

AÇÃO DO FLUORETO DE SÓDIO SOBRE A FORMAÇÃO DE DEPÓSITOS, "IN VITRO", POR BACTÉRIAS PLACOGÊNICAS (*)

PROF. EDUARDO ROBERTO CORRÊA DE BARROS (**)

S I N O P S E

O autor investigou a ação do fluoreto de sódio, nas quantidades de 0,2% e 1ppm de flúor (utilizados respectivamente na forma de bochechos e nas águas de abastecimento público, para a prevenção da cárie dental) sobre a formação de depósitos, "in vitro", por bactérias formadoras de placa dental (*Streptococcus mutans*, amostras AHT e IB). Tais concentrações foram selecionadas para o estudo uma vez que seu uso não requer um tratamento prévio dos dentes do tipo "profilaxia" (raspagem, alisamento e polimento). Desta forma, qualquer possível alteração na formação de depósitos seria uma função direta da ação do agente químico e não de qualquer outro fator externo. A técnica desenvolvida baseou-se na determinação, por peso seco, das quantidades de depósitos formados sobre "bengalas" de aço inoxidável mantidas na intimidade do meio de cultura onde as amostras se desenvolviam. Os resultados mostraram não haver alteração estatisticamente significativa (ao nível de 1% quando se adicionou 1ppm de flúor às culturas. Por outro lado, houve uma redução estatisticamente significativa (ao nível de 1%), na forma-

ção de depósitos, quando da adição de 0,2% de fluoreto de sódio.

1. INTRODUÇÃO e REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A cárie dental, que flagela o homem desde as eras mais primitivas, vem recebendo uma atenção cada vez maior no sentido de sua prevenção. O consenso atual é que a atuação deva ser exercida sobre um dos seguintes fatores:²⁶

DIETA — pela diminuição ou eliminação de alimentos cariogênicos, sobretudo os carboidratos e em especial a sacarose;²⁷

HOSPEDEIRO — aumentando-lhe a resistência dos dentes aos ataques dos ácidos produzidos pelos microrganismos 3,8,13,16,19,43,45 e

MICRORGANISMOS — diminuindo-lhes a capacidade formadora de ácidos ou ainda de colonizarem-se sobre as superfícies dentais formando a placa dental.^{15,26}

Tendo em vista que este trabalho visa observar se o fluoreto de sódio (normalmente utilizado para conferir maior resistência aos dentes) é

(*) Súmula da Dissertação apresentada ao Centro de Pesquisas em Odontologia Social, Órgão Auxiliar da Faculdade de Odontologia da U.F.R.G.S., para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

(**) Prof. Assistente do Departamento de Odontologia Preventiva e Social (U.F.R.G.S.).

capaz de atuar também como agente modificante da formação de depósitos, "in vitro", por bactérias placogênicas, é pertinente a revisão dos principais aspectos da literatura quanto a:

- (1) relação entre a existência de placa dental sobre as superfícies dentais e a ocorrência do processo cárie;
- (2) fluoreto de sódio como agente efetivo na prevenção da cárie dental e
- (3) ação do flúor sobre a formação de depósitos produzidos por bactérias placogênicas.

1.1. Relação entre a existência de placa dental sobre as superfícies dentais e a ocorrência do processo cárie.

Black⁶, já em fins do século passado, acreditava que as cáries se iniciavam pela ação de massas de microrganismos (placa microbiana gelatinosa) que se aderiam aos dentes. Esta hipótese de Black permaneceu ignorada por muitos anos.

Somente em 1947, McClure e Hewitt³³ conseguiram a primeira constatação científica de que a cárie é uma doença microbiana ao inibi-la, em ratos, com o uso de penicilina.

Orland,³⁸ em 1955 e Fitzgerald e Keyes⁵ em 1960, demonstraram, através de trabalhos com animais gnobiotóticos (ratos e hamsters), que a cárie é uma doença infecto-contagiosa.

Guggenheim e Schroeder¹², em 1967, analisando amostras de estreptococos cariogênicos para animais,

observaram que eles apresentavam a distinta característica de produzirem um polissacáride extracelular (dextrano) de extrema adesividade.

Jordan e Keyes,²⁴ em 1966 e Gibbons e Banghart¹⁰, em 1967, salientam algumas das características que qualificam os estreptococos cariogênicos:

- fermentam uma grande quantidade de carboidratos produzindo um pH final abaixo de 4.5;
- estocam um polissacáride intracelular do tipo amilopectina, de uma grande variedade de carboidratos, podendo metabolizá-los para formar ácidos quando a fonte exógena de carboidratos se esgota e
- produzem o dextrano a partir da sacarose.

Os estreptococos que produzem dextrano a partir da sacarose, foram encontrados por Carlsson^{1,2} como sendo os organismos predominantes da placa dental de humanos. Segundo Zinner⁴⁹ e Krasse²⁸ inoculados em ratos e hamsters mostraram-se capazes de produzir placa e cárie nesses animais.

Outros microrganismos foram detectados em produzir substâncias aderentes aos dentes, como é o caso do *Odontomyces viscosus* que conforme Jordan e Keyes²³, produz o levano. Contudo, os estreptococos continuam sendo os mais implicados no início e desenvolvimento do processo, uma vez que o polissacáride que produzem é mais persistente, adere mais e se dissolve menos⁶.

Estudos da estrutura da placa dental, demonstraram que ela é composta predominantemente de estreptococos, e uma substância intermicrobiana³¹. Esta, mostrou-se ser basicamente um polissacáride extracelular, o DEXTRANO¹⁰.

Estabelecidas as correlações entre microrganismos e placa dental; entre microrganismos e cárie; ficam determinadas, indiretamente, as correlações entre placa dental e cárie.

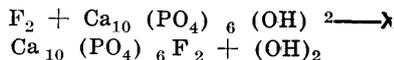
Finalmente, Von Der Fehr, Løe e Theilade⁴⁶, em 1970, comprovaram experimentalmente, que a placa dental é indispensável para a instalação da cárie de superfície lisa. Observaram que, partindo de dentes polidos, havia a formação de placa dental a partir da qual ocorria uma desmineralização do esmalte, iniciando o processo cárie. Observaram também, que uma vez removida a placa dental, após ter sido constatado o início da desmineralização, o esmalte podia ser remineralizado, comprovando que a placa é indispensável para que o processo cárie se instale e progrida.

