

Série Ensino, Aprendizagem e Tecnologias

Tópicos em Bioquímica e Microbiologia Bucais

Sandra Liana Henz
Lina Naomi Hashizume
Rodrigo Alex Arthur

2ª edição



Série Ensino, Aprendizagem e Tecnologias

Tópicos em Bioquímica e Microbiologia Bucais

Sandra Liana Henz
Lina Naomi Hashizume
Rodrigo Alex Arthur

2ª edição



© dos autores
1.ª edição: 1995

Direitos reservados desta edição:
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Coordenação da Série:
Cíntia Kulpa, Tanara Forte Furtado e Marcello Ferreira

Coordenação da Editoração: Cíntia Kulpa e Ely Petry
Revisão: Equipe de Revisão da SEAD
Capa: Bruno Assis, Jéssica dos Santos e Tábata Costa
Editoração eletrônica: Jéssica dos Santos e Tábata Costa

A grafia desta obra foi atualizada conforme o Acordo Ortográfico da Língua Portuguesa, de 1990, que entrou em vigor no Brasil em 1º de janeiro de 2009.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.



H528t Henz, Sandra Liana

Tópicos em bioquímica e microbiologia bucais [recurso eletrônico]
/ Sandra Liana Henz, Lina Naomi Hashizume [e] Rodrigo Alex Arthur ;
coordenado pela SEAD/UFRGS. – 2. ed. – Porto Alegre: Editora da UFRGS,
2021.

321 p. : pdf

(Série Ensino, Aprendizagem e Tecnologias)

1. Odontologia. 2. Bioquímica bucal. 3. Microbiologia bucal. 4. Ecologia bucal. 5. Biofilme dental. 6. Cárie. 7. Erosão dentária. 8. Saliva. 9. Flúor. 10. Infecções odontogênicas. I. Hashizume, Lina Naomi. II. Arthur, Rodrigo Alex. III. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Secretaria de Educação a Distância. IV. Título. V. Série

CDU 579.61:616.314-002

CIP-Brasil. Dados Internacionais de Catalogação na Publicação.
(Jaqueline Trombin – Bibliotecária responsável CRB10/979)

ISBN 978-65-5725-038-9

8

Biofilme Cariogênico

Rodrigo Alex Arthur

Sandra Liana Henz

Lina Naomi Hashizume

A cárie dental é uma doença multifatorial e biofilme-açúcar dependente. Nesse contexto, considera-se que a cárie dental se desenvolve na dependência da relação entre o biofilme dental bacteriano e fatores biológicos e sócio-econômicos. A presença de bactérias na superfície dental é considerada como *fator etiológico* primário, já que é indispensável para o aparecimento da doença. *Fatores determinantes* podem contribuir ou não para o desenvolvimento da cárie dental, dentre eles, a composição da placa dental e da saliva, capacidade tampão da saliva, fluxo salivar, composição e frequência da dieta, presença de fluoretos. Ainda, os *fatores modificadores*, como nível sócio-econômico, comportamento, conhecimento e atitude também estão envolvidos com a progressão da lesão de cárie. Em conjunto com a higiene bucal e outras medidas preventivas, como uso de flúor, o controle da dieta contribui de forma relevante para o controle da doença cárie.

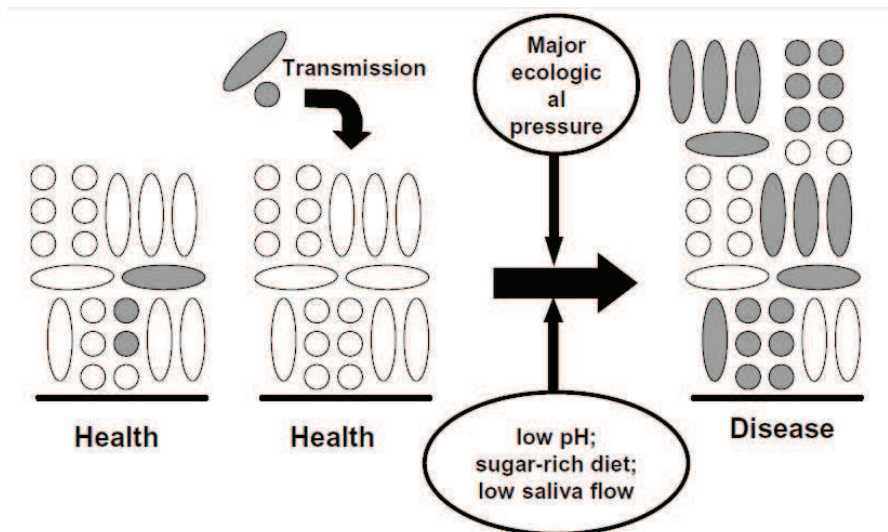
EVIDÊNCIAS HISTÓRICAS E ESTUDOS CONTROLADOS SOBRE CONSUMO DE AÇÚCAR E CÁRIE DENTAL

Existem muitas evidências que relacionam o frequente consumo de carboidratos fermentáveis e a prevalência da doença cárie. Em tempos remotos, quando a dieta consistia apenas de sementes cruas, grãos, raízes e ervas, a prevalência de cárie dental era muito baixa (HARDWICK, 1960). Entretanto, a incorporação de carboidratos fermentáveis na dieta alterou a prevalência de cárie na população. Um dos exemplos referentes ao papel da dieta na prevalência de cárie se refere ao estudo da popula-

ção da ilha de *Tristão da Cunha* (FISHER, 1968). Até a década de 30, com uma dieta baseada em vegetais, batatas, carne e peixe, a prevalência de cárie era muito baixa. Entretanto, após a década de 40, quando foram introduzidos carboidratos fermentáveis na dieta, a prevalência de cárie aumentou. As restrições dietéticas consequentes da *Segunda Guerra Mundial* provocaram uma expressiva redução na prevalência de cárie na Europa e no Japão, correspondentes à redução na ingestão de carboidratos fermentáveis (TOVERUD, 1957; TAKEUCHI, 1961). Em um estudo longitudinal com crianças de 6 a 13 anos, chamado de estudo do orfanato de *Hopewood House* (HARRIS, 1963), baixa prevalência de cárie foi encontrada nas crianças que viviam no orfanato com dieta lactovegetariana, mantidas com quantidades mínimas de açúcar, quando comparado a um grupo controle que tinha acesso aos carboidratos. Quando essas crianças deixaram a instituição, e a supervisão da dieta não estava mais presente, a prevalência de cárie aumentou. Além disso, indivíduos com *intolerância hereditária à frutose*, incapazes de ingerir frutose e sacarose, apresentaram baixa prevalência de cárie quando comparados aos indivíduos cuja dieta se baseava num alto consumo de carboidratos fermentáveis (MARTHALER, 1967; NEWBRUN *et al.*, 1980).

Experimentalmente, a relação entre dieta e cárie dental foi demonstrada pelo *estudo de Vipeholm* (GUSTAFSSON *et al.*, 1954). Esse estudo experimental demonstra uma relação entre consumo de açúcar e tipo de ingestão com o desenvolvimento de cárie. Nesse estudo, um grupo de deficientes mentais residentes no hospital de Vipeholm foi dividido em grupos de acordo com a disponibilidade e frequência de ingestão de carboidratos fermentáveis na dieta. Um grupo controle recebia dieta

com baixos níveis de carboidratos fermentáveis. Um dos grupos recebia carboidratos fermentáveis apenas nas refeições. Em outros grupos, os carboidratos fermentáveis eram oferecidos entre as refeições e com diferentes consistências (pegajosos e não-pegajosos). De forma geral, houve um aumento na experiência de cárie em todos os grupos, porém menos intensa no grupo que consumia o açúcar durante as refeições. Quanto mais frequente a ingestão de açúcares e quanto mais pegajosos os alimentos, maior a experiência de cárie observada. Esse estudo demonstrou a relação entre frequente ingestão de açúcares e consistência da alimentação e cárie dental. O estudo de Turku (SCHEININ & MÄKINEN, 1975), investigou o papel de substitutos do açúcar na prevalência de cárie. Esse estudo foi longitudinal e controlado, onde grupos de indivíduos consumiram uma dieta adoçada com sacarose, frutose ou xilitol. Sacarose e frutose foram cariogênicos, mas a completa substituição da sacarose por xilitol resultou numa substancial redução na incidência de cárie dental. A cariogenicidade relativa do amido em relação à sacarose também foi investigada num grupo de estudantes durante 2 anos de estudo. O grupo que possuía alta ingestão de amido e baixa ingestão de sacarose apresentou um menor incremento de cárie quando comparado ao grupo que possuía alta ingestão de sacarose e baixa ingestão de amido (RUGG-GUNN *et al.*, 1987).



(MARSH, 2003) Esquema ilustrativo de fatores que podem atuar sobre o biofilme dental na forma de pressões ecológicas e que promovem a transição do biofilme compatível com saúde para um biofilme compatível com doença. Observe o papel da dieta rica em açúcares nesse processo.

Do ponto de vista de desenvolvimento de cárie dental, tanto a **quantidade** de açúcar nos alimentos, a **frequência** de ingestão de alimentos ricos em carboidratos fermentáveis, quanto a **consistência** dos alimentos estão relacionadas ao potencial cariogênico desses alimentos (RUGG-GUNN, 1993). Trabalho *in situ* avaliou o efeito de diferentes concentrações de sacarose composição bioquímica do biofilme dental e na desmineralização do esmalte dental. Exposição à sacarose 20%, 8/dia durante 14 dias, produziu maior desmineralização dental quando comparada à exposição à sacarose em menores concentrações (AIRES *et al.*, 2006). Frequência se refere ao número de vezes que um alimento contendo açúcares fermentáveis é ingerido. Considerando a curva de queda de pH de Stephan, quanto maior a frequência de in-

gestão de carboidratos fermentáveis, mais frequentes serão as quedas de pH e durante mais tempo o dente estará numa condição na qual o pH está abaixo do crítico, potencializando a desmineralização dental. A consistência determinará a duração do tempo em que os dentes estarão expostos aos carboidratos fermentáveis. Alimentos líquidos são eliminados mais rapidamente que alimentos pegajosos ou aderentes. O **padrão** de ingestão dos alimentos também é muito relevante: o amido pode aumentar as propriedades de cariogenicidade da sacarose se forem consumidos ao mesmo tempo (RIBEIRO *et al.*, 2005). A adesividade do amido industrializado aumenta o tempo de retenção do açúcar na cavidade bucal, bem como reduz a taxa de limpeza salivar, resultando numa diminuição prolongada do pH.

COMPONENTES DOS ALIMENTOS INDUTORES DE CÁRIE

O potencial cariogênico dos alimentos está relacionado ao conteúdo de vários açúcares (glicose, frutose, sacarose, maltose, lactose e amido). Todos podem ser fermentados a ácidos, influenciando a quantidade e qualidade e também a cariogenicidade dos agregados bacterianos na superfície dental.

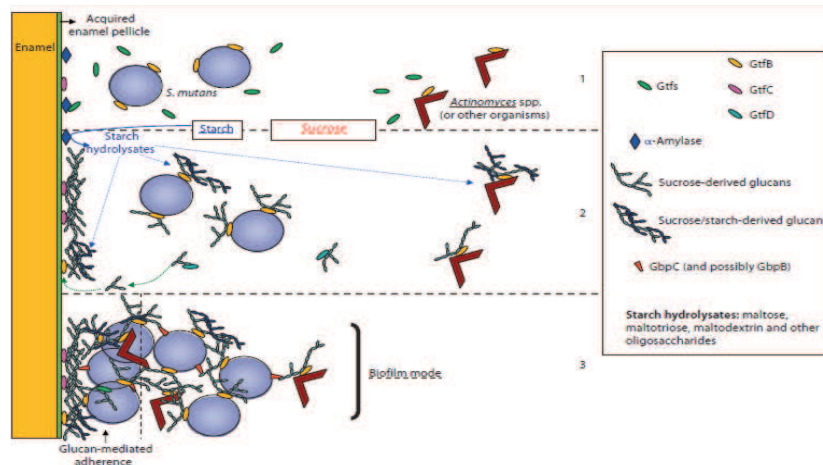
Sacarose

Todos os açúcares da dieta se difundem rapidamente pela placa dental e são fermentados até ácido e podem também ser armazenados como polissacarídeos intracelulares pelas bactérias.

Nesse contexto, cabe ressaltar que, diferentemente dos demais carboidratos fermentáveis, a sacarose se comporta de maneira distinta. Enquanto os demais carboidratos são apenas fermentáveis pelas bactérias, resultando em produção de ácidos, a sacarose, além de ser fermentável como seus monossacarídeos constituintes glicose e frutose, é substrato para a síntese de polissacarídeos extracelulares insolúveis (NEWBRUN, 1969). Esses polissacarídeos são sintetizados pela ação enzimática de glicosiltransferases produzidas por *Streptococcus mutans* (HAMADA & SLADE, 1980; LÖESCHE, 1986), que hidrolizam as moléculas de sacarose e polimerizam moléculas de glicose, formando glicanos insolúveis com ligação α 1-3 (RÖLLA, 1989). Três tipos de glicosiltransferases são produzidas pelos *Streptococcus mutans*: *gtfB*, que sintetiza polissacarídeos extracelulares insolúveis, *gtfC*, que sintetiza polissacarídeos solúveis e insolúveis e *gtfD*, que sintetiza polissacarídeos extracelulares solúveis (KURAMITSU, 1993). Esses polissacarídeos insolúveis desempenham papel fundamental no desenvolvimento do biofilme cariogênico, promovendo a aderência dos *Streptococcus mutans* à superfície dental e agregação bacteriana (RÖLLA *et al.*, 1985; RÖLLA, 1989; SCHILING & BOWEN, 1992), resultando num grande acúmulo de biofilme (CARLSSON & EGELBERG, 1965; SCHILING & BOWEN, 1992). Em acréscimo, a relação direta entre presença de polis-

sacarídeo extracelular insolúvel no biofilme dental e desenvolvimento de cárie dental tem sido experimentalmente demonstrada (PECHARKI *et al.*, 2005; RIBEIRO *et al.*, 2005; AIRES *et al.*, 2006).

Esses polissacarídeos extracelulares, principalmente os insolúveis, tornam o biofilme dental mais poroso (DIBDIN & SHELLIS, 1988), facilitando a difusão de substratos pelo biofilme, o que acarreta em maiores e mais prolongadas quedas de pH na superfície dental (ZERO *et al.*, 1986, 1992). Além disso, esses polissacarídeos extracelulares podem atuar como “colas” biológicas, viabilizando a aderência de bactérias à superfície dental (SCHILLING & BOWEN, 1992), viabilizando a formação e o acúmulo de placa. Além disso, menores concentrações de íons cálcio, fosfato e flúor têm sido encontrados no biofilme formado na presença de sacarose (CURY *et al.*, 1997; 2000). Esses íons são responsáveis pelo equilíbrio de solubilidade do dente e suas concentrações determinarão se o esmalte ou dentina desmineralizam quando ocorre queda de pH (PEARCE, 1998). Todas essas alterações contribuem para que a sacarose seja considerado o carboidrato mais cariogênico da dieta.



(BOWEN & KOO, 2011) Esquema ilustrativo do papel dos polissacarídeos extracelulares na formação do biofilme dental.

Sacarose x outros açúcares da dieta

Independente da diferença no potencial cariogênico entre sacarose e outros açúcares da dieta, todos os monossacarídeos (glicose, frutose) e dissacarídeos (lactose) da nossa dieta são cariogênicos. Todos são rapidamente fermentados pela placa dental, sendo obtidas curvas idênticas para a queda de pH da placa com glicose e frutose (encontradas nas frutas e no mel), maltose (derivada da hidrólise do amido) e sacarose, ao passo que a queda de pH com lactose é um pouco menor (NEFF, 1967). Apesar de glicose, frutose e sacarose serem rapidamente fermentadas a ácidos pelos micro-organismos da placa dental, estudos *in situ* compararam a cariogenicidade da sacarose com uma mistura de seus monossacarídeos constituintes, glicose e frutose. Em vista do que já foi relatado em relação às características do biofilme formado na presença de sacarose, maior desmineralização foi encontrada na presença de sacarose (CURY *et al.*, 2000; VALE *et al.*, 2007). Além disso, mesmo que a lactose seja menos acidogênica que os demais carboidratos, ela pode ser cariogênica para dentina. Estudo *in situ* verificou que exposição à adoçantes contendo lactose, 4x/dia, durante 14 dias, produziram desmineralização em dentina (AIRES *et al.*, 2002).

O amido é o principal carboidrato da nossa dieta porque é o principal armazenador de polissacarídeos das plantas. Está presente na batata, no arroz, no feijão, na mandioca. O amido é um polissacarídeo de glicose e, quando cru, é lentamente atacado pela amilase salivar, pois está numa forma insolúvel e protegido pelas membranas de celulose. Todavia, o aquecimento nas temperaturas utilizadas para cozinhar e assar provoca degradação parcial para uma forma solúvel, que depois pode ser total-

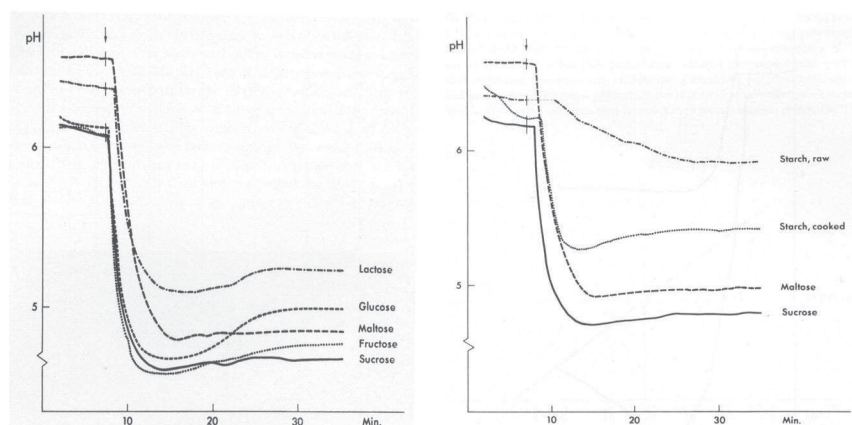
mente dissolvida pela amilase salivar e bacteriana, transformando-se em maltose, maltotriose, dextrina e pequenas quantidades de glicose. Como as moléculas de polissacarídeos são muito grandes para se difundirem na placa, o pH da placa cai muito pouco após o consumo de amido cru. Por sua vez, os carboidratos com baixo peso molecular ficam mais disponíveis para a fermentação bacteriana, e o amido solúvel ou cozido provocam quedas de pH um pouco menores do que os outros açúcares.

Pelo fato do amido cru ser lentamente atacado pelas enzimas salivares e induzir pequenas quedas de pH na placa dental, ele é considerado como não cariogênico ou com baixo potencial cariogênico quando utilizado como única fonte de carboidratos (LINGSTRÖM *et al.*, 1994). Entretanto, a sacarose pode ter seu potencial cariogênico aumentado quando consumida associada ao amido. Num estudo *in situ*, blocos de esmalte dental decíduo foram expostos à sacarose e amido separados ou em associação, 8x/dia, durante 14 dias. Maior desmineralização foi encontrada na presença da associação entre amido e sacarose (RIBEIRO *et al.*, 2005).

Polímeros de glicose, do tipo xarope de glicose ou de maltodextrinas, têm sido frequentemente adicionados aos alimentos para aumentar seu conteúdo energético. Não possuem gosto nem odor, e por isso não alteram o gosto nem o odor dos alimentos. Como esses oligossacarídeos são passíveis de hidrólise pela amilase salivar, eles são potencialmente cariogênicos. Estão presentes em bebidas doces, bebidas para infantes, doces, suplementos energéticos. Os isomalto-oligossacarídeos são comercialmente produzidos pela transglicosilação do amido ou da sacarose. Alguns estudos sugerem que esses oligossacarídeos são menos acidogênicos

que glicose ou sacarose e que podem até inibir a síntese de glucanos insolúveis a partir da sacarose. O xarope de milho, muito utilizado nos Estados Unidos, devido motivos tecnológicos e econômicos, possui pequenas vantagens do ponto de vista cariológico.

Os açúcares presentes nos medicamentos também apresentam uma ameaça à saúde oral. Alguns medicamentos têm que ser tomados várias vezes ao dia e geralmente antes de dormir, o que aumenta o tempo de permanência do açúcar na cavidade bucal, também considerando que durante à noite há redução no fluxo salivar.



(NEFF, 1967) Curvas de queda de pH do biofilme dental após exposição a diferentes açúcares.

CONCLUSÃO

Tendo visto o que foi exposto nos parágrafos anteriores, o padrão dietético do paciente deve ser avaliado durante a análise clínica e nutricional pois possibilitará ao profissional identificar a cariogenicidade da dieta e sua relação com a saúde bucal do paciente. Além disso, a análise da dieta for-

nece subsídios para a elaboração de um plano de tratamento adequado. O cirurgião-dentista e o nutricionista devem alertar o paciente quando o consumo de carboidratos fermentáveis estiver excedido e, juntamente com o paciente, esses profissionais devem propor mudanças para uma alimentação mais racional (carboidratos ingeridos nas principais refeições; redução na ingestão entre as refeições e de alimentos pegajosos).

É importante ter em mente que, em uma doença multifatorial como é a cárie dental, não se pode atribuir o seu desenvolvimento exclusivamente a uma única causa, como a dieta, por exemplo. Porém, o paciente deve ser alertado em relação ao papel desempenhado pela dieta no desenvolvimento da cárie dental. No entanto, há que relacionar a dieta a outros fatores, tais como a eficiência da remoção da placa dental e o uso de fluoretos numa abordagem mais completa em relação à prevenção da cárie dental.

REFERÊNCIAS

Livros e capítulos de livro

KIDD, E. A. M. Diet and caries. *In*: KIDD, E. A. M. **Essentials of dental caries**. 3rd edition. Oxford: Oxford University press, 2005. Cap. 5. p. 88-109.

ZERO, D. T.; MOYNIHAN, P.; LINGSTRÖM, P.; BIRKHED, D. The role of dietary control. *In*: FEJERSKOV, O.; KIDD, E. **Dental caries: The disease and its clinical management**. Second edition. Oxford: Blackwell-Munksgaard, 2008. Chapter 19. p. 329-352.

Artigos científicos

AIRES, C. P.; TABCHOURY, C. P. M.; DEL BEL CURY, A. A.; CURY, J. A. Effect of lactose-containing sweetener on root dentine demineralization in situ. **Caries Res**, 36, p. 167-169, 2002.

- AIRES, C. P.; TABCHOURY, C. P. M.; DEL BEL CURY, A. A.; KOO, H.; CURY, J. A. Effect of sucrose concentration on dental biofilm formed *in situ* and enamel demineralization. **Caries Res**, 40, p. 28-32, 2006.
- BOWEN, W. H.; KOO, H. Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. **Caries Res**, 45, p. 69-86, 2011.
- CARLSSON, J.; EGELBERG, J. Effect of diet on early plaque formation in man. **Odontol Revy**, 16, p. 112-125, 1965.
- CURY, J. A.; REBELLO, M. A. B.; DEL BEL CURY, A. A. *In situ* relationship between sucrose exposure and the composition of dental plaque. **Caries Res**, 31, p. 356-360, 1997.
- CURY, J. A.; REBELO, M. A. B.; DEL BEL CURY, A. A.; DERBYSHIRE, M. T. V. C.; TABCHOURY, C. P. M. Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in the presence of sucrose or glucose and fructose. **Caries Res**, 34, p. 491-497, 2000.
- DIBDIN, G. H.; SHELLIS, R. P. Physical and biochemical studies of *Streptococcus mutans* sediments suggest new factors linking cariogenicity of plaque with its extracellular polysaccharide content. **J Dent Res**, 67(6), p. 890-895, 1988.
- FISHER, F. J. A field survey of dental caries, periodontal disease and enamel defects in Tristan da Cunha. Methods and results. **Br Dent J**, 125, p. 447-453, 1968.
- GUSTAFSSON, B. E.; QUENSEL, C. E.; SWENANDER, L. L.; LUNDQVIST, C.; GRAHNÉN, H.; BONOW, B. E.; KRASSE, B. The Vipeholm dental caries study. **Acta Odontol Scand**, 11, p. 232-364, 1954.
- HAMADA, S.; SLADE, D. Biology, immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. **Microbiol Rev**, 44, p. 331-384, 1980.
- HARDWICK, J. L. The incidence and distribution of caries throughout the ages in relation to the Englishman's diet. **Br Dent J**, 108, p. 9-17, 1960.
- HARRIS, R. Biology of the children of Hopewood House, Bowral, Australia. Observations of dental caries experience extending over five years (1957-1961). **J Dent Res**, 42, p. 1367-99, 1963.
- LINGSTRÖM, P.; BIRKHED, D.; RUBEN, J.; ARENDS, J. Effect of frequent consumption of starchy food items on enamel and dentin demineralization and on plaque pH *in situ*. **J Dent Res**, 73, p. 652-660, 1994.

KURAMITSU, H. K. Virulence factors of mutans streptococci: role of molecular genetics. **Crit Rev Oral Biol Med**, 4, p. 159-176, 1993.

LÖESCHE, W. J. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. **Microbiol ver**, 50, p. 353-80, 1986.

MARTHALER, T. M. Hereditary fructose intolerance. **Br Dent J**, 120, p. 597-599, 1967.

NEFF, D. Acid production from different carbohydrates sources in human plaque *in situ*. **Caries Res**, 1, p. 78-87, 1967.

NEWBRUN, E. Sucrose, the arch criminal of dental caries. **J Dent Child**, 36, p. 239-48, 1969.

NEWBRUN, E.; HOOVER, C.; METTRAUX, G.; GRAF, H. Comparison of dietary habits and dental habits of subjects with hereditary fructose intolerance and control subjects. **J Am Dent Assoc**, 101, p. 619-26, 1980.

PECHARKI, G. D.; CURY, J. A.; PAES LEME, A. F.; TABCHOURY, C. P. M.; DEL BEL CURY, A. A.; ROSALEN, P. L.; BOWEN, W. H. Effect of sucrose containing iron (II) on dental biofilm and enamel demineralization *in situ*. **Caries Res**, 39, p. 123-129, 2005.

RIBEIRO, C. C. C.; TABCHOURY, C. P. M.; DEL BEL CURY, A. A.; TENUTA, L. M. A.; ROSALEN, P. L.; CURY, J. A. Effect of starch on the cariogenic potencial of sucrose. **British J Nutr**, 94, p. 44-50, 2005.

RÖLLA, G.; SCHEIE, A. A.; CIARDI, J. E. Role of sucrose in plaque formation. **Scand J Dent Res**, 93, p. 105-111, 1985.

RÖLLA, G. Why is sucrose so cariogenic? The role of glucosyltransferase and polysaccharides. **Scand J Dent Res**, 97, p. 115-119, 1989.

RUGG-GUNN, A. J.; HACKETT, A. F.; APPLETON, D. R. Relative cariogenicity of starch and sugars in a 2-year longitudinal study of 405 English schoolchildren. **Caries Res**, 21, p. 464-473, 1987.

RUGG-GUNN, A. J. Nutrition, diet and dental public health. **Community Dent Health**, 10, p. 47-56, 1993.

PEARCE, E. Plaque minerals and dental caries. **N Z Dent J**, 94, p. 12-15, 1998.

SCHILLING, K. M.; BOWEN, W. H. Glucans synthesized *in situ* in experimental salivary pellicle function as specific binding sites for *Streptococcus mutans*. **Infect Immun**, 60(1), p. 284-295, 1992.

SCHEININ, A.; MÄKINEN, K. K.; TAMMISALO, E.; REKOLA, M. Turku sugar studies. XVIII. Incidence of dental caries in relation to 1-year consumption of sucrose and xylitol chewing gum. **Acta Odontol Scand**, 33, p. 269-278, 1975.

STEPHAN, R. M. Changes in hydrogen-ion concentration on tooth surfaces and in carious lesions. **J Am Dent Assoc**, 27, p. 718-723, 1940.

TAKEUCHI, M. Epidemiological study on dental caries in Japanese children before, during and after World War II. **Int Dent J**, 11, p. 443-457, 1961.

TOVERUD, G. The influence of war and post war conditions on the teeth of Norwegian school children II and III. **Millbank Mem Fund Q**, 35, p. 127-196, 1957.

VALE, G. C.; TABCHOURY, C. P.; ARTHUR, R. A.; DEL BEL CURY, A. A.; PAES LEME, A. F.; CURY, J. A. Temporal relationship between sucrose-associated changes in dental biofilm composition and enamel demineralization. **Caries Res**, 41, p. 406-412, 2007.

ZERO, D. T.; VAN HOUTE, J.; RUSSO, J. The intra-oral effect on enamel demineralization of extracellular matrix material synthesized by *Streptococcus mutans*. **J Dent Res**, 65(6), p. 918-923, 1986.

ZERO, D. T.; FU, J.; ANNE, K.; CASSATA, S.; MCCOMARCK, S. M.; GWINNER, L. M. An improved intra-oral enamel demineralization test model for the study of dental caries. **J Dent Res**, 71, p. 871-878, 1992.