têm sido usados com algum sucesso no controle da incidência e severidade de cáries e doença periodontal em modelos animais. Contudo, seu sucesso em pacientes humanos não é livre de problemas. A possível indução de linhagens resistentes de microrganismos, a constante preocupação de manifestações alérgicas e outros efeitos menos frequentes, como náusea e diarreia, devem ser considerados.

Segundo Keyes (1969), podem aparecer microrganismos resistentes às drogas, mas este problema preocupa pouco quando se usa a terapêutica com agentes tópicos, pois estes podem ser administrados em concentração suficiente para obter, com rapidez, o efeito bactericida. Contudo seria muito vantajoso dispor de vários antibióticos, a fim de se poder fazer as substituições exigidas.

A espiramicina possui propriedade interessante de ser retida em um estado ativo, por um período de tempo prolongado na glândula salivar, saliva e osso (Pellerat, 1963).

Keyes *et al.* (1966) demonstraram que a espiramicina foi a mais efetiva dos nove agentes antibacterianos testados no controle da placa dental, cárie e doença periodontal.

Lobene *et al.* (1969) conduziram um estudo bem controlado sobre efeitos da eritromicina sobre a placa em humanos. Depois de um período de dezoito semanas sem escovação, havia uma diminuição de 35% da placa no grupo que usou a eritromicina comparada com o grupo controle. Efeitos colaterais, como diarreia e o de

envolvimento de espécies de microrganismos resistentes aos antibióticos, foram notados.

Alguns estudos clínicos foram conduzidos por Mitchell & Holmes (1965) e Mitchell *et al.* (1967) usando o cloridrato de vancomicina em um composto aderente que reduzia a placa de maneira marcante. O grupo de controle era composto por retardados mentais nos quais não se utilizou nenhuma forma de fisioterapia oral. Após três semanas de terapia, o escore da placa e gengivite retornavam ao nível de pré-tratamento.

Jensen *et al.* (1968) avaliaram os efeitos do cloridrato de vancomicina e polimixina B, em forma de bochechos, sobre a composição da placa e a presença de gengivites em humanos. Depois de vinte e cinco dias, todos os membros do grupo da vancomicina mostraram sintomas clínicos de gengivite e uma formação de maior quantidade de placas em menos tempo, constituída de germes Gram positivos. O grupo da polimixina demonstrou um aumento mais gradual de formas Gram negativas.

Usando, topicamente, uma pomada com vancomicina, Collins (1970) conseguiu a redução na formação da placa e do eritema pós gengivectomia. Em um ano de tentativas clínicas, usando a vancomicina, Jordan & De Paola (1974) e De Paola *et al.* (1977) demonstraram uma supressão de *Streptococcus mutans* e uma redução de cárie oclusal, quando 3% de vancomicina em gel foi aplicada em 268 crianças.

O potencial de controle de placa pela canamicina tem sido testado por Loesche *et al.* (1971) que aplicaram 5% de sulfato de canamicina em "orobase" topicamente em algumas semanas e por um ano (Loesche & Nafe, 1973) em pessoas com baixa prevalência de cárie e moderada e severa gengivite. Clinicamente o escore da

gingivite diminui, embora o escore da placa não esteja em decrêscimo em peso e na densidade bacteriana da placa e é atribuído à droga o decrêscimo na proporção de *Streptococcus* da placa. Não foi detectada diferença no conteúdo de nitrogênio ou carboidrato da placa. E os autores concluíram que a canamicina pode ser usada para melhorar a saúde oral de certas pessoas mentalmente retardadas.

Utilizando-se de bochechos três vezes ao dia, durante 5 dias, com uma solução de 0,5% de tetraciclina em lugar de escovação, Loe *et al.* (1967) demonstraram uma redução de placa, quando comparada ao grupo controle. Não foi observada mudança no escore gengival. Nos anos seguintes foi exaltado um possível uso da tetraciclina como agente no controle da placa. Em 1978, na reunião da Associação Internacional de Pesquisa Dental, trabalhos foram apresentados e publicou-se que a droga teria valor. Pesquisas continuam em relação ao verdadeiro potencial desse antibiótico no controle da doença periodontal (Williams *et al.*, 1978).

Resultados de dois estudos sobre a atuação da nidamicina, publicados por Volpe *et al.* (1969) e Stallard *et al.* (1969), demonstraram uma redução na placa (até 77%) e formação do cálculo (91%) e um decrêscimo no desenvolvimento de gengivites (55 para 72%) quando foram usados bochechos de 0,1% duas vezes diariamente.

Lamentavelmente a resistência bacteriana à nidamicina, igualmente como uma resistência cruzada a antibióticos, levou a FDA (Food and Drug Administration) a não aprovação como agente antiplaca e anticálculo, Loesche (1976).

A penicilina é frequentemente administrada por períodos prolongados, para prevenir a ocorrência de febre reumática e para

o tratamento de doença respiratória crônica. Littleton & White (1964) e Handelman *et al.* (1966) relataram que, durante os primeiros anos seguintes às administrações profiláticas, os pacientes desenvolveram uma redução de 54 a 68% da cárie, comparados a seus pais não tratados. Após esses estudos mencionou-se que a penicilina é muito importante como droga no controle da placa e/ou das bactérias cariogênicas.

Na Inglaterra, usa-se há mais de 20 anos, com resultados satisfatórios, penicilina incorporada à goma de mascar, como tratamento auxiliar na fusospiroquetose. Emslie *et al.* (1972) conseguiram sucesso com o uso da penicilina por via oral, causando menos problemas de alergia, concordando, portanto, com os trabalhos de Handelman *et al.* (1966) e Littleton & White (1964).

As enzimas tem sido utilizadas com certo êxito na prevenção e dissolução da placa microbiana. Muitos dos estudos desenvolvidos têm como prevenir a formação de cálculo. O tipo de ação da droga é a dissolução da placa.

Leung & Draus (1959) utilizaram um sistema de cálculo "in vitro", para investigar o efeito de diversas enzimas sobre a sua formação. As polissacaridases inibiam o cálculo mais efetivamente que as enzimas proteolíticas.

Ennever & Sturzenberger (1961) incorporaram um preparado de enzimas pancreáticas em uma goma de mascar. Dezenove pessoas mastigaram cinco tabletes desta goma por dia, durante oito semanas. Os autores calcularam que havia uma redução de 24% de cálculo e que deveria conseguir-se um veículo que produzisse um contato mais prolongado entre a enzima e o dente. A maioria do grupo reclamou do sabor, consistência e odor do produto.

A enzima que tem recebido considerável atenção e estu

dos, como um agente potencial para o controle da placa, é a dextranase.

Fitzgerald *et al.* (1968) concluíram que a dextranase induzida do *Pennicilium funiculosum* poderia dispersar "in vitro" placas formadas por algumas bactérias da cavidade oral.

Keyes *et al.* (1971) estudaram em 10 pacientes, que foram selecionados por sua capacidade de formação de placa, a ação da dextranase usada em bochechos durante cinco dias. E concluíram que a dextranase diminuiu a quantidade de placa em formação, mas não dispersou uniformemente a placa já formada.

Allen & Courtney (1972), usando "viokase" em goma de mascar, conseguiram a redução na formação da placa, só que os indivíduos lamentavam a irritação da mucosa oral e o sabor desagradável.

Sturzenberger & Leonard (1969) avaliaram os efeitos de bochechos que continham um sal de quaternário de amônio (brometo de domifen) e um agente de ação superficial de redução da placa (cloreto de cetilpiridino). Vinte e sete adultos utilizaram sua própria técnica de escovação, com um bochecho deste composto durante trinta segundos, por uma semana. O grupo experimental mostrou 38% de redução da placa revelada, comparada ao grupo placebo ou com o agente de ação superficial.

Gjerme *et al.* (1974) demonstraram uma melhor inibição "in vitro" da formação da placa com 0,2% de solução de cloreto de benzalcônio. Entretanto, quando testado clinicamente, quatro dos cinco voluntários desenvolveram lesões descamativas da mucosa oral e os pesquisadores descartaram seu uso.

O uso de iodo, como agente antiplaca, tem sido focalizado pelos pesquisadores Kligerman & Bissada (1975) que, usando bo

chechos com 0,2% de iodo, provaram a ineficácia na diminuição da placa, mas quando soluções tópicas a 2% de I_2 e de 2,4% de NaI foram aplicadas, houve um decréscimo na acumulação da placa e um desenvolvimento de gengivite mais lento foi observado.

Addy *et al.* (1977) não mostraram redução na formação de placa, mas encontraram 30 a 40% de redução na contagem bacteriana salivar, quando 80 voluntários lavaram, duas vezes ao dia, com uma solução de 1% de "povidone iodine".

Os investigadores concluíram que o iodo não é um adjunto para a higiene oral ou tratamento de gengivite crônica.

Keyes *et al.* (1966) observaram que a administração de fluoreto de sódio, em concentração de 0,5 para 1,23% em hamsters, retardava a acumulação de placas no sulco gengival e nas coroas dos dentes. O retardamento na formação da placa terminava ao suprimir a aplicação do fluoreto. Concluíram então, que os fluoretos podiam inibir a placa.

Loesche *et al.* (1975) sugeriram que o uso de fluoreto determinou a supressão da placa bacteriana e especialmente *Streptococcus mutans*.

Glantz apud Loesche (1977) sugeriu, a partir de estudos "in vitro", que o fluor poderia diminuir a energia das superfícies do dente e, em consequência, dificultar a ligação da bactéria na superfície dental. Muitas bactérias da cavidade oral não aderem à superfície do dente tratado com o fluoreto. Se aderir, o peso resultante da sua proliferação causa a quebra das microcolônias. A força coesiva, mantendo a bactéria unida, seria maior do que a força adesiva, segurando a bactéria no dente. Em outros estudos "in vitro", o fluor tem mostrado desadsorver a bactéria da hidroxiapatita porque ele se liga, mais efetivamente do que a bac

téria, nas áreas de carga positiva no cristal de hidroxiapatita (Rolla & Melsen (1975). Essas observações indicam que o flúor pode exercer um efeito antiplaca, sem necessariamente matar a bactéria.

A substituição, na dieta, de sacarose pelo xilitol levou Scheinin & Makinen (1975) a concluir que a dieta com xilitol reduz a quantidade de placa em aproximadamente 50%, diminuindo tam bém a incidência de bactérias acidogênicas e cariogênicas na boca e conseqüentemente o número de cáries.

PROPOSIÇÃO

Considerando a importância dos microrganismos na formação da placa dental e na sua evolução para o cálculo dental, e considerando, ainda, o papel deste na etiologia da doença periodontal, o presente trabalho tem como objetivo estudar a microbiota do sulco gengival humano, com ênfase no papel dos bastonetes Gram positivos facultativos, que apresentam potencial de calcificação e a sua sensibilidade à clorhexidina.

MATERIAL E MÉTODOS

Para analisar a microbiota, envolvida na formação do cálculo dental, será coletado material não calcificado do sulco gengival.

1. Preparo da vidraria

Lavagem

Os tubos de vidro permaneceram totalmente imersos, em uma bacia com água e detergente por 24 horas. Após este período, todos os tubos foram escovados por dentro e por fora e lavados em água corrente, separadamente, para retirar o excesso de detergente. Posteriormente todos os tubos foram lavados em água corrente por 2 horas, para eliminar qualquer resíduo do detergente. O mesmo procedimento foi realizado em relação às placas de Petri.

Secagem

O material foi invertido, com a parte superior para baixo, em secador de plástico, sendo coberto por um pano, a fim de ficar ao abrigo da poeira.

2. Preparo dos dentes

Molares superiores e inferiores e incisivos superiores e inferiores recém-extraídos foram utilizados como corpo de prova. Após a extração, os dentes foram lavados com água e sabão e foi procedida a remoção de todos os detritos existentes.

Todo tecido cariado foi removido com auxílio de alta rotação, assim como as restaurações presentes. Após esta etapa os dentes molares foram seccionados, aproximadamente em sua linha

média, com o auxílio do motor de baixa rotação e disco de carborundum. Após o seccionamento, todas as raízes foram perfuradas com auxílio de uma broca esférica. Pela perfuração foi passado um fio ortodôntico que foi convenientemente torcido, de modo a formar um anel. Este tinha a finalidade de facilitar a transferência do dente de um tubo para outro. Os dentes molares seccionados foram colocados em tubos separados e as metades correspondentes recebiam um número, de maneira a não haver troca entre elas. Os dentes foram mergulhados em água destilada e foram esterilizados a 120° C durante 20 minutos.

3. Preparo das bengalas

Tubos capilares, com cerca de 3 cm de comprimento, foram levados à chama para fechar as extremidades e em seguida uma delas foi aquecida e dobrada (como uma bengala). Esse recurso foi usado por Oliveira & Araújo (1968), quando estudaram a formação de placa "in vitro" por *Streptococcus*.

4. Meios de cultivo

O meio utilizado para as experiências foi o BHI "Brain Heart Infusion" (difco) composto de:

"Calf Brain, Infusion from"	200,0
"Beef Heart, Infusion from"	250,0
"Peptone"	10,0
"Sodium Chloride"	5,0
"Disodium Phosphate"	2,5
"Dextrose"	2,0

Fórmula em gramas por litro.

4.1 - Meio utilizado para o isolamento das amostras

Para o isolamento das amostras foi usado o BHI adicionado de ágar a 2%.

Preparo do BHI ágar:

A partir da dissolução de 17,5 g de BHI (Difco), em 500 ml de água destilada, seguiu-se a adição de ágar (Difco) na proporção de 2%. Em seguida o material foi aquecido em banho-maria até completa dissolução. O mesmo foi esterilizado durante 20 minutos a 120° C.

5. Método de colheita e transporte

O material foi coletado de cinco pacientes, com curetas Mc Call esterilizadas por autoclavagem. O material foi coletado do sulco gengival da região de molares superiores direito ou esquerdo, da face vestibular e da face lingual dos incisivos inferiores direito ou esquerdo. Na colheita do material, a cureta foi introduzida no sulco gengival de maneira a não coletar placa dental depositada nas coroas ou sobre a papila gengival. Para isso, foi solicitado aos pacientes que fizessem vários bochechos com água destilada, com a finalidade de remover depósitos não aderentes. O material foi colocado diretamente em papel de alumínio, previamente tarado e esterilizado por autoclavagem.

6. Método de dispersão

O material coletado foi pesado em balança analítica. Após o cálculo do peso do material, foram realizadas as diluições do material, quando foi respeitada a proporção de 1 mg do material para 10 ml do diluente (10^{-4}). O diluente foi salina fisiológica (NaCl a 0,8%). A dispersão do material foi realizada no homogeneizador de Potter. O pistilo foi movimentado cerca de vinte vezes, visando a uma perfeita dispersão dos grumos. A partir dessa homogeneização foram realizadas as diluições de 10^{-4} até 10^{-8} .

7. Método de isolamento das amostras

Após a dispersão e a preparação das diluições decimais, 0,1 ml de cada diluição foi espalhado sobre a superfície do BHI ágar, pela técnica de esgotamento. Foram utilizadas duas placas para cada diluição que foram incubadas em microaerofilia (método da vela) e em anaerobiose. A anaerobiose foi realizada na jarra tipo Brewer, com envelope gerador de H₂. O material foi incubado à temperatura de 37° C, durante quatro dias. Duas placas foram incubadas em microaerofilia e duas em anaerobiose, à temperatura de 37° C, durante quatro dias. As placas, contendo entre 30 a 300 colônias, foram as escolhidas para o exame. Com o auxílio do microscópio estereoscópio, cerca de 30 colônias foram escolhidas para serem transferidas para caldo BHI.

8. Morfologia colonial

A morfologia colonial foi estudada no meio BHI ágar. As colônias foram examinadas com o auxílio do microscópio estereoscópio.

9. Morfologia celular

A morfologia celular foi estudada a partir do BHI inclinado. Foram preparados esfregaços e corados pelo Gram.

10. Manutenção das culturas

As culturas foram mantidas em BHI ágar inclinado. Cada tubo foi mantido à temperatura ambiente e à temperatura do refrigerador, sendo transferidos para meio fresco, a cada quinze dias.

11. Provas Bioquímicas

11.1 - Produção de catalase

Para verificar a produção de catalase, uma gota

ta de água oxigenada a 3% era adicionada a uma suspensão do crescimento bacteriano colocado em lâmina de vidro. O aparecimento de bolhas indica o desdobramento do peróxido de hidrogênio pela catalase. Para facilitar a observação foi utilizado o microscópio estereoscópio.

11.2 - Redução do Nitrato

Para o estudo da redução do nitrato, foi utilizado o meio "Tryptic Nitrate Medium" (Difco) que é composto de:

"Bacto Tryptose"	20 g
"Bacto Dextrose"	1 g
"Dissodium Phosphate".	2 g
"Potassium Nitrate".	1 g
"Bacto-Ágar"	1 g
Água destilada	1000 ml

As amostras foram inoculadas nesse meio e incubadas à temperatura de 37° C, durante 72 horas.

A pesquisa do nitrato foi realizada, tomando-se um mililitro do cultivo e adicionando-se ao mesmo 0,2 ml de cada um dos reagentes, para a detecção do nitrato. Coloração rosa-vermelho indicava reação positiva - nitrato reduzido. Aos tubos, que não apresentavam modificação na cor, era adicionada uma pitada de Zinco em pó, e, após 30 minutos, a leitura era repetida. O desenvolvimento de cor rosa era anotado como reação negativa - nitrato não formado no meio (Sutter *et al.*, 1975).

11.3 - Produção de Indol

O meio de cultivo foi o mesmo descrito no item anterior. As amostras foram inoculadas no meio e incubadas a 37° C, durante 72 horas. Nos tubos em que houve crescimento eram colocadas algumas gotas do reagente de Erlich. Quando era observada a

formação de um anel cor-de-rosa, o teste era considerado positivo, e a formação de um anel amarelo indicava teste negativo.

11.4 - Hidrólise de gelatina

Para a prova da hidrólise da gelatina, foi utilizado o caldo simples que é composto dos seguintes elementos:

Água de carne	1000 cm ³
Peptona	10 g
NaCl	5 g

A gelatina foi acrescentada na concentração de 4%. Cerca de 4 ml foram distribuídos em tubos 13 por 100 mm e esterilizados durante 20 minutos a 120° C. Após o inóculo, as culturas foram incubadas, durante 72 horas, a 37° C. Após o período de incubação, a leitura foi realizada, colocando-se os tubos na geladeira durante uma hora, e após este período os tubos eram invertidos. Os tubos não gelificados foram considerados positivos.

11.5 - Provas do Vermelho de Metila (VM) e Voges-Proskauer (VP)

As amostras foram cultivadas no meio de Clark & Lubs. Esse meio foi preparado da seguinte maneira: 0,5g de peptona, 0,5 g de fosfato dipotássio (K₂HPO₄) em 100 ml de água destilada. Após esterilização a 120° C, durante 15 minutos, no meio foram acrescentados assepticamente, 5 ml de uma solução de glicose previamente esterilizada por filtração. As amostras foram inoculadas no meio e incubadas por quatro dias a 37° C.

A leitura da prova do VM foi efetuada pela adição do seguinte reagente:

Vermelho de Metila

Vermelho de Metila 0,1 g
Álcool absoluto. 300 ml
Água destilada 500 ml

Quando era observada uma coloração vermelha, o teste era dado como positivo e, amarela era dado como negativo.

A prova do VP foi efetuada pela adição do seguinte reagente:

Reativo de Barrit

VP₁ solução 1 - Naftol 6 g
 Álcool etílico 100 ml
VP₂ solução 2 - Hidróxido de K 16 g
 Água destilada q.s.p. . . . 100 ml

Quando era observada uma coloração vermelha, a reação era positiva.

11.6 - Crescimento em diferentes concentrações de Cloreto de Sódio

Preparamos o caldo B₁ sem cloreto de sódio, e depois o mesmo foi acrescentado para atingir as seguintes concentrações: 2%, 4%, 6,5%. As amostras foram inoculadas no caldo B₁ e incubadas durante 48 horas, a 37° C. Após este tempo as amostras foram inoculadas, com o auxílio de uma pipeta estéril, nos meios com as diferentes concentrações de NaCl. A turvação do meio era considerada como prova de tolerância ao NaCl.

11.7 - Fermentação dos Carboidratos

Para a fermentação dos carboidratos foi utilizado o meio B₂ (é o caldo B₁ sem glicose) acrescido do indicador de Andrade e do substrato teste.

O caldo B₁ é composto dos seguintes elementos:

"Beef Extract of Muscle" (BBL) 5 g em 1000 ml de água destilada, seguido de aquecimento a 50° C, durante 60 minutos e imediatamente a 80° C, durante 10 minutos. Em seguida ao aquecimento, filtra-se em papel e acrescenta-se os seguintes elementos:

Proteose peptona (Difco)	10 g
Cloreto de Sódio (Merck)	5 g
Fosfato de potássio monobásico (Baker) :	2,5 g
Thiotone (BBL)	3 g
Extrato de levedura (BBL)	2 g
Glicose (Reagen)	2 g

Ajusta-se o pH a 7,3. Esterilizar a 120° C durante 20 minutos. A concentração do substrato teste foi de 1%, com exceção da Arabinose que foi acrescentada ao meio, para atingir a concentração de 0,5% e do glicerol (0,8 ml v/v). As concentrações foram de acordo com Holdeman & Moore (1972).

O tempo de esterilização foi de 115° C, durante 15 minutos, com exceção da Arabinose cujo tempo foi de 12 minutos.

As amostras foram inoculadas no caldo B₁ durante 48 horas, a 37° C. Após, com auxílio de uma pipeta de 1 ml, graduada a 1/10 e esterilizada por autoclavação, foi dispensada uma gota da cultura nos tubos com os substratos: glicose (Reagen), frutose (Merck), sacarose (Merck), galactose (Merck), maltose (Difco), sorbitol (Merck), lactose (Reagen), arabinose (Difco), Glicerol (Reagen). Os tubos inoculados foram incubados a 37° C, durante 14 dias, procedendo-se à leitura a cada 24 horas. Quando a coloração do meio se tornava vermelha, o teste era dado como positivo.

12. Tipo Respiratório

Para verificar o tipo respiratório, as amostras foram

semeadas em placas de ágar sangue. Para cada amostra foram utilizadas duas placas que foram incubadas em condições de aerobiose e de anaerobiose (em jarra tipo Brewer, com envelope de GasPak, durante quatro dias, a 37° C). As placas foram divididas em quatro, e em cada parte foi semeada uma amostra.

13. Hemólise

Nas mesmas placas que foram usadas para verificação do tipo respiratório foi verificada a produção da hemólise.

14. Formação de placa "in vitro"

Para formação de placa "in vitro", as amostras foram inoculadas no meio básico recomendado por Gibbons & Banghart (1967), modificado, e foi utilizada a técnica descrita por Bier (1970).

Meio básico

Tripticase (BBL)	10 g
Extrato de levedura (BBL).	1,5 g
NaCl (Merck)	1,0 g
KH ₂ PO ₄ (Baker)	1,0 g
Sacarose (Merck)	25 g
Água destilada500 ml

Cerca de 10 ml foram distribuídos em tubos 18 X 140 mm (com os dentes) e 3 ml em tubos de 13 X 100 mm (com a bengala) e esterilizados a 110° C. As amostras selecionadas foram inoculadas no meio básico e incubadas durante 48 horas a 37° C. Após cada 48 horas, os dentes e bengalas eram transferidos, com o auxílio da alça de platina, para outros tubos contendo o meio básico. Essa transferência foi feita quatro vezes e, à medida que as passagens eram realizadas, anotavam-se os resultados.

Os dentes utilizados no experimento foram os incisivos superiores e inferiores e os molares seccionados.

O controle dessa prova foi realizado da seguinte maneira: os tubos com o meio básico, dentes e bengalas foram incubados a 37° C, durante 48 horas; a cada 48 horas os corpos de prova eram transferidos.

15. Efeito da Clorhexidina na formação da placa

Os molares seccionados (parte A e parte B) foram utilizados na formação da placa bacteriana. A parte "B" foi utilizada para verificar o efeito da clorhexidina na formação da placa bacteriana. O material empregado para verificar o seu potencial antiplaca foi o "Plak Out" (Hawe Neos Dental) nas concentrações de 0,2%, 0,1% e 0,05%.

As amostras que melhor formaram a placa "in vitro" foram as utilizadas nos seguintes experimentos.

Clorhexidina a 0,2%

1º Experimento

Corpo de prova: dentes molares seccionados (parte "B")
incisivos inferiores (controle)

A solução de clorhexidina a 0,2% foi preparada da seguinte maneira: para 10 ml de água estéril adicionou-se oito gotas de "Plak Out".

A metade do dente, designada parte "B", foi colocada na solução de clorhexidina durante um minuto, e, em seguida, o dente era transferido com o auxílio da alça de platina para o meio de cultura de 24 horas, ali permanecendo durante um minuto, e após eram transferidos para tubos com o meio básico e incubados durante 48 horas, a 37° C. A cada 12 horas os resultados eram anotados.

O controle foi realizado de duas maneiras. Na primeira, o dente foi colocado na solução de clorhexidina a 0,2% duran

te um minuto e depois transferido para o meio básico e incubado durante 48 horas, a 37° C. A segunda, o dente foi colocado na cultura de 24 horas durante um minuto e em seguida para meio básico e incubado da mesma maneira que o anterior (Ver Figura 3).

2º Experimento

Após o 1º experimento os dentes foram lavados, esterilizados e utilizados no 2º experimento.

Corpo de prova: molares seccionados (parte "B")
 incisivos inferiores (controle)

Os dentes foram mergulhados na solução de clorhexidina por um minuto e em seguida transferidos para tubos estéreis e levados para secar, a 37° C na estufa, por um período de oito horas. Após esse período os dentes eram mergulhados no meio de cultura de 24 horas, durante um minuto, e depois transferidos para tubos estéreis e levados à estufa por oito horas, a 37° C. Após esse período, o procedimento foi o mesmo utilizado na experiência anterior.

O controle foi feito em duas etapas: na primeira, o dente foi mergulhado na solução de clorhexidina durante um minuto e, em seguida, transferido para tubo estéril e levado para secar, a 37° C na estufa, durante oito horas. Depois desse período, o dente foi transferido para o meio básico e incubado por 48 horas, a 37° C.

Na segunda etapa, o dente foi mergulhado no meio de cultura de 24 horas por um minuto e em seguida transferido para tubo estéril e levado para secar, a 37° C na estufa, por um período de oito horas, após o que foi transferido para o meio básico e incubado por 48 horas, a 37° C (Ver Figura 4).

O mesmo procedimento foi utilizado para as concentra

ções de 0,1 e 0,05% (concentração a 0,1% - 4 gotas de clorhexidina; a 0,05% - 2 gotas).

O experimento com as bengalas foi o mesmo realizado com os dentes.

CALCIFICAÇÃO "IN VITRO"

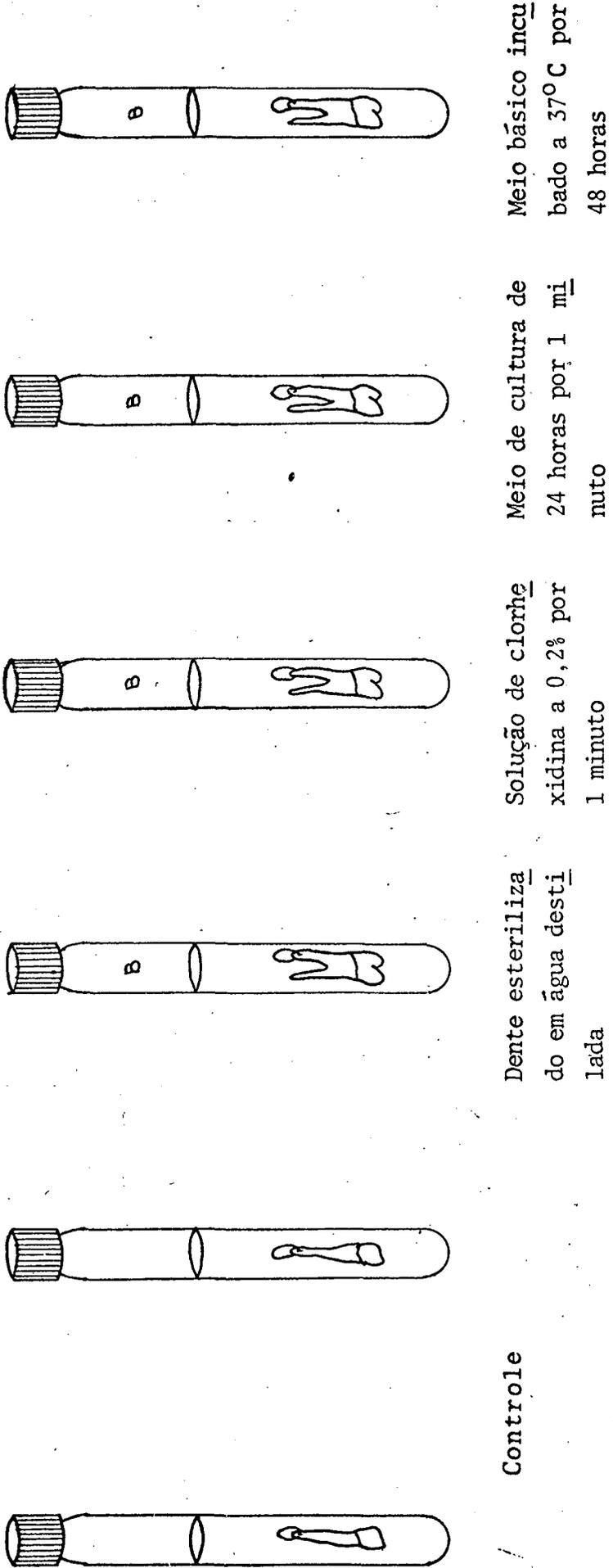
Após a formação de placa os dentes e as bengalas foram transferidas para uma solução calcificadora. Essa solução foi preparada de acordo com Wasserman *et al.* (1958). Foi preparada uma solução concentrada, contendo 0,70 M NaCl, 0,05 M KCl e 0,22 M NaHCO₃, em 100 ml de água destilada e esterilizada a 120° C, durante 20 minutos. Em seguida foi preparada uma solução, contendo 90 ml de água destilada, adicionada de 52 mg de KH₂PO₄, para atingir uma concentração final de 12 mg% de P. A solução foi esterilizada a 120° C, durante 20 minutos. Após a esterilização foram adicionados, com uma pipeta estéril, 10 ml da solução concentrada na solução de KH₂PO₄. Feita a diluição, foi borbulhado CO₂ através dessa solução, para baixar o pH para 6,0 unidades. Em seguida foi adicionado CaCl₂, para atingir a concentração final de 4mg% de Ca, e através da passagem de ar comprimido pela solução, o pH foi ajustado para 7,0. Essa solução foi preparada na câmara asséptica, e cerca de 7 ml foram distribuídos em tubos 18 X 140 mm, e 4 ml em tubos 13 X 100 mm. Com o auxílio da alça de platina transferimos os dentes e bengalas para solução calcificadora e os incubamos durante quinze dias, a 37° C. Após o tempo de incubação os dentes e bengalas foram transferidos para uma placa de Petri esterilizada. Com o auxílio do microscópio estereoscópio, o depósito foi examinado e, com uma cureta, foi retirada uma parte de placa, a partir da qual foi preparado um esfregaço para ser corado pelo Von Kossa modificado (Ennever, 1960).

TÉCNICA DE VON KOSSA MODIFICADA

Esta técnica foi utilizada para se verificar a presença de substâncias calcificadas. A sequência da técnica foi a seguinte:

- a) Fixar o material, esfregação fino seco ao ar, passar três vezes na chama do bico de Busen.
- b) Lavar por 30 minutos em água deionizada.
- c) Cobrir a lâmina com solução de nitrato de prata a 1%, durante 2 minutos.
- d) Lavar por 30 minutos em água deionizada.
- e) Cobrir a lâmina com solução de hidroquinona a 1%, durante 2 minutos.
- f) Lavar por 30 minutos em água deionizada.
- g) Fazer coloração de fundo com fucsina.

FIGURA 3



Controle

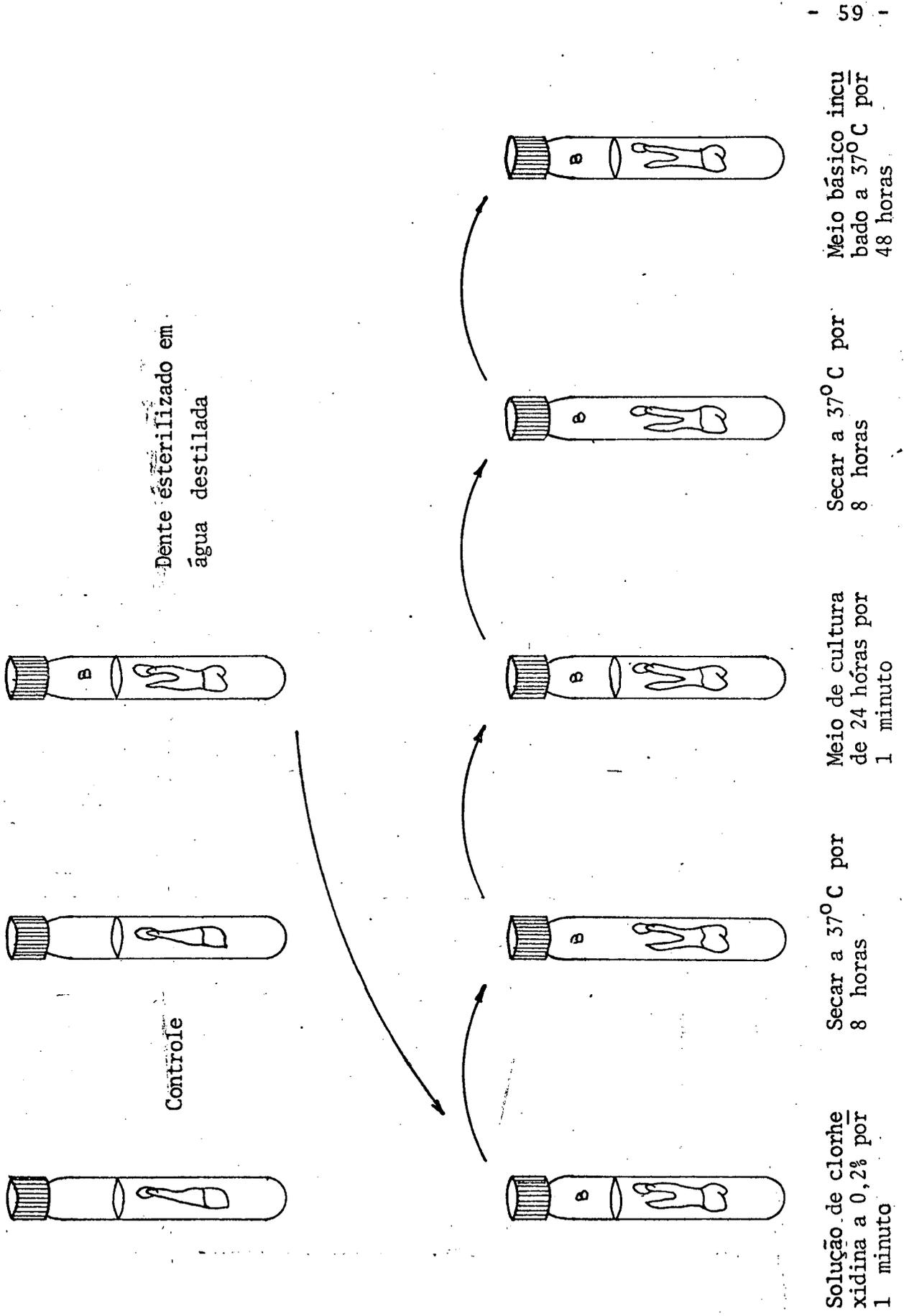
Dente esteriliza do em água destilada

Solução de clorhexidina a 0,2% por 1 minuto

Meio de cultura de Meio básico incubado a 37°C por 48 horas

Meio de cultura de Meio básico incubado a 37°C por 48 horas

FIGURA 4



RESULTADOS

Para o isolamento dos microrganismos foi colhido material do sulço gengival de cinco pacientes formadores de cálculo dental. O isolamento foi realizado pela técnica descrita por Bier (1970). O número de colônias crescidas em cada material é o constante da Tabela 3, onde pode ser observado que a média do número de colônias crescidas em microaerofilia foi de $106,28 \times 10^8/g$ e o número de colônias crescidas em anaerobiose foi de $336,96 \times 10^8/g$.

O número de colônias isoladas no BHI ágar e que foram repicadas para o caldo BHI e incubadas em aerobiose é o que consta na Tabela 4. Das 253 amostras isoladas, 174 (68,7%) foram identificadas, sendo 120 (47,5%) de cocos Gram positivos, 10 (3,9%) de cocos Gram negativos, 33 (13%) de bastonetes Gram positivos e 11 (4,3%) de bastonetes Gram negativos, conforme pode ser observado na Tabela 5.

Após o estudo da morfologia colonial, morfologia celular e características bioquímicas e fisiológicas, as amostras de bastonetes Gram positivos foram separadas em três grupos, que foram comparados com os grupos de Bier (1970), de acordo com a Tabela 6.

As amostras de cocos Gram positivos foram identificadas como *Streptococcus* sp. (Tabela 7), e os cocos Gram negativos como *Neisseria* sp. e como *Veillonella* sp.

Para o estudo do potencial de formação da placa bacteriana "in vitro" foram utilizadas 15 amostras de acordo com a Tabela 8. O resultado da formação da placa bacteriana "in vitro", em dentes humanos e bengalas de vidro em meio sacarosado, pelas amostras estudadas, pode ser observado na Tabela 9. Algumas amostras de bastonetes e cocos Gram positivos não formaram placa bacteriana, no período experimental, outras formaram, apenas a partir da segunda

transferência, e algumas formaram já a partir da primeira inoculação.

Das amostras de bastonetes Gram positivos -apenas três apresentaram resultados semelhantes, formando a placa bacteriana, a partir da primeira inoculação, em dentes humanos e em bengalas de vidro. A amostra 38 formou a placa bacteriana em dentes humanos, a partir da terceira transferência, ocorrendo o mesmo com a amostra 52; e nas bengalas de vidro a partir da primeira inoculação. Com a amostra 59, resultados semelhantes foram observados, dando a formação da placa bacteriana a partir da terceira transferência, tanto em dentes humanos como nas bengalas de vidro. Com a amostra 54, os resultados apresentaram divergência. A formação da placa bacteriana deu-se nos dentes humanos, porém nas bengalas não houve formação. As amostras que não formaram placa bacteriana nos dentes, também não formaram nas bengalas.

Três amostras de cocos Gram positivos não formaram placa bacteriana, em dentes humanos e em bengalas de vidro. A amostra 63, deu resultado semelhante, formou a placa bacteriana a partir da segunda transferência em dentes e em bengalas. Com a amostra número 5 o resultado não foi semelhante. Em dentes humanos a formação da placa bacteriana se deu, a partir da segunda transferência, e nas bengalas a partir da primeira inoculação.

Para estudar a ação da clorhexidina a 0,2%, 0,1% e 0,05%, nas amostras formadoras de placa "in vitro", em dentes e em bengalas de vidro, foram utilizadas sete amostras de acordo com as Tabelas 10, 11 e 12.

A clorhexidina a 0,2% inibiu a formação de placa nos dentes, nas duas condições experimentais (dentes secos e não secos). Contudo, não inibiu a formação de placa nas bengalas de vidro (Tabela 10).

A ação inibitória da clorhexidina a 0,1% (Tabela 11) começa a desaparecer após 24 horas de incubação, pois as culturas de 36 horas já apresentavam crescimento. Mesmo a 0,1%, a clorhexidina não inibiu a formação da placa nas bengalas.

Os mesmos resultados foram observados quando a concentração de clorhexidina foi de 0,05% (Tabela 12).

Para verificar a calcificação "in vitro" da placa bacteriana aderida a dentes humanos e bengalas de vidro, foram utilizadas amostras de cocos e bastonetes Gram positivos de acordo com a Tabela 13.

A calcificação foi evidenciada pela técnica de Von Kossa.

A amostra 54 formou placa apenas na superfície do dente e não calcificou.

As amostras 62, 63 e 69, aderidas aos dentes e às bengalas, apresentaram calcificação total do citoplasma celular.

As amostras 52 e 60, quando aderidas aos dentes humanos, apenas iniciaram a calcificação. As mesmas amostras aderidas às bengalas, contudo calcificaram totalmente.

TABELA 3 -- NÚMERO DE COLÔNIAS ($\times 10^8$ /g) ORIUNDAS DO SULCO GENGIVAL DE PACIENTES
FORMADORES DE TÁRTARO E CRESCIDAS NO MEIO BHI

CASO	Nº DE COLÔNIAS CRESCIDAS EM MICROAEROFILIA	Nº DE COLÔNIAS CRESCIDAS EM ANAEROBIOSE
1	200,00	810,00
2	20,00	22,40
3	177,00	220,00
4	120,00	620,00
5	14,40	12,40
MÉDIA	106,28	336,96

TABELA 4 - NÚMERO DE COLÔNIAS REPICADAS PARA CALDO BHI E INCUBADAS EM AEROBIOSE *

CASO	ISOLADAS EM MICROAEROFILIA	ISOLADAS EM ANAEROBIOSE	TOTAL
1	26	30	56 (37)
2	27	27	54 (38)
3	24	24	48 (28)
4	25	29	54 (37)
5	22	19	41 (34)
TOTAL	124	129	253 (174)

* Os números entre parênteses representam o total de amostras identificadas em cada caso.

TABELA 5 - DISTRIBUIÇÃO DAS 174 AMOSTRAS ISOLADAS DE CINCO PACIENTES FORMADORES DE CÁLCULO DENTAL, DE ACORDO COM AS SUAS CARACTERÍSTICAS MORFO-TINTORIAIS

CASO	COCOS GRAM POSITIVOS	COCOS GRAM NEGATIVOS	BASTONETES GRAM POSITIVOS	BASTONETES GRAM NEGATIVOS
1	23	6	5	3
2	32	0	5	1
3	19	3	5	1
4	28	1	7	1
5	18	0	11	5
TOTAL	120	10	33	11

TABELA 6 - CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DOS TRÊS GRUPOS DE BACTÉRIAS FILAMENTOSAS ISOLADAS DO SULCO GENGIVAL HUMANO, NO PRESENTE TRABALHO E DAS AMOSTRAS DE B. matruchothii, O. viscosus e R. dentocariosa

TESTE EMPREGADO	GRUPO I (n = 3)		GRUPO II (n = 4)		GRUPO III (n = 3)		B. matruchothii* O. viscosus* R. dentocariosa*	
	+	Facul.	+	Facul.	-	Facul.	+	Facul.
Catalase	+		+		-		+	
Tipo Respiratório		Facul.		Facul.		Facul.		Facul.
Redução do NO ₃	+		+		+		+	
Produção de Indol	-		-		-		-	
VM	+		-(3/4)		-		+	
VP	+(2/3)		+		+		-	
Hidrólise da Gelatina	-(2/3)		-		-		-	
Hemólise	-		-		-		-	
NaCl a 2%	+		+		+		+	
NaCl a 4%	+		-(2/4)		-		+	
NaCl a 6,5%	+		+(1/4)		-		+	
Glicose	+		+		+(2/3)		+	
Maltose	+		+		+		+	
Sacarose	+		+		+		+	
Frutose	+		+		+(1/3)		+	
Galactose	+		-(3/4)		+(1/3)		+	
Lactose	+(2/3)		-		-		+	
Arabinose	+(2/3)		-		-		+	
Sorbitol	-		-		-		-	
Glicerol	+		-		-		+	

* Dados de Bier (1970).

TABELA 7 - CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DAS AMOSTRAS DE COCOS GRAM POSITIVOS ISOLADAS NO

PRESENTE TRABALHO

T E S T E S	A M O S T R A S				
	5	14	29	63	65
Catalase	-	-	-	-	-
Redução NO ₃	-	-	-	-	-
Hidro. Gela.	-	-	-	-	-
Cresc. 2% NaCl	+	+	+	+	+
Cresc. 4% NaCl	+	+	+	-	+
Cresc. 6,5% NaCl	-	+	+	-	+
T. resp.	F*	F*	F*	F*	F*
Galactose.	+	+	+	+	+
Lactose.	-	-	+	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-
Glicerol	-	+	+	-	+

* Igual a Facultativo.

TABELA 8 — AMOSTRAS DE BASTONETES GRAM POSITIVOS E COCOS GRAM POSITIVOS ISOLADOS DO
 SULCO GENGIVAL HUMANO, UTILIZADAS PARA O ESTUDO DA FORMAÇÃO DA PLACA BACTERIANA "in vitro"

GRUPOS	NÚMERO DE ORDEM	DATA DE ISOLAMENTO
I (<i>Odontomyces viscosus</i>)	38	12/3/82
	45	18/3/82
	49	18/3/82
II (<i>Rothia dentocariosa</i>)	43	18/3/82
	52	18/3/82
	59	05/4/82
	54	05/4/82
III (<i>Actinomyces sp.</i>)	62	18/3/82
	60	05/4/82
	69	05/4/82
Cocos	5	08/3/82
	14	08/3/82
	29	11/3/82
	63	05/4/82
	65	05/4/82

TABELA 9 - FORMAÇÃO DE PLACA BACTERIANA "in vitro", EM MEIO DE SACAROSE, POR AMOSTRAS DE BASTONES E COCOS GRAM POSITIVOS EM DENTES HUMANOS E EM BENGALAS DE VIDRO

GRUPOS	AMOSTRAS	DENTES HUMANOS				AMOSTRAS	BENGALAS DE VIDRO			
		TRANSFERÊNCIA					TRANSFERÊNCIA			
		1º	2º	3º	4º		1º	2º	3º	4º
I	38	-	-	+	+	38	+	+	+	+
	45	-	-	-	-	45	-	-	-	-
	49	-	-	-	-	49	-	-	-	-
II	43	-	-	-	-	43	-	-	-	-
	52	-	-	+	+	52	+	+	+	+
	59	-	-	+	+	59	-	-	+	+
	54	-	-	+	+	54	-	-	-	-
III	62	+	+	+	+	62	+	+	+	+
	60	+	+	+	+	60	+	+	+	+
	69	+	+	+	+	69	+	+	+	+
COCOS GRAM POSITIVOS	5	-	+	+	+	5	+	+	+	+
	14	-	-	-	-	14	-	-	-	-
	29	-	-	-	-	29	-	-	-	-
	63	-	+	+	+	63	-	+	+	+
	65	-	-	-	-	65	-	-	-	-

TABELA 10 - AÇÃO DA CLORHEXIDINA NAS AMOSTRAS FORMADORAS DE PLACA "IN VITRO" EM DENTES HUMANOS E BENGALAS DE VIDRO

AMOSTRAS	CLORHEXIDINA à 0,2%												
	EM DENTES						EM BENGALAS						
	SECO		NÃO SECO		NÃO SECO		SECO		NÃO SECO		NÃO SECO		
	12h	24h	36h	48h	12h	24h	36h	48h	12h	24h	36h	48h	12h
38	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	C
52	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	C
60	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	C
59	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	C
62	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	C
69	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	C
5	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	C

a = ausência de crescimento

C = crescimento moderado

TABELA 11 - AÇÃO DA GLORHEXIDINA NAS AMOSTRAS FORMADORAS DE PLACA "IN VITRO" EM DENTES HUMANOS E

BENGALAS DE VIDRO

AMOSTRAS	C L O R H E X I D I N A à 0,1%															
	EM DENTES						EM BENGALAS									
	S E C O			NÃO SECO			SECO			NÃO SECO						
	12h	24h	36h	48h	12h	24h	36h	48h	12h	24h	36h	48h	12h	24h	36h	48h
38	a	a	i	e	a	a	i	e	a	a	i	e	C	C	C	C
52	a	a	i	e	a	a	i	e	a	a	i	e	C	C	C	C
60	a	a	i	e	a	a	i	e	a	a	i	e	C	C	C	C
59	a	a	i	e	a	a	i	e	a	a	i	e	C	C	C	C
62	a	a	i	e	a	a	i	e	a	a	i	e	C	C	C	C
69	a	a	i	e	a	a	i	e	a	a	i	e	C	C	C	C
5	a	a	i	e	a	a	i	e	a	a	i	e	C	C	C	C

a = ausência de crescimento
i = iniciando o crescimento
e = crescimento escasso
C = crescimento moderado

TABELA 12 - AÇÃO DA CLORHEXIDINA NAS AMOSTRAS FORMADORAS DE PLACA "IN VITRO" EM DENTES HUMANOS E BENGALAS DE VIDRO

AMOSTRAS	CLORHEXIDINA a 0,05%													
	EM DENTES						EM BENGALAS							
	SECO			NÃO SECO			SECO			NÃO SECO				
	12h	24h	36h	48h	12h	24h	36h	48h	12h	24h	36h	48h	12h	12h
38	a	a	i	e	a	a	i	e	a	a	i	e	C	C
52	a	a	i	e	a	a	i	e	a	a	i	e	C	C
54	a	a	i	e	a	a	i	e	a	a	i	e	C	C
59	a	a	i	e	a	a	i	e	a	a	i	e	C	C
62	a	a	i	e	a	a	i	e	a	a	i	e	C	C
69	a	a	i	e	a	a	i	e	a	a	i	e	C	C
5	a	a	i	e	a	a	i	e	a	a	i	e	C	C

a = ausência de crescimento
i = iniciando o crescimento
e = crescimento escasso
C = crescimento moderado

**TABELA 13 - CALCIFICAÇÃO "IN VITRO" DA PLACA BACTERIANA ADERIDA A DENTES HU-
MANOS E BENGALAS DE VIDRO APÓS 15 DIAS DE INCUBAÇÃO**

AMOSTRAS	EM DENTES	EM BENGALAS
52	I	C
54	n	NR
62	C	C
63	C	C
60	I	C
69	C	C

I = iniciando a calcificação no citoplasma da célula
n = não apresentou calcificação
C = calcificação da célula
NR = não realizado

DISCUSSÃO

Para o isolamento das bactérias filamentosas do sulco gengival foi retirado material de cinco pacientes formadores de cálculo dental e, pelos resultados obtidos nesse trabalho pode-se concluir que existe uma variação, em relação ao método de incubação do material. O material que foi incubado, em condições de anaerobiose, apresentou um número maior de colônias do que em microaerofilia (Tabela 3); todavia, convém salientar que em nossas amostras, não avaliamos as condições de saúde periodontal. O trabalho de Gibbons *et al.* (1963) mostrou que a flora bacteriana da placa dental de pacientes com periodontopatias é formada, predominantemente, por bactérias anaeróbias.

Na Tabela 5 observa-se a predominância de cocos Gram positivos concordando com o trabalho de Mandel *et al.* (1957), que mostraram a predominância de cocos Gram positivos em placa jovem. O número de bastonetes Gram positivos foi maior do que o dos negativos, e estes resultados (Tabela 5) estão de acordo com os obtidos por Sidaway (1978a) que mostrou a predominância das formas filamentosas Gram positivas. Embora 33 amostras de bastonetes Gram positivos tenham sido isoladas, apenas 10 resistiram ao processo de manutenção.

A identificação das bactérias filamentosas Gram positivas, isoladas no presente trabalho, foi realizada de acordo com Bier (1970). As amostras foram divididas em três grupos, de acordo com as características da morfologia colonial, celular e características bioquímicas e fisiológicas.

No grupo I, todas as amostras fermentaram glicose, maltose, frutose, sacarose, galactose e glicerol. Não fermentaram o

sorbitol e eram catalase positivas, resistiram ao crescimento nas concentrações de 2, 4 e 6,5% de NaCl, reduziram o nitrato a nitrito, eram todas facultativas. Com estes resultados pode-se afirmar que essas amostras apresentam características semelhantes ao *Odontomyces viscosus*.

Foram observadas algumas divergências, em relação aos resultados de Bier (1970). Apenas uma amostra fermentou a arabinose. No presente trabalho, os resultados obtidos concordaram com os de Georg & Brown (1967). Em relação ao teste de VP, apenas uma amostra apresentou o mesmo resultado encontrado por Bier (1970). Em relação ao teste do VM, os resultados obtidos concordaram com os de Bier (1970). Em relação ao teste da gelatina, apenas uma das amostras produziu a gelatinase, em desacordo com os resultados obtidos por Bier (1970). Provavelmente essa amostra, com características semelhantes ao *Odontomyces viscosus*, seja um produtor de gelatinase.

No grupo II, todas as amostras fermentaram glicose, maltose, sacarose e frutose; não fermentaram lactose, sorbitol, arabinose e glicerol. Reduziram o nitrato a nitrito e eram catalase positivas, facultativas, não hemolíticas, VP positivas, não degradaram a gelatina. Estes resultados estão em concordância com os encontrados por Bier (1970). Apesar de algumas divergências, pode-se afirmar que o grupo apresenta características semelhantes às amostras de *Rothia dentocariosa*.

No grupo III, todas as amostras apresentaram características fisiológicas e bioquímicas semelhantes às amostras de *Actinomyces* sp. Todas eram catalase negativas, fermentaram a maltose, a sacarose, eram facultativas, reduziram o nitrato, não eram hemolíticas e não degradaram a gelatina. Não fermentaram a lacto

se, o sorbitol, o glicerol e a arabinose, não apresentaram crescimento nas concentrações de NaCl a 4% e 6,5%. A identificação desse grupo foi realizada comparando-se-a com os resultados de Georg & Brown (1967). Estes autores encontraram resultado positivo para glicose, apenas quando utilizaram outra técnica.

O fato de as amostras isoladas de pacientes formarem placa "in vitro", a partir da sacarose, tem muito significado para o mecanismo de fixação dos microrganismos em placa dental. Bier (1970), em seu experimento, não conseguiu a formação de placa "in vitro", com as amostras isoladas de "hamster" por Jordan & Keyes (1964) (*Odontomyces*, *Rothia* e *Bacterionema*) e que anteriormente tinha formado placa. Talvez, este fator se deva ao tempo de manutenção ter-se prolongado por muitos anos, perdendo, assim, a capacidade de formação de placa.

A importância do *Odontomyces viscosus* foi ressaltada por Jordan & Keyes (1965), quando inocularam esse microrganismo na cavidade oral de "hamsters" albinos, isentos de doença periodontal. Rapidamente havia o acúmulo de placa, com a consequente formação de bolsa periodontal e alveoloclasia. Estes resultados demonstraram a participação do *Odontomyces viscosus* como agente etiológico da doença periodontal em "hamsters". Em 1969 Gerencser & Slack confirmaram a presença de *Odontomyces viscosus* no sulco gengival humano e ainda revelaram a capacidade destes microrganismos formarem placa na presença de sacarose. Estes resultados são significativos para a ecologia da cavidade oral; portanto o presente trabalho confirma esses achados.

É importante ressaltar que Georg *et al.* (1969) propuseram a classificação do *Odontomyces viscosus* como *Actinomyces viscosus*, designação esta hoje perfeitamente aceita entre os microbiologistas.

As amostras do grupo II que foram caracterizadas como *Rothia dentocariosa* formaram placa "in vitro", tanto em dente como em bengalas, e apenas uma amostra não apresentou essa formação; portanto os dados encontrados na presente investigação estão de acordo com os obtidos por Bier (1970). Uma das amostras formaria placa "in vitro" apenas em dentes humanos.

As amostras do grupo III que foram caracterizadas como *Actinomyces* foram as que melhor formaram placa "in vitro", tanto nos dentes como nas bengalas, inclusive uma das amostras formou placa na superfície do fio ortodôntico, confirmando, assim, a grande capacidade de fixação em superfícies lisas.

Para a identificação das amostras de cocos Gram positivos, os dados obtidos foram comparados aos de Oliveira (1974).

A amostra número 5 apresentou características semelhantes às identificadas como *Streptococcus mutans*. A de número 63 apresentou características de amostras identificadas como *Streptococcus salivarius*. As amostras 14, 29 e 65 apresentaram características semelhantes às identificadas como sendo de *Streptococcus faecalis*.

Os microrganismos dos grupos I, II e III identificados, tentativamente, como *Odontomyces viscosus*, *Rothia dentocariosa* e *Actinomyces* sp., respectivamente, foram investigados em relação a sua capacidade de formar placa bacteriana "in vitro", em dentes humanos e em bengalas de vidro.

A amostra que foi caracterizada como *Streptococcus mutans* apresentou a formação de placa tanto em dente como em bengala. O resultado de placa confirma o trabalho de Oliveira (1974). Para Querido (1972) as amostras de *Rothia* são semelhantes às de *Streptococcus mutans* quanto à incapacidade de se fixarem às células

epiteliais. Gibbons *et al.* (1964) concluíram que o *Streptococcus salivarius* não demonstra capacidade de aderência à superfície do esmalte, enquanto o *Streptococcus mutans*, quando se coloniza na cavidade oral, o faz com muita facilidade sobre a superfície do esmalte, os nossos resultados contudo discorda dessa afirmação; de acordo com a Tabela 9 verifica-se que ambos *Streptococcus mutans* e *salivarius* mostrou igual capacidade de aderência à superfície do esmalte.

A amostra número 63 e que foi caracterizada como *Streptococcus salivarius* formou placa "in vitro", tanto em dente como em bengalas. Foi observado que nos dentes, a partir da segunda transferência, a placa já estava formada.

As outras amostras de *Streptococcus faecalis* não apresentaram capacidade de aderência nas condições experimentais.

A ação da clorhexidina nas amostras formadoras de placa "in vitro", em dentes humanos e bengalas de vidro, pode ser observada nas Tabelas 10, 11 e 12.

A clorhexidina a 0,2% se incorporou aos dentes em quantidade suficiente para inibir o seu crescimento no período experimental. Este fato pode ser compreendido pela observação da experiência com as bengalas, que foram tratadas do mesmo modo que os dentes. Contudo, pela natureza impermeável do vidro, praticamente, nenhuma quantidade de clorhexidina ficava aderida às mesmas, logo não ocorrendo inibição de crescimento bacteriano.

A clorhexidina a 0,1 e 0,05%, incorporada aos dentes, só inibiu o crescimento nas primeiras 24 horas da experiência, com os dentes humanos. Em relação às bengalas, o resultado foi o mesmo obtido com a concentração de 0,2%.

Os dados obtidos nas condições experimentais, deste tra

balho, permitem concluir que a clorhexidina, em concentração adequada, inibe o crescimento das bactérias envolvidas nesse estudo.

Praticamente todas as amostras, que formaram placa "in vitro", e que foram selecionadas para a experiência, se calcificaram quando colocadas na solução calcificadora (Tabela 13).

Foi observado que algumas amostras em 15 dias de incubação já apresentavam calcificações. Wasserman *et al.* (1958) obtiveram a calcificação em amostras de *Actinomyces* em seis dias de incubação. Segundo Sidaway (1978b), o tempo de calcificação da bactéria de placa é muito variável, indo de 3 a 4 dias e 3 a 4 semanas.

As amostras identificadas, tentativamente, como sendo de *Actinomyces*, foram as que mais se calcificaram, tanto nos dentes como nas bengalas, dados estes que confirmam os encontrados por Sidaway (1978b).

CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos no presente trabalho, é possível tecer algumas considerações conclusivas:

a) Do material colhido do sulco gengival de cinco pacientes formadores de cálculo dental, os microrganismos anaeróbios foram os predominantes;

b) As amostras predominantes foram as de cocos Gram positivos (*Streptococcus* sp.);

c) As bactérias filamentosas isoladas apresentaram características semelhantes à *Rothia dentocariosa*, *Odontomyces viscosus* (*Actinomyces viscosus*) e *Actinomyces* sp.;

d) As amostras caracterizadas como *Actinomyces* sp. foram as que melhor formaram placa "in vitro", tanto em dentes humanos como nas bengalas de vidro;

e) As mesmas amostras que não formaram placa "in vitro", em dentes humanos, não formaram nas bengalas de vidro;

f) A clorhexidina a 0,2%, incorporada em dentes humanos, foi a que apresentou a melhor inibição do crescimento bacteriano;

g) Praticamente todas as amostras que formaram placa "in vitro" e que foram colocadas na solução de sais de cálcio se calcificaram, tanto em dentes humanos como nas bengalas de vidro;

h) As amostras que melhor apresentaram calcificação em dentes humanos foram as identificadas como *Actinomyces* sp.

RESUMO

Material do sulco gengival de cinco pacientes formadores de cálculo dental foi colhido, homogeneizado, diluído e semeado no BHI, em condições de microaerofilia e em anaerobiose a 37°C, durante quatro dias. As placas, contendo de 30 a 300 colônias, foram escolhidas para o exame. A média de colônias crescidas em microaerofilia foi de $106,28 \times 10^8/g$, e a de colônias crescidas em anaerobiose foi de $336,96 \times 10^8/g$. Das 253 amostras isoladas, 174 (68,7%) foram identificadas, sendo 120 (47,5%) de cocos Gram positivos, 10 (3,9%) de cocos Gram negativos, 33 (13%) de bastonetes Gram positivos e 11 (4,3%) de bastonetes Gram negativos. Após estudo da morfologia colonial e celular, e das características bioquímicas e fisiológicas, as amostras de bastonetes Gram positivos foram separadas em três grupos que apresentaram características semelhantes à *Rothia dentocariosa*, *Odontomyces viscosus* (*Actinomyces viscosus*) e *Actinomyces* sp.

As amostras de cocos Gram positivos foram identificadas como *Streptococcus* sp., os cocos Gram negativos como *Neisseria* sp. e como *Veillonella*. Com amostras de bastonetes e cocos Gram positivos foi estudado o potencial de formação de placa "in vitro", em dentes humanos e em bengalas de vidro. Algumas amostras não formaram a placa "in vitro", outras formaram placa a partir da primeira inoculação. Com as amostras formadoras de placa "in vitro", em dentes humanos e em bengalas de vidro, estudou-se a ação da clorhexidina a 0,2%, 0,1% e 0,05%. Foi estudada também a calcificação "in vitro" da placa bacteriana aderida a dentes humanos e bengalas de vidro, quando colocada em solução calcificadora.

S U M M A R Y

Material of gingival crevice of five patients formers of dental calculus was collected, homogenized, diluted and inoculated in BHI, in microaerophilic and anaerobic conditions, at 37°C, during four days. The plates, containing 30 to 300 colonies, were chosen for the exam. The average of increased colonies in microaerophilic was $106,28 \times 10^8$ /g, and that of anaerobically increased colonies was $336,96 \times 10^8$ /g. From the 253 isolated strains 174 (68,7%) were identified, as being 120 (47,5%) Gram-positive cocci, 10 (3,9%) Gram-negative cocci, 33 (13%) Gram-positive rods, and 11 (4,3%) Gram-negative rods. After studies of colonial and celular morphology and biochemical and physiological characteristics, the strains of Gram-positive rods were separated in three groups which presented characteristics similar to *Rothia dentocariosa*, *Odontomyces viscosus* (*Actinomyces viscosus*) and *Actinomyces* sp. The strains of Gram-positive cocci were identificated as *Streptococcus* sp., the Gram-negative ones as *Neisseria* sp., and *Veillonella* sp.

With strains of rods and Gram-positive cocci was studied the forming potentiality of plaque "in vitro", in human teeth and glass sticks. Some of the strains did not for plaque "in vitro", others formed plaque departing from the first inoculation. With the strains formers of plaque "in vitro", in human teeth and glass sticks, the action of chlorhexidine at 0,2%, 0,1% and 0,05%, was studied. Also was studied the calcification "in vitro" of the bacterial plaque adhered to human teeth and glass sticks, when put in calcifying solution.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADD, M. et al. The effect of single morning and evening rinses of the development of tooth staining and plaque accumulation. J. Clin.Period., 9:134-40, 1982.
- ADDY, M. et al. The effect of povidone iodine on plaque and salivary bacteria. A double-blind crossover trial. J.Period., 48:730-32, 1977.
- ALLEN, D.L. & COURTNEY, R.M. A clinical study of plaque reduction by viokase. J.Period., 43:170-75, 1972.
- BAER, P.N. Studies on experimental calculus formation. Int.Dent. J., 14:411-14, 1964.
- BAER, P.N. & NEWTON, W.L. The occurrence of periodontal disease in "germ free" mice. J.Dent.Res., 38:1238, 1959.
- BAER, P.N. et al. Studies on experimental calculus formation in rat. I effect of age, sex, strain, high, protein diets. J. Period., 32:190, 1961.
- _____. Studies on experimental calculus formation in the rat. IV effect of extirpation of the salivary glands and pituitary gland. J.Period., 34:432, 1963.
- BARNES, G.P. et al. Dental plaque reduction with an antibacterial mouth rinse. Oral Surg., 34:553-58, 1972.
- BERNIR, L. apud PRICHARD, J.F. Enfermedad periodontal avanzada tratamiento quirurgico y protético. 2ª ed. Madrid, Labor, 1971.

- BIER, L.C. Isolamento de Odontomyces viscosus e Rothia dentocario sa do sulco gengival humano. Santa Maria, RS, 1970. Tese doutoramento Faculdade de Odontologia Santa Maria, Rio Grande do Sul.
- BOWEN, W.T.H. & GILMOUR, M.N. The formation of calculus like deposits by pure cultures of bacteria. Archs.Oral Biol., 5:145-48, 1961.
- BREBOU, M. & MUHLEMANN, H.R. The role of surface roughness of plastic foils in the collection of early calculus deposits. Helv. Odont.Acta, 10:137-38, 1966.
- CARLSON, H.C. et al. The effect of alexidine mouthwash on dental plaque and gingivitis. J.Period., 48:216-18, 1977.
- COLLINS, J.F. Effect of vancomycin on plaque after periodontal Surgery. J.Dent.Res., 49:1478, 1970.
- DE PAOLA, P.F. et al. Inhibition of dental caries in school children by topically applied vancomycin. Archs.Oral Biol., 22:187-91, 1977.
- DOSSENBACH, W.F. & MUHLEMANN, H.R. Effect of penicillin and rinolecte on early calculus formation. Helv.Odont.Acta, 5:25-8, 1961.
- DRAUS, F.J. et al. Salivary enzymes and calculus formation. J. Period., 3:232-35, 1968.
- EMSLIE, R.L. et al. A clinical and penicilin chewing gum in the treatment of acute ulcerative gingivitis. Brit.Dent.J., 120:320, 1972.
- ENNEVER, J. Intracelular calcification by oral filamentous microorganisms. J.Period., 31:304-07, 1960.

_____. Microbiologic mineralization: A calcifiable cell-free extract from a calcifiable microorganisms. J.Dent.Res., 41:1383, 1962.

_____. Microbiologic calcification. Ann.N.Y.Acd.Sci., 109:4, 1963.

ENNEVER, J. & STURZENBERGER, O.P. Inhibition of dental calculus formation by use chewing gums. J.Period., 32:331, 1961.

ENNEVER, J. & SUMMER, F.E. Calcification by *Candida Albicans*. J. Bacteriology, 122(3):1391-93, Jun., 1975.

ENNEVER, J. et al. Calcium binding by a lipid extract of *Bacterionema matruchotii*. Calc.Tiss.Res., 2:296-98, 1968.

_____. Survey of microorganisms for calcification in a synthetic medium. J.Dent.Res., 51:1483-86, 1972.

_____. Calcification by *Escherichia coli*. J.Bacteriology, 19(3):1061-62, Sep., 1974.

_____. Proteolipid and calculus matrix calcification in vitro. J.Dent.Res., 56:140-43, 1977.

FITZGERALD, R.J. & Mc DANIEL, E.G. Dental calculus in the "germ free" rat. Archs.Oral Biol., 2:239-40, 1960.

FITZGERALD, R.J. et al. Dental calculus and antibiotics in the white rat. Archs.Oral Biol., 2:85-6, 1960.

_____. The effects of dextranase preparation on plaque and caries in hamsters. J.Amer.Dent.Ass., 76:301-04, 1968.

FLEISCH, H. & BISAZ, S. apud MANDEL, I. Histochemical and biochemical aspects of calculus formation. J.Amer.Soc.Period., 1(2): 43-52, 1963.

- FLOTRA, L. et al. A 4-month study on effect of chlorhexidine mouth washes on 50 soldiers. J.Dent.Res., 80:10-7, 1972.
- FLOTRA, L. apud GJERMO, P. A clorhexidina na prática Odontológica. Rev.Gaúcha Odont., 26(1):22-6, jan./mar., 1978.
- FROSTELL, G. Studies on the ammonia production and the ureolytic activity of dental plaque material. Acta.Odont.Scand., 18:29, 1960.
- GEORG, L.K. & BROWN, J.M. Rothia, gen. nov. an aerobic genus of the family Actinomycetaceae. Int.J.Syst.Bacteriol., 17:79-88, 1967.
- GEORG, L.K. et al. Actinomyces viscosus comb. nov., a catalase positive, facultative member of the genus Actinomyces. Int.J.Syst.Bacteriol., 19:291-93, 1969.
- GERENCSEK, M.A. & SLACK, J.M. Identification of Human strains of Actinomyces viscosus. Appl. Microbiol., 18:80-7, 1969.
- GIBBONS, R.J. & BANGHART, S.B. Synthesis of extracellular dextran by cariogenic and its presence in human dental plaque. Archs. Oral Biol., 12:11-24, 1967.
- GIBBONS, R.J. et al. The microbiota of gingival crevices area of man. II The predominant cultivable organisms. Archs.Oral Biol., 8:281-89, 1963.
- _____. The source of bacteria. Archs.Oral Biol., 11:549-60, 1964.
- GJERMO, P. Chlorhexidine in dental practice. J.Clin.Period., 1:143-52, 1974.
- GJERMO, P. et al. The plaque inhibiting capacity of 11 antibacterial compounds. J.Period.Res., 5:102-52, 1974.

- GLANTZ, P.O. apud LOESCHE, W.J. Topical fluorides as an antibacterial agent. J.Prevent.Dent., 4(1):21-6, Jan./Feb., 1977.
- GLOCK, G.E. & MURRAY, M.M. Chemical investigation of salivary calculus. J.Dent.Res., 17:257-64, 1938.
- GREENE, J.C. Oral hygiene and periodontal disease. Amer.J.pub. Helth., 53:913-22, 1963.
- HAMPAR, B. et al. The carbohydrate components of supragingival calculus. J.Dent.Res., 40(4):752, 1961.
- HANDELMAN, S.L. et al. Caries incidence in subjects receiving long term antibiotic therapy. J.Oral Ther.Pharm., 2:338-45, 1966.
- HANSEN, F. et al. The effect of a chlorhexidine containing gel on the oral cleanliness and gingival health in young adults. J. Clin.Period., 2:153-59, 1975.
- HOLDEMAN, L.V. & MOORE, W.E.C. Anaerobe laboratory Manual. Virginia Polytechnic Institute and State University Anaerobe Laboratory Blacksburg, 1972. p.1.
- HOWELL, J.R., A. et al. Cultivable bacteria in developing and mature human dental calculus. Archs.Oral Biol., 10:307-13, 1965.
- HUGO, W.B. & LONGWORTH, A.R. Some aspects of the mode of action of chlorhexidine. J.Pharm.Pharmaceutics, 16:655-62, 1964.
- JENSEN, S.B. et al. Experimental gingivitis in man. IV Vancomycin-induced changes in bacterial plaque composition as related to development of gingival inflammation. J.Period.Res., 3:284-93, 1968.
- JOHANSEN, J.R. et al. Effect of 2 years use of chlorhexidine containing dentifrices on plaque, gingivitis and caries. Scand.J. Dent.Res., 83:282-92, 1975.
- JOHNSON, R.H. & ROZANIS, J. A review of chemotherapeutic plaque control. Oral Surg., 47(2):736, Feb., 1979.

JORDAN, H.V. & DE PAOLA, P.F. Effect of prolonged topical application of vancomycin on human oral Streptococcus mutans populations. J.Dent.Res., 53:115-20, 1974.

JORDAN, H.V. & KEYES, P.H. Aerobic, Gram-positive filamentous bacteria as etiologic agents of experimental periodontal disease in hamsters. Archs.Oral Biol., 9:401-14, 1964.

_____. Studies on the bacteriology of hamster periodontal disease. Amer.J.Path., 46:843-57, 1965.

KAUFMAN, H.W. & KLEINBERG, I. X ray diffraction examination of calcium phosphate in dental plaque. Calcif.Tissue Res., 11:97-104, 1973.

KEEFE, W.E. Formation of crystalline deposits by several genera of the family Enterobacteriaceae. Infect.Immun., 14:590-92, 1976.

KEYES, P.H. Present and future measures for dental caries control. J.Amer.Dent.Ass., 76(6):261, 1969.

KEYES, P.H. et al. Bio-assays of medicaments for the control of dentobacterial plaque, dental caries, and periodontal lesions in Syrians Hamsters. J.Ther.Pharm., 3:157-73, 1966.

_____. Dispersion of dextraneous bacterial plaque on human teeth with dextranase. J.Amer.Dent.Ass., 82:136-41, 1971.

KINOSHITA, S. et al. Effect of sucrose on dental calculus and plaque. Helv.Odont.Acta., 10:134-37, 1966.

KLEINBERG, I. Studies on dental plaque I. The effect of different concentrations of glucose on the pH of dental plaque in vivo. J.Dent.Res., 40:1087-111, 1961.

_____. Effect of urea concentration on human plaque pH levels in situ. Archs.Oral Biol., 12:1475-84, 1967.

_____. Regulation of the acid-base metabolism of the dento-gingival plaque and its relation to dental caries and periodontal

disease. Int.Dent.J., 20(3):451-61, Sep., 1970.

KLEINBERGER, I. & JENKINS, G.N. The pH of dental plaques in different areas of the mouth before and after meals and their relationship to the pH and rate flow of resting saliva. Archs.Oral Biol., 9:493, 1964.

KLEINBERG, I. et al. apud KAUFMAN, H.W. & KLEINBERG, I. X ray diffraction examination of calcium phosphate in dental plaque. Cal cif.Tissue Res., 11:97-104, 1973.

KLIGERMAN, B.A. & BISSADA, N.F. Clinical study iodine as a chemotherapeutic agent for the control of dental plaque and gingivitis in man. J.Period., 46:478-87, 1975.

KOPCZYK, A.R. & CONROY, C.W. The attachment of calculus to root planed surfaces. Period., 6(2):78-83, Apr., 1968.

KRISTOFFERSEN, T. Clinical evaluation of ascoxal as a plaque and calculus preventive. Odont.T., 71:179-98, 1963.

LASCALA, N.T. & MOUSSALLI, N.H. Periodontia clínica. São Paulo, Artes Médicas, 1981. p.141-57.

LEUNG, S.W. & DRAUS, F.J. Effects of certain enzymes on calculus deposition. J.Dent.Res., 38(4):709, 1959.

LEUNG, S.W. apud THEILADE, J. & SCHROEDER, H.E. Recent results in dental calculus research. Int.Dent.J., 16(2):205-21, 1966.

LIE, T. & SELVIG, K. Calcification of oral bacteria - an ultrastructural study of two strains of Bacterionema matruchotii. Scand. Dent.Res., 82:8-18, 1974.

LITTLE, M.F. & HANZEN, S.P. Dental calculus composition. 2. Subgingival calculus. Asch, Calcium, Phosphorus and sodium. J.Dent. Res., 43(5):645-51, Oct., 1964.

- LITTLE, M.F. et al. The organic matrix of dental calculus. J. Dent. Res., 40(4):753, Jul./Aug., 1961.
- _____. Dental calculus composition. 1 Supragingival calculus Asch, Calcium Phosphorus, Sodium and Density. J. Dent. Res., 42(1):78-86, Jan./Feb., 1963.
- _____. The composition of dental calculus. Archs. Oral Biol., 11:385-96, 1966.
- LITTLETON, N.W. & WHITE, C.F. Dental findings from a preliminary study of children receiving long term antibiotic therapy. J. Amer. Dent. Ass., 68:520-25, 1964.
- LOBENE, R.R. Alterations of plaque in caries prevention. J. Oral Med., 27:2, 1972.
- LOBENE, R.R. et al. Effect of erithromycin on dental plaque and plaque forming microorganisms. J. Period., 40:287-95, 1969.
- _____. The effect of an Alexidine Mouthwash on human plaque and gingivitis. J. Amer. Dent. Ass., 87:848-51, 1973.
- LOE, H. & SCHIOTT, C.R. The effect of mouthrinses and topical application of chlorhexidine on the development of dental plaque and gingivitis in man. J. Period. Res., 5:64, 1970.
- LOE, H. et. al. Experimental gingivitis in man III The influence of antibiotics on gingival plaque development. J. Period. Res., 2:282-89, 1969.
- LOESCHE, W.J. Chemotherapy in dental plaque infections. Oral. Sci. Rev., 9:65-107, 1976.
- LOESCHE, W.J. & NAFE, D. Reduction of supragingival plaque accumulations in institutionalized down's syndrome patients by periodic treatment with topical Kanamycin. Archs. Oral Biol., 18:1131-43, 1973.

- LOESCHE, W.J. et al. Effect of topical kanamycin sulfate on plaque accumulation. J.Amer.Dent.Ass., 83:1063-69, 1971.
- _____. Effect of topical acidulate phosphate fluoride on percentage of Streptococcus mutans and Streptococcus sanguis in plaque II Pooled occlusal and pooled approximal samples. Caries Res., 9:139-55, 1975.
- MANDEL, I.D. Histochemical and Biochemical aspects of calculus formation. J.Amer.Soc.Period., 1(2):43-52, 1963.
- _____. Biochemical aspects of calculus formation. J.Period. Res., 9:10-7, 1974.
- MANDEL, I.D. & THOMPSON, R.H. The chemistry of Parotid and Submaxillary saliva in Heavy Calculus Formers and Non-Formers. J. Period., 4(38):310-15, Jul./Aug., 1967.
- MANDEL, I.D. et al. Histochemistry of calculus formation. J.Period., 28:132, 1957.
- MARCOS, B. Periodontia: um conceito clínico preventivo. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1977, p.67-73.
- MIDDLETON apud DAWES, C. & SHAW, J.H. The effects of changes in the proportion and types of dietary carbohydrate on de amylase and protein concentrations in rat saliva. Archs.Oral Biol., 10: 261-67, 1968.
- MITCHELL, D.F. & HOLMES, L.A. Topical antibiotic control of dentogingival plaque. J.Period., 36:202-08, 1965.
- MITCHELL, D.F. et al. Topical antibiotic maintenance of oral health. J.Oral Ther., 4:83-92, 1967.
- MUHLEMANN, H.R. In vivo measurements of dental calculus. Annals of the York. Academy Sciences, 153:169-96, Dec., 1968.
- MUHLEMANN, H.R. & SCHROEDER, H.E. Dynamics of supragingival calculus formation. Adv.Oral Biol., 1:175, 1964.
- MUHLEMANN, H.R. et al. Effect of diphosphonate on human supragingival calculus. Helv.Odont.Acta., 14:31-3, 1970.

- MUKHERJE, S. An in vitro study of anticalculus agents. J.Period. Res., 4:26-35, 1969.
- MULLER, E. et al. The effect of two oral antiseptics on early calculus formation. Helv.Odont.Acta., 6:42, 1962.
- NEWSELY, H. Calcifying processes within the superficial layers of the dental plaque. Caries Res., 2:19-26, 1968.
- NEWSELY, H. apud NEWSELY, H. Calcifying processes within the superficial layers of the dental plaque. Caries Res., 2:19-26, 1968.
- OLIVEIRA, C.M. Isolamento e caracterização de Streptococcus de placa dental. Rio de Janeiro, 1974. Tese de Doutorado, Instituto de Microbiologia do Rio de Janeiro.
- OLIVEIRA, C.M. & ARAÚJO, W.C. Formação de placa in vitro com culturas puras de Streptococcus isoladas de pacientes. Rev.Bras. Odont., 25:270-76, 1968.
- OSUOJI, C.I. & ROWLES, S.L. Isolation and identification of acid glycosaminoglycam in oral calculus. Archs.Oral Biol., 17:211, 1972.
- PELLERAT, J. Sur l'elimination salivairie de auelques antibiotiques. Press.Med., 71:2135-36, 1963.
- PLUMBO, J. et al. Studies on experimental calculus in the rat V. Effect of skim, milk and cornstarch in the diet. J.Period., 1:34, 1963.
- PRAYITNO, S. et al. An in vivo study of dietary factors in the aetology of tooth staining associated with the use of chlorhexidine. J.Period.Res., 14:411-17, 1979.
- PRICHARD, J.F. Enfermedad periodontal avazada tratamiento quirurgico y protético. 2ª ed., Madrid, Labor, 1971.
- QUERIDO, N.B.G. Ocorrência de Odontomyces viscosus e Rothia dentocariosa na cavidade oral: aspectos de sua patogenicidade. São Paulo, 1972. Tese de Doutorado, Faculdade de Odontologia de São José dos Campos.

RIZZO, A.A. et al. Mineralization of bacteria. Science, 135:349-41, 1962.

_____. Calcification of oral bacteria. Annals of the New York Academy Sciences, 109:14-22, May, 1963.

_____. Experimental dental calculus formation in intraperitoneal dialysis bags. Archs.Oral Biol., 12:79-83, 1967.

ROLLA, G. & MELSEN, B. Desorption of protein and bacteria from hydroxyapatite by fluoride and monofluorophosphate. Caries Res., 9:66, 1975.

ROLLA, G. et al. The affinity of chlorhexidine for hydroxyapatite and salivary mucins. J.Period.Res., 5:90-5, 1970.

ROSEN, S. & WEISENSTEIN, R.R. Calcification by oral bacteria. J.Dent.Res., 43(5):837, 1964.

ROWLES, S.L. Biophysical studies on dental calculus in relation to periodontal disease. Dent.Pract., 15:2-7, Sep., 1964.

SAXER, U.P. et al. Plaque control with chlorhexidine and D-301, a quaternary ammonium compound. J.Clinic.Period., 9:162-69, 1982.

SCHEININ, A. & MAKINEN, K.K. Caries control through the use of sugar substitutes. Int.Dent.J., 26:4-13, 1975.

SCHROEDER, H.E. Inorganic content and histology of early dental calculus in man. Helv.Odont.Acta., 7:17-30, Apr., 1963.

_____. Two different types of mineralization in early dental calculus. Helv.Odont.Acta., 8:117, 1964.

_____. Formation and inhibition on dental calculus. Critique by Shanley, D. J.Period., 40:643-46, 1969.

SCHROEDER, H.E. & BAMBAUER, H.U. Stages of calcium phosphate crystallisation during calculus formation. Archs.Oral Biol., 11:1-14, 1966.

SELVIG, U.A. The formation of plaque and calculus on recently exposed tooth surfaces. J.Period.Res., 4:10-1, 1969.

_____. Attachment of plaque and calculus to tooth surfaces. J.Period.Res., 5:8-18, 1970.

SIDAWAY, D.A. A microbiological study of dental calculus I. The microbial flora of mature calculus. J.Period.Res., 13:349-59, 1978a.

_____. A microbiological study of dental calculus II. The in vitro calcification of microorganisms from dental calculus. J.Period.Res., 13:360-66, 1978b.

_____. A microbiological study of dental calculus III. A Comparison of the "in vitro" calcification of viable and non viable microorganisms. J.Period.Res., 14:167-72, 1979.

_____. A microbiological study of dental calculus IV. An electron microscopics study of in vitro calcified microorganisms. J.Period.Res., 15:240-54, 1980.

SMITH, L.W. et al. Studies on experimental calculus formation in the rat III. Calculus formation as influenced by high fat carbohydrate, and sucrose in the drinking water. J.Period., 34:327-29, 1963.

SOCRANSKY, S.S. Relationship of bacteria to the Etiology of Periodontal disease. J.Dent.Res., 49:203-22, 1970.

STALLARD, R. et al. The effect an antimicrobial mouthwash on dental plaque calculus and gingivitis. J.Period., 40:683-94, 1969.

STRECKFUSS, J.L. et al. Calcification of selected strains of Streptococcus Mutans and Streptococcus Sanguis. J.Bacteriology, 120(1):502-06, Oct., 1974.

STURZENBERGER, P.P. & LEONARD, G.J. The effect of a mouthwash as adjunct in tooth cleaning. J.Period., 40:299, 1969.

SUTTER, V.L. et al. Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual. 2nd ed., The Regents of the University of California, Los Angeles, Ca., 1975.

TAKAZOE, I. et al. Electron microscopy of intercellular mineralization of oral filamentous microorganisms in vitro. J.Dent.Res., 42(2):681-5, 1963.

- THEILADE, J. Electron microscopy study of calculus attachment to smooth surfaces. Acta.Odont.Scand., 22:379, 1964.
- THEILADE, J. & SCHROEDER, H.E. Recent results in dental calculus research. Int.Dent.J., 16(2):205-21, Jun., 1966.
- THEILADE, J. et al. Eletron microscopic observations of dental calculus in germ free and conventional rats. Archs.Oral Biol., 9:97-100,1964.
- TRAUTZ, O.R. & ZAPANTA-LEGEROS, R. apud SCHROEDER, H.E. & BAMBAUER, H.U. Stages of calcium phosphate crystallisation during calculus formations. Archs.Oral Biol., 11:1-14, 1966.
- TURESKY, S. et al. Histologic and histochemical observations regarding early calculus formation in children and adults. J.Period., 32:7, 1961a.
- _____ . The effect of local enviromental changes on calculus formation. J.Dent.Res., 40(4):752, 1961b.
- VOGEL, J.J. & ENNEVER, J. The role of a lipoprotein in the intracelular hydroxiapatite formation in Bacterionema matruchotii. Clin.Orthopaedics Related Res., 78:919-22, 1971.
- VOGEL, J.J. & SMITH, W.N. Calcification of membranes isolated from Bacterionema matruchotii. J.Dent.Res., 55:1080-83, 1976.
- VOLPE, A.R. et al. Antimicrobial control of bacterial plaque and calculus and the effects of these agents on oral flora. J.Dent.Res., 48 Suppl. n^o 5:832-41, Sep./Oct., 1969.
- WASSERMAN, B.H. et al. In vitro calcification of dental calculus. J.Period., 29:144-47, 1958.
- WEATHERFORD, T.W. et al. Effects of an alexidine mouthwash and gingivitis over a six month period. J.Amer.Dent.Ass., 94:528-36, 1977.
- WEINSTEIN, E. & MANDEL, I.D. The present status of anticalculus agents. Oral Ther.Pharmacol., 1:327, 1964.

WILLIAMS, R. et al. Effect of systemic tetracycline on alveolar bone loss in beagles. J.Dent.Res., 57:267, 1978.

WITT, A. O uso da clorhexidina em periodontia. Rev.Gaúcha Odont. 26(1):16-26, jan./mar., 1978.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Periodontal disease. Wld. Hlth. Org. tech. Rep. Ser. Nº 207, Geneva, 1961.

ZANDER, H.A. apud JENKINS, G.N. The physiology and biochemistry of the mouth. 4ª ed. Great Britain, Blackell Scientific, 1978, p.401-9.