1.2. Fluoreto de sódio como agente efetivo na prevenção da cárie dental.

O elemento mais usado na prevenção e controle da cárie dental, em todo o mundo, tem sido o flúor tanto ingerido como aplicado topicamente. Muitos mecanismos são descritos para explicar a sua ação, já comprovada como efetiva, na prevenção desta enfermidade.^{13,15,19}

Encarado o ponto de vista de sua

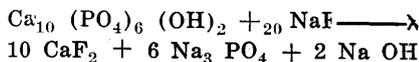
AÇÃO SISTÊMICA é aceita a teoria da solubilidade^{3,13,15,19,20}, que diz que o flúor ingerido em idade tenra, por ocasião da formação dos dentes, se agrega ao esmalte dental, na forma de fluorapatita, extremamente mais resistente e menos solúvel ao ataque dos ácidos, que a hidroxiapatita natural:



Tal fato tem sido comprovado química e experimentalmente, embora não esteja bem definida a maneira pela qual a fluorapatita seria menos solúvel ao ataque dos ácidos. De qualquer forma está demonstrado que um teor de aproximadamente 1ppm (uma parte por milhão) de flúor na água potável é a concentração ótima para o controle da cárie dental.^{3,21,45} A redução percentual de dentes cariados, obturados e falhos atinge cerca de 60% em indivíduos consumidores de água fluoretada durante a formação de seus dentes.^{3,36,45}

Quanto à AÇÃO LOCAL dos fluoretos na prevenção da cárie dental, destacam-se dois tipos de ações:

a) — a primeira, demonstra que o íon flúor se combina com o cálcio da hidroxiapatita do esmalte, na camada externa, formando um fluoreto de cálcio que é menos solúvel aos ácidos bucais: 3, 13, 16, 19, 21, 35, 45.



d) — o segundo mecanismo, bem mais discutido é a chamada “teoria enzimática”. Esta, esquecida durante muitos anos, tem recebido, mais recentemente alguma atenção. Muitos pesquisadores^{13, 16, 17, 18, 20, 29, 34, 41, 48}, vem procurando estabelecer a real influência dos fluoretos sobre o metabolismo acidogênico das bactérias orais.

Alguns dados já foram obtidos, embora um número extremamente grande de interrogações estejam sem respostas.

Foi constatado, que o uso de fluoretos realmente promove uma inibição na formação de ácidos pelas bactérias. Eles inibem a glicólise anaeróbia por atuarem sobre a enzima enolase que cataliza a reação: ácido 2 — fosfo — glicérico — ácido fosfoenol pirúvico. Contudo, esta inibição é temporária, passando a bactéria a utilizar nova rota metabólica para realizar a glicólise^{11, 48}.

No que se refere aos percentuais de redução da incidência de cárie dental quando das fluoretizações (aplicações tópicas) os dados são bastantes variáveis sobretudo considerando o tipo de sal que é utilizado. Classicamente, como eleita em saúde pública, a técnica de KNUTSON utiliza o fluoreto de sódio a 2% com um percentual de redução da ordem de 40% na incidência de cárie ⁴⁵. Mais recentemente os bochechos com soluções de fluoreto de sódio a 0,2% têm demonstrado grande eficiência na prevenção da cárie dental com redu-

ções da ordem de até 50%.¹⁴ Esta técnica de fluoretização é bastante distinta das demais, uma vez que não envolve o polimento prévio de todas as superfícies dentais, além de ser utilizada com uma frequência extremamente maior: uma vez por semana. Justamente por essas características que ela apresenta é conveniente observar se o NaF, nessa concentração de 0,2%, tem algum efeito inibidor sobre a placa dental. As outras técnicas não permitem observar diretamente a ação da concentração do NaF sobre a placa devido ao polimento prévio normalmente realizado. Nesta, a ação, caso exista, será devida exclusivamente ao NaF, uma vez que os procedimentos de remoção dos depósitos não são realizados.

A fim de proporcionar um melhor embasamento às observações que poderão ser realizadas “in vivo”, este trabalho se propõe a verificar a ação direta, “in vitro”, das concentrações de 1 ppm de flúor e 0,2% de NaF na produção de depósitos, sobre fios de aço inoxidável, por culturas puras de bactérias obtidas de placa dental de humanos.

Os resultados que forem obtidos não poderão ser extrapolados para a situação “in vivo”, mas teremos indicações muito valiosas que servirão de base para qualquer outro trabalho dessa ordem.

1.3. Ação do flúor sobre a formação de depósitos produzidos por bactérias placogênicas.

No que se refere a flúor e depó-

sitos, os poucos trabalhos realizados estabelecem relações com a teoria enzimática.²² Neste particular alguma atenção vem sendo desenvolvida no sentido de observar a ação do flúor sobre a produção de polissacárides pelas bactérias placogênicas. Van Houte,⁴⁴ constatou que quanto maior a concentração de flúor, é significativamente menor a quantidade de bactérias produtoras de polissacáride iodofílico (intracelular). Outros autores⁴⁷ preocuparam-se em estabelecer as possíveis correlações entre esses elementos: flúor e amilopectina.

A busca de informações quanto aos possíveis efeitos do flúor sobre a produção de depósitos extracelulares (polissacárides dos tipos levano e dextrano) por bactérias cariogênicas, levou a observação de que, praticamente, inexistem dados.

Guggenheim e Schroeder¹² (1967), Fitzgerald e Jordan⁷ (1968) e Genco et alii⁹ (1969), relataram que 400 ppm de flúor em uma suspensão celular com sacarose, não afetou a atividade da dextranucrase, acreditando que o íon flúor não apresenta efeito apreciável sobre a produção de dextrano extracelular.

Möller³⁵ (1970) relata que concentrações de íon flúor de 1 a 2 ppm parecem inibir a síntese de polissacárides extra e intracelulares em pH baixo.

Shern et alii⁴⁰ (1971) comparando a eficiência de aminofluoretos com a de fluoretos inorgânicos sobre a formação de depósitos como a placa, por estreptococos cariogênicos, sobre fios ortodônticos suspensos em meios de cultura, acharam que os

aminofluoretos promoveram uma marcada inibição na formação de depósitos enquanto os demais não.

Como pode ser observado, os poucos dados existentes não permitem divisar qualquer solução para o proposto.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. População estudada

A população utilizada para o desenvolvimento da pesquisa constou de duas amostras de microrganismos: — uma amostra (AHT) de estreptococos de lesão cariosa de humanos, cariogênica para hamsters. Isolada por Zinner⁴⁹ em 1965.

— uma amostra de estreptococos (Ingbritt — IB) de origem humana, cariogênica para hamsters. Isolada por Krasse²⁸ em 1966.

As amostras foram obtidas do laboratório de Microbiologia Oral do Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro. No desenvolvimento dos trabalhos, os grupos experimentais foram submetidos a concentrações diferentes de NaF, enquanto o grupo controle se desenvolveu na ausência deste composto.

2.2. Condições para proporcionar o crescimento bacteriano e a produção de depósitos

2.2.1. Meio de Cultura

2.2.1.1. Meio básico

Foi utilizado o meio proposto por

Jurgensen e de Araújo²⁵ que é o Ágar-Mitis-Salivarius modificado pela remoção do ágar e das substâncias inibidoras (Azul de Tripan e Cristal Violeta), constando de:

Trypticase (BBL)	1,5%
Tiotone (BBL)	0,5%
Fosfato di-potássio (Fischer)	0,4%
Água destilada	100ml
ph final:	7.2.

A esterilização foi feita em autoclave a 121°C por 20 minutos.

Em vista da necessidade de adicionar, ao meio, soluções de sacarose e de fluoreto de sódio e a fim de não torná-lo muito diluído, quebrando as proporções da fórmula proposta, foi adotado o seguinte procedimento: — o meio original foi preparado em uma quantidade menor de água destilada (77,5%);

— a quantidade de água destilada em falta, 22,5%, foi completada quando da adição das soluções de sacarose (12,5%) e de fluoreto de sódio (10%);

— as soluções foram preparadas nesses volumes de água destilada, de modo a que cada tubo a ser inoculado tivesse as proporções corretas de sacarose e de flúor, sem alterar a diluição final do meio de cultura.

Os tubos utilizados para a obtenção dos crescimentos bacterianos apresentavam 16x120 mm, a fim de permitirem um melhor desenvolvimento da técnica que será exposta após. Para facilidade de trabalho, foi estandardizado que os tubos deveriam conter um volume final de 4 ml destinados ao suporte do crescimen-

to das amostras e conseqüente produção dos depósitos, assim distribuídos:

- 3,1 ml do meio básico (carente em água)
- 0,5 ml da solução de sacarose e
- 0,4 ml da solução de fluoreto de sódio (todas as soluções foram preparadas para serem utilizadas nestes volumes).

Os aditivos (soluções de sacarose e fluoreto de sódio) repuseram a quantidade de água necessária para estabelecer a concentração exata dos mesmos e do próprio meio de cultura.

2.2.1.2. Aditivos ao meio básico

a) Solução de Sacarose

Foi preparada uma solução de sacarose *a 40% em água destilada a qual foi esterilizada por filtração.

Desta solução 0,5 ml, foi adicionado assepticamente a cada frasco com 3,1 ml do meio básico (carente em água). Esta quantidade de sacarose adicionada, nos 4 ml finais de cada tubo, forneceu a percentagem exata de 5%.

b) Soluções de Fluoreto de Sódio

b.1. Solução com 1 ppm de flúor

Foi preparada uma solução de fluoreto de sódio contendo 10 ppm de flúor (22, 1 mg de NaF em 1000ml de água destilada) esterilizada por

* "Allied Chemical & Dye Corporation"

filtração. 0,4 ml da solução, foi adicionado assepticamente a cada tubo contendo os 3,1 ml de meio e os 0,5 ml da solução da sacarose. Esta quantidade de fluoreto de sódio, nos 4ml de finais de cada tubo, forneceu a percentagem correta de 1ppm. de flúor.

Solução de NaF a 0,2%

Foi preparada uma solução de fluoreto de sódio a 2% (2g de NaF em 100 ml de água destilada) esterilizada por filtração. 0,4, ml desta solução foi adicionado a cada tubo de ensaio com os 3,6 ml. A quantidade de NaF, considerando-se os 4ml finais de cada tubo, foi de 0,2%.

2.2.2 Recursos para verificar a Produção dos Depósitos

A fim de verificar a produção de depósitos pelas amostras em estudo, seguiu-se a técnica descrita por Jurgensen e Araújo²⁵ (1967), com algumas modificações. Foi introduzido na intimidade de cada tubo de ensaio, (de 16 x 120mm) previamente a autoclavação do meio, um fio de aço inoxidável de 0,7 mm de diâmetro e 5cm de comprimento, com uma dobradura em alça na extremidade superior. Em vista desta dobradura, a altura de cada uma destas "bengalas ficou reduzida a 4cm, sendo que aproximadamente um centímetro permaneceu fora do meio de cultura.

As dobraduras realizadas nos fios, dando-lhes a forma de "bengalas", visou facilitar a sua remoção dos tubos bem como os repiques periódicos

através de uma alça em uma haste de Kölle. Por esta razão, a fim de não remover o possível crescimento que se verificaria na zona da dobradura, é que foi previsto que a mesma não permaneceria no meio de cultura. Por outro lado, teve a conveniência de não permitir que o crescimento que ocorre ao longo da parte inferior da "bengala", entrasse em contato com as paredes do tubo, sendo assim possível de ser removido quando das transferências.

2.3. Determinação da quantidade de depósitos produzidos

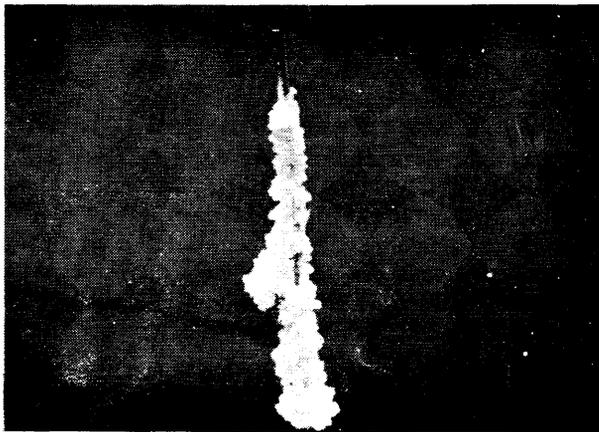
Para verificar a quantidade de depósitos produzidos sobre as "bengalas", pelas bactérias em teste, frente as diferentes concentrações de fluoreto de sódio, foi utilizada a técnica de determinação do peso seco^{36,39}.

A cada intervalo de 48 horas, durante 14 dias, foram verificadas as deposições nas "bengalas" de cada grupo experimental:

- com 1ppm de flúor;
- com 0,2% de fluoreto de sódio, de cada uma das amostras em estudo e
- controle.

Este tempo total foi selecionado em vista das informações de JURGENSEN e ARAÚJO²⁵ de que, nele "há a formação de grandes massas gelatinosas" (Fig. 1). Assim, ao mesmo tempo que se pode medir a deposição total, foi possível observá-la a cada período de 2 dias.

FIG. 1



Depósitos verificados sobre "bengalas" após o período total de crescimento.

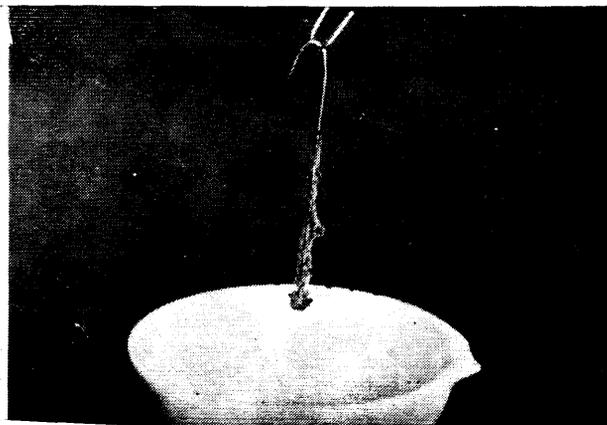
Uma vez retiradas do meio de cultura, as "bengalas" foram colocadas em cadinhos de porcelana e foi desenvolvida a técnica descrita por Schneider Santos, Barros e Opermann (1972)³⁹ que, resumidamente, consta de :

1.º - **Dessecação** — Os cadinhos, con-

tendo as "bengalas" com depósitos bacterianos, foram levados a um forno de Pasteur regulado para uma temperatura média de 100 graus C (com extremos em 96 e 105.ºC). O tempo total, utilizado para obter-se a dessecação foi de 75 minutos.

Fig. 2.

FIG. 2



Aspectos dos depósitos aderidos as "bengalas" após o processo de dessecação.

2.º - Resfriamento — Uma vez dessecado o material, os cadinhos foram levados a uma cuba dessecadora a fim de resfriarem sem que ocorresse uma possível hidratação do material. Para que o ambiente se mantivesse isento de umidade, foi utilizado, no fundo da cuba, sílica-gel. O tempo total utilizado para o resfriamento foi de 30 minutos.

3.º - Pesagem — a pesagem de cada conjunto: cadinho, bengala e depósito, foi realizada em balança sensível ao centésimo de miligramas.

Seguiu-se a limpeza dos cadinhos e bengalas, repetindo-se o processo de dessecação para os cadinhos e o de pesagem para ambos. As “bengalas” não foram dessecadas novamente por serem de material não hidratável.

Dessa forma, foi possível obter os valores das pesagens isoladas dos cadinhos e das bengalas. De posse desses dados foi calculado o valor em peso seco, dos depósitos produzidos pelas bactérias: peso seco do conjunto menos o peso seco do cadinho e da Bengala é igual ao peso seco do Depósito.

2.3. Desenvolvimento do método experimental

Com cada uma das amostras em estudo, foi adotado o seguinte procedimento:

2.4.1 Atitudes prévias

Previamente foram tomadas as seguintes atitudes:

a) TUBOS DE ENSAIO:

O tamanho dos tubos de ensaio utilizados foi de 16 x 120mm. Tais dimensões foram selecionadas como sendo as ideais tendo em vista:

- 1) as transferências das “bengalas” a cada 48 horas; tubos mais longos dificultariam as mesmas.
- 2) a necessidade, já exposta, de que as bengalas permanecessem com sua parte superior fora do meio de cultura; também facilitando as transferências e evitando deslocamentos dos depósitos aderidos.

168 tubos foram destinados ao desenvolvimento do trabalho experimental com cada uma das amostras.

b) “BENGALAS”

Foram confeccionadas 42 bengalas, conforme o descrito nos íteis 2.2.2. e colocadas em 42 dos 168 tubos de ensaio; exatamente aqueles que seriam utilizados no primeiro dia de trabalho.

c) MEIO BÁSICO

Foram preparados 600ml do meio básico e distribuídos nos 168 tubos (42 deles já com as bengalas) à razão de 3,1ml por tubo.

Seguiu-se a esterilização do meio em autoclave nos tubos com e sem as “bengalas”.

d) ADITIVOS AO MEIO BÁSICO

Os aditivos ao meio básico, conforme a descrição anterior, uma vez esterilizados por filtração, em filtro Seitz, foram adicionados assepticamente aos tubos contendo o meio de cultura, já esterilizado, da seguinte forma:

- 1.º — todos os tubos (158) receberam 0,5ml da solução de sacarose (42 com as “bengalas”);
- 2.º — 56 tubos receberam 0,4 ml da solução de NaF com 1ppm de flúor (14 dos quais, com as “bengalas”);
- 3.º — 56 tubos receberam 0,4 ml da solução de NaF a 0,2% (904,97ppm), 14 dos quais com as “bengalas” e
- 4.º — 56 tubos receberam 0,4ml de uma solução de água destilada estéril e foram destinados a funcionarem como controle 14 deles continham as “bengalas”).

e) IDENTIFICAÇÃO

Seguiu-se a identificação dos 168 tubos, conforme seus conteúdos, em 3 grupos: — controle (56 tubos).

— 1 ppm (56 tubos) e

— 0,2% (56 tubos)

Cada grupo estava composto por 7 séries de tubos:

- 1.º — 14 tubos numerados de 1 a 14 (contendo 14 “bengalas”);

- 2.º — 12 tubos numerados de 3 a 14 (sem “bengalas”);
- 3.º — 10 tubos numerados de 5 a 14 (sem “bengalas”);
- 4.º — 8 tubos numerados de 7 a 14 (sem “bengalas”);
- 5.º — 6 tubos numerados de 9 a 14 (sem “bengalas”);
- 6.º — 4 tubos numerados de 11 a 14 (sem “bengalas”) e
- 7.º — 2 tubos numerados de 13 a 14 (sem “bengalas”);

Isto posto, os 168 tubos foram estocados sob refrigeração a seis graus centígrados.

f) PREPARO DO INÓCULO

A amostra a ser testada, 72 horas antes do início do método experimental foi cultivada no mesmo meio (mitis salivarius modificado: sem o agar, os inibidores e com 5% de sacarose). Foi semeado um tubo de 16 x 160mm contendo 10 ml de meio. A incubação foi feita em microaerofilia, em jarra FOPA da anacrobiose, a 37 graus C. (após ter sido feita uma remoção de O₂ e uma lavagem com uma mistura gasosa composta de 95% de N₂ e 5% de CO₂.)²²

O mesmo meio da experiência foi utilizado para este crescimento prévio, tendo em vista não modificá-lo quando dos procedimentos de inoculação.

2.4.2. Desenvolvimento propriamente dito

Uma vez preparado o material para o desenvolvimento

da técnica laboratorial, procedeu-se como a seguir será descrito.

1.º DIA

(1) HOMOGENEIZAÇÃO DO 'INÓCULO

A cultura do microrganismo em teste, em caldo mitis salivarius com 5% de sacarose, que permaneceu incubado por 72 horas, em microaerofilia e a 37 graus C, serviu de ponto de partida para a fase experimental. O conteúdo de 10 ml de tubo de ensaio (16 x 160mm) contendo a cultura, foi vertido, assepticamente, em um homogeneizador de tecidos previamente esterilizado. Através do pistilo, foi feita uma homogeneização da cultura durante um minuto. Com esse tempo, obteve-se uma boa dissolução dos grumos formados por ocasião do crescimento inicial.

(2) INOCULAÇÃO

A cultura bacteriana homogeneizada, foi inoculada à razão de 0,2ml por tubo, em 42 tubos de ensaio contendo por meio básico, aditivos e "bengalas", da seguinte forma:

14 tubos - CONTROLE (com água destilada);

14 tubos - com NaF a 1ppm de flúor e

14 tubos — com NaF a 0,2%

As inoculações foram feitas através de pipetas de 1 ml divididas em décimos, individualmente para cada tubo de ensaio. A fim de manter

uma suspensão de microrganismos homogênea no tubo de inóculo foi estandardizado que, a cada pipetagem, seriam realizados 3 movimentos (de aspirações e devolução), prévios a remoção da quantidade (0,2ml) exata a ser inoculada em cada tubo.

(3) INCUBAÇÃO

Os 42 tubos inoculados, contendo as 42 "bengalas" e os diferentes tipos de aditivos foram incubados em um ambiente de microaerofilia, a 37 graus C durante um período de 48 horas.

3.º DIA

(1) REPIQUES

Transcorridas 48 horas da incubação dos 42 tubos, 36 deles (os de números 3 a 14 de cada grupo) tiveram suas "bengalas" transferidas para novos tubos contendo o mesmo mais básicos e aditivos. Isso foi realizado a fim de que os microrganismos pudessem continuar o seu desenvolvimento com uma fonte apropriada de nutrientes. Ao final das transferências os tubos foram re-incubados nas mesmas condições de microaerofilia e temperatura. A técnica de realização dos repiques consistiu simplesmente da transferência das "bengalas", para novos tubos com o meio e aditivos, através de uma alça em uma haste de Kölle, dentro dos padrões microbiológicos de assepsia.

(2) DETERMINAÇÃO DA QUAN-

FIDADE DE DEPÓSITOS PRODUZIDOS, EM PESO SECO, EM 48 HORAS.

Os tubos de ensaio de números 1 e 2, de cada um dos três grupos, exatamente aqueles tubos que não foram repicados, tiveram suas “bengalas” examinadas quanto aos depósitos nelas aderidos. O peso seco dos depósitos foi determinado conforme a técnica descrita anteriormente.

DEMAIS DIAS

Nos dias seguintes, em que continuou sendo desenvolvido o método experimental: 5.º, 7.º, 9.º, 11.º, 13.º e 15.º, isto é, a cada 48 horas, procedeu-se de maneira similar ao 3.º dia. Dois tubos de cada série eram separados para a determinação do peso seco dos depósitos e os demais repicados.

2.5. Análise Estatística

A significância estatística entre os resultados dos grupos experimentais e o controle, foi estudada utilizando-se o método de análise pelas Regressões Lineares ou Comparação de Linhas de Regressão (Snedecor, 1967)⁴².

Este teste foi selecionado como o adequado para o tratamento estatístico dos resultados uma vez que permite estudar simultaneamente a relação entre x e y em amostras obtidas em diferentes condições.

O nível de significância fixado para esta análise foi de 1%.

3. RESULTADOS

Os resultados das médias das pegagens, em peso seco, dos depósitos

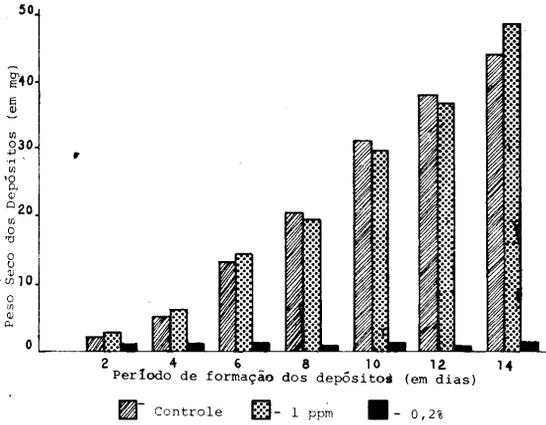
produzidos pelas bactérias placogênicas, amostras AHT e IB, sobre “bengalas” de aço inoxidável, podem ser visualizados em conjunto através das figuras 3 e 4 reproduzidas em seqüência. Cada figura mostra os resultados obtidos com cada uma das amostras, nas três condições em que o experimento foi realizado: 1 ppm de flúor; 0,2% de fluoreto de sódio e controle, em duplicata.

As figuras 5, 6, 7 e 8 mostram as regressões lineares dos dados obtidos com cada amostra, confrontando as retas experimentais com a representativa do controle.

Pela figura 5 observa-se que as diferenças entre as declividades e entre as médias ajustadas, da amostra AHT, nas condições de 1 ppm e controle, não foram estatisticamente significantes. Entretanto, a mesma amostra nas condições de 0,2% e controle (figura 6) apresentou diferenças estatisticamente significantes ao nível de 1%, tanto entre as declividades como entre as médias ajustadas.

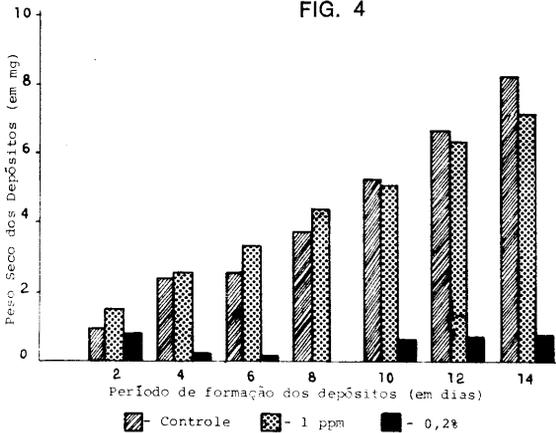
Em relação a amostra IB, encontrou-se uma diferença estatisticamente significativa apenas ao nível de 5% entre as declividades, não havendo, todavia, diferença significativa entre as médias ajustadas, quando comparado 1 ppm com o controle (figura 7). Ao comparar-se a concentração de 0,2% e controle da mesma amostra (figura 8) encontrou-se que as diferenças entre as declividades e entre as médias foram estatisticamente significantes ao nível de 1%.

FIG. 3



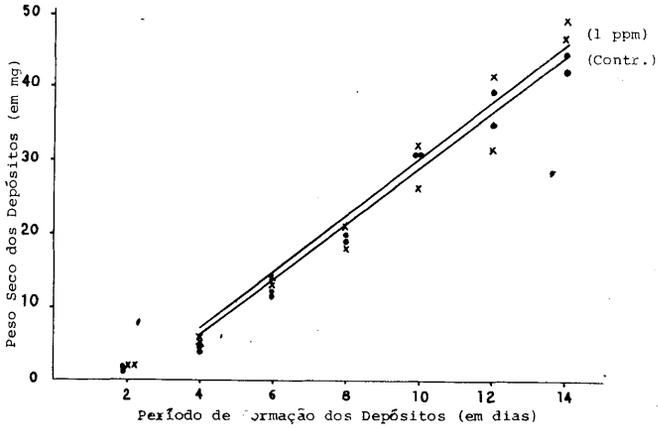
Quantidades médias, em peso seco, dos depósitos verificados sobre "bengalas", produzidos por estreptococos, amostra AHT, a cada período de 48 horas, em presença de diferentes concentrações de flúor.

FIG. 4



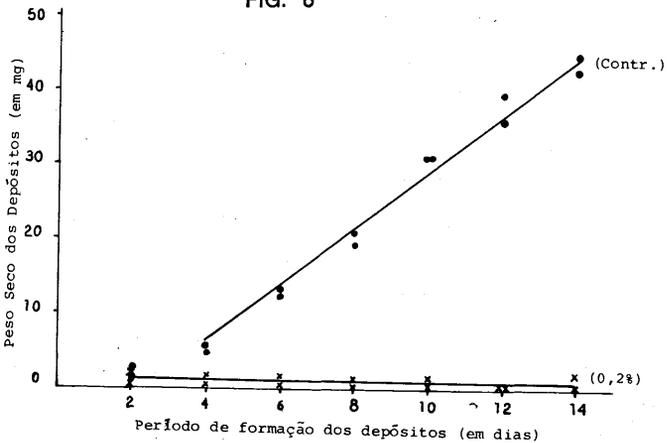
Quantidades médias, em peso seco, dos depósitos verificados sobre "bengalas", produzidos por estreptococos, amostra IB, a cada período de 48 horas, em presença de diferentes concentrações de flúor.

FIG. 5



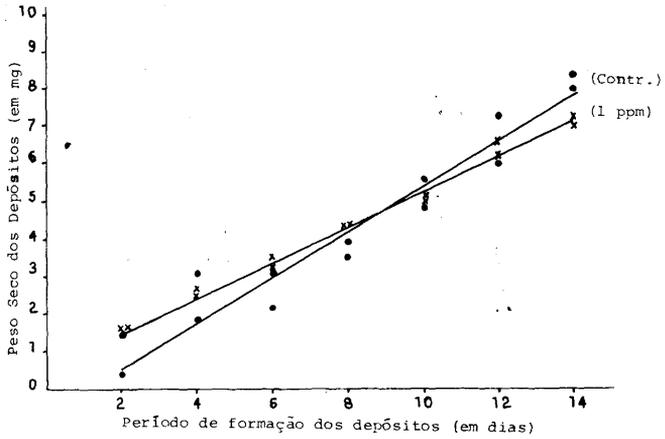
Retas ajustadas dos valores dos depósitos formados nos diferentes tempos pela amostra AHT, nas condições de 1 ppm(x) e controle (0).

FIG. 6



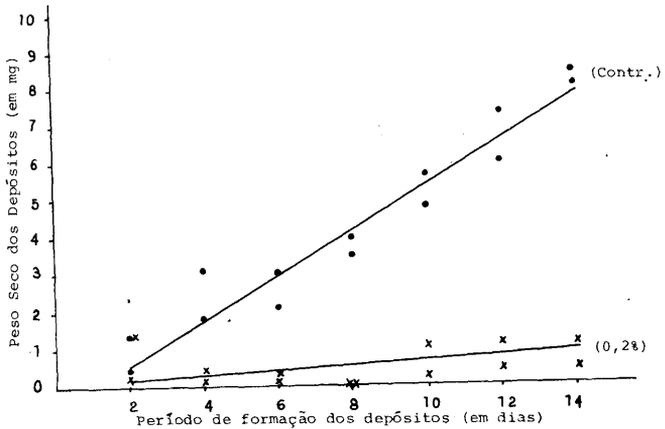
Retas ajustadas dos valores dos depósitos formados, nos diferentes tempos, pela amostra AHT, nas condições de 0,2% (x) e controle (0).

FIG. 7



Retas ajustadas dos valores dos depósitos formados nos diferentes tempos, pela amostra IB, nas condições de 1 ppm (x) e controle (0).

FIG. 8



Retas ajustadas dos valores dos depósitos formados nos diferentes tempos, pela amostra IB, nas condições de 0,2% e controle (0).

4. DISCUSSÃO

A discussão deste trabalho será desenvolvida considerando-se a técnica empregada, os resultados obtidos e a comparação destes com os de trabalhos prévios.

4.1. Técnica

A determinação dos objetivos desta pesquisa gerou a necessidade de ser selecionada uma técnica que possibilitasse medir, da melhor maneira possível, a quantidade de depósitos produzidos pelas amostras de estrep-tococos cariogênicos, nos diferentes tempos.

No que se refere a **produção dos depósitos**, sobre as "bengalas", a técnica mostrou-se muito eficiente; a adesividade dos depósitos foi tão marcada que permitiu o seu fácil repique a cada intervalo de 48 horas. Este fato pode ser evidenciado na figura 1, já referida, onde se nota um grande apêndice dos mesmos.

A fim de bem observar a **quantidade de depósitos produzidos**, pensou-se, inicialmente, em utilizar o método proposto por McCabe et alii³²: um gradiente dos depósitos. Contudo, ao ser analisada esta técnica, ela pareceu ser pouco exata em função da comparação visual em que se baseia. Daí, ter sido relegada a um segundo plano.

A possibilidade de serem estabelecidas comparações fotográficas das deposições experimentais com o controle, também não pareceu ser uma boa solução. Mesmo sendo possível a verificação exata da superfície foto-

grafada, seria perdida a possibilidade da verificação do volume total. Este fato, sem dúvida, levaria a distorções na leitura dos resultados.

A idéia, em princípio boa. de pesagem dos depósitos produzidos também se mostrou pouco precisa quando foi observado que as amostras formavam deposições diferentes sobre os fios de aço: umas mais e outras menos circunvolutas. As com maior número de circunvoluções e em consequência com maior superfície externa, quando removidas as "bengalas" do meio, transportavam uma maior quantidade de líquidos, impossibilitando uma comparação efetiva, por pesagem, desses depósitos.

A fim de serem utilizados os benefícios desta técnica de pesagem, sem os inconvenientes referidos, partiu-se para a dessecação do material aderido às "bengalas". Esta técnica de pesagem foi adaptada às condições da pesquisa. O método foi elaborado em sua totalidade juntamente com o Prof. José O. Schneider Santos e o Acadêmico Ruy Oppermann³⁸. Um sumário do mesmo foi descrito em Material e Métodos.

4.2. Resultados Obtidos

A "análise das regressões lineares", teste estatístico empregado no presente trabalho, permite o estudo dos resultados obtidos dentro de uma interpretação teórica básica.

Dois valores característicos das duas regressões foram comparados entre si: as medias ajustadas (y_1 e y_2) dos resultados das pesagens e os coe-

ficientes de regressão (b_1 e b_2), que caracterizam a declividade (slop) das respectivas retas.

Na comparação entre tais valores característicos de duas retas podem ocorrer os seguintes casos:

1.º CASO: haver diferença significativa tanto entre as médias ajustadas como entre os coeficientes de regressão.

Neste caso, portanto, a população dos valores y_1 difere da dos valores y_2 . Ademais, as leis de "formação de depósitos" (dadas por b_1 e b_2) também são diferentes.

2.º CASO: Haver diferença significativa entre as médias ajustadas e não haver entre os coeficientes de regressão.

3.º CASO: Não haver diferença entre as médias ajustadas e haver entre os coeficientes de regressão.

4.º CASO: Não haver diferença significativa tanto entre as médias ajustadas como entre os coeficientes de regressão.

A aplicação desta interpretação teórica a experimentação prática, permite a sumarização dos resultados, quanto a sua significância estatística, da seguinte forma:

a) a produção de depósitos por bactérias placogênicas (amostras AHT e IB), incubadas com 0,2%

de fluoreto de sódio, apresenta uma redução estatisticamente significativa, ao nível de 1%, quando comparada com a situação de controle. Esta observação está relacionada com o 1.º caso da interpretação teórica, onde se verifica uma diferença significativa tanto entre as médias ajustadas como entre os coeficientes de regressão. Há, por conseguinte, conjuntos diferentes de valores para cada situação (0,2% e controle), assim como diferentes "leis de formação de depósitos".

b) A produção de depósitos pela amostra AHT, incubada com 1 ppm de flúor, não apresentou redução estatisticamente significativa, ao nível de 1%, quando comparada com a situação de controle. Esta observação está relacionada com o 4.º caso da interpretação teórica, onde se verifica que não há diferença significativa tanto entre as médias ajustadas como entre os coeficientes de regressão. Os conjuntos de valores são similares para as duas situações (1 ppm e controle), assim como há uma mesma "lei de formação de depósitos".

c) A produção de depósitos pela amostra IB, incubada com 1 ppm de flúor, não apresentou redução estatisticamente significativa, ao nível de 1%, quando comparada com a situação de controle. Esta observação também está relacionada com o 4.º caso da interpretação teórica. Desta forma, ambas as amostras, IB e AHT, incubados com 1 ppm de flúor, ao

nível de 1%, não reduziram significativamente a produção de depósitos. Entretanto, para a amostra IB, considerando-se o nível de significância de 5%, observa-se que há uma diferença estatisticamente significativa entre as declividades, embora isso não ocorra entre as médias ajustadas. Esta observação está relacionada com o 3.º caso da interpretação teórica e significa que a dependência da produção de depósitos do contróle. em relação ao tempo é de tipo diferente da produção de depósitos experimentais (1 ppm) em relação ao tempo. São “leis de produção de depósitos” diferentes, embora os conjuntos de valores sejam similares.

A análise das quantidades de depósitos produzidos, permite observar que, além da ocorrência de tais variações experimentais, determinadas pela adição de flúor, ocorreram variações individuais entre as amostras. A quantidade de depósitos produzidos variou sensivelmente entre as amostras AHT e IB, conforme pode ser observado do confronto das tabelas I e II demonstrando que a amostra AHT é mais produtora de depósitos que a amostra IB. É possível que outros tipos de alterações possam ocorrer quando da testagem de outras amostras de *Streptococcus mutans*.

Em função dos resultados altamente significantes na queda da produção de depósitos, por ambas as amostras, obtidos quando da adição de 0,2% de NaF, bem como do fato de

nunca ser observado, com o olho desarmado, qualquer tipo de deposição sobre as “bengalas”, resolveu-se realizar um teste de viabilidade (capacidade de reprodução) das amostras submetidas a essa condição. Observou-se que em 24 horas de incubação com esta concentração do aditivo, as duas amostras perdiam a viabilidade: repicadas para tubos contendo o meio de cultura sem o fluoreto de sódio, não tornaram a crescer, mesmo após vários dias de incubação. Tal fato, se presume, deveria determinar uma produção nula de depósitos; não deveria ocorrer alteração de peso nas bengalas, isto é, o valor da pesagem da “bengala” limpa deveria ser praticamente o mesmo que se verificaria após a incubação. Isso no entretanto, não se verificou dessa forma.

Após os períodos de incubação, os valores das pesagens das “bengalas” foram quase sempre mais elevados, indicando a existência de um fator determinante da alteração de peso.

Embora não tenha sido encontrada, para este fato, uma justificativa plenamente satisfatória, é possível elaborar algumas conjecturas que poderão se constituir em novos temas de investigação:

- 1.º — o fluoreto de sódio a 0,2% pode ter determinado a perda da viabilidade bacteriana sem, contudo, ter afetado a capacidade produtora de depósitos daquelas bactérias introduzidas pelo inóculo inicial;
- 2.º — o mesmo sal pode ter agido como bactericida, determinan-

do a morte das bactérias inoculadas. As variações de peso das "bengalas" seriam devidas a adesão de diferentes quantidades de restos celulares e componentes do meio de cultura.

- 3.º — Pode ter ocorrido um fator de erro, variável de 0 a 1,4 mg (valores extremos das leituras — figuras 3 e 4), constantemente presente nas pesagens, em vista da sensibilidade da balança. Isso envolveria a existência de um erro estatístico que, no entanto, seria comum aos demais aspectos analisados, não determinando, por conseguinte, uma mudança no quadro da significância estatística.

4.3. — Comparação com Resultados de Trabalhos Prévios.

Uma vez concluída a discussão da significação estatística dos resultados, resta compará-los com aqueles relatados em trabalhos prévios. Muito embora não seja possível fazer uma comparação direta, em vista das características diferentes com que os trabalhos foram realizados, comparações indiretas podem ser desenvolvidas.

Esta análise permite as seguintes observações em torno dos resultados desta pesquisa, comparativamente aos demais:

- 1.º — Em relação aos resultados relatados por Guggenheim, Fitzgerald e Genco, não há con-

traposição uma vez que foram analisados pontos mais extremos: — 1 ppm de flúor, certamente, também não afeta a atividade da dextranucrase e 904,97 ppm (0,2% de NaF) embora tenha inibido a formação de depósitos, não se pode afirmar que a ação tenha sido sobre a dextranucrase, sobretudo tendo presente o referido teste de viabilidade.

- 2.º — Em relação as afirmativas de Möller, os resultados foram obtidos em pHs diferentes. Para Möller 1 a 2 ppm inibem a síntese de polissacárides extracelulares a um pH ácido. Não foi verificada essa inibição em um pH neutro. Talvez o fator pH possa ter alguma influência nesse desenvolvimento.

- 3.º — Em relação aos resultados de Shern, há discordância em termos genéricos, uma vez que o fluoreto de sódio a 0,2% (904,97 ppm) determinou uma inibição altamente significativa na produção de depósitos.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

Nas condições em que foi realizado o presente experimento, levando-se em conta os resultados encontrados, é lícito concluir que:

- 1.º) — a adição de 1 ppm de flúor, na forma de fluoreto de sódio, às culturas de *Streptococcus mutans*, amostras AHT

e IB, não promove uma alteração estatisticamente significativa, ao nível de 1%, na formação de depósitos e

2.º) — a edição de 0,2% de fluoreto de sódio, às culturas de *Streptococcus mutans*, amstras AHT e IB, promove uma alteração, representada por uma redução, estatisticamente significativa ao nível de 1% na formação de depósitos.

A objetividade destas conclusões, obtidas a partir do experimento “in vitro”, nos leva a pensar que, possivelmente, “in vivo” possam ocorrer fatos semelhantes. Seguindo esta linha de raciocínio, o flúor adicionado as águas de abastecimento público (1 ppm) não chegaria a atuar sobre a placa dental. Por outro lado, 10,2% de fluoreto de sódio, utilizado na forma de bochechos, poderia, além de conferir maior resistência ao hospedeiro, agir também sobre a formação da placa dental. É importante salientar que esta inferência para a situação “in vivo”, necessita ser comprovada através de futuros trabalhos experimentais.

6. SIPNOSIS

The author investigated the action of sodium fluoride at the concentration of 9,2% and 1 ppm of flúor (respectively used as mouthrinses and added to water consumed by population, in dental caries prevention) “in vitro”, on dental plaque forming bacteria (*Streptococcus mutans*, samples AHT and IB). These concentrations were selected for the present study because its application does not require previous dental prophylaxis. Thus, any possible change in the deposit formation would be the result of the action caused by the chemical agent and not by any other external factor. The developed technique was based on the determination, by dry weight of the material placed over “STICKS” of stainless steel kept inside the culture medium, where the bacteria grew. The results did not show any statistically significant changes (at the level of 1%) when 1 ppm of fluor was added to the cultures. On the other hand, it was noticed a reduction statistically significant (at the level of 1%), in the deposit accumulated when it was added sodium fluoride at 0.2%.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CARLSSON, J. — presense of various types of non-hemolytic streptococci in dental plaque in other sites in the oral cavity in man. ODONTOL. REV., 18:55-74, 1967.
2. ————. — Zooglea-forming streptococci resembling streptococcus sanguis isolated from dental plaque in man. ODONTOL. REV., 16:348-58, 1965.
3. CHAVES, M.M. — *Odontologia sanitária*. Washington, Organização Panamericana da Saúde, 1962. p. 152-62.
4. FERRAZ, T. A. — *Pesquisa bibliográfica nas ciências biomédicas*. São Paulo, Fac. de Odontologia da Universidade de São Paulo, 1971. 90p.
5. FITZGERALD, R. J. & KEYES, P. H. — Demonstration on the etiologic role of streptococci in experimental caries in hamsters. J. AM. DENT. ASSOC., 61:9-19, 1960.
6. ————. — Plaque microbiology and caries. ALA. J. MED. SCI., 5:239-246, 1968.
7. ———— & JORDAN, H. V. — Polysaccharide-producing bacteria and caries. In: HARRIS, R. S. *Art and science of dental caries research*. New York, Academic Press, 1968. p. 79.
8. FRANCIS, M. D. & BRINER, W. W. — The development and regression of hypomineralized areas of rat molars. ARCH. ORAL. BIOL., 11:349-54, 1966.
9. GENCO, R. J. e alii — Dental research in microbiology with emphasis on periodontal disease. J. AM. DENT. ASSOC., 78:1016-36, 1969.
10. GIBBONS, R. J. & BANGHART, S. B. — Synthesis of extracellular dextran by cariogenic bacteria and its presence in human dental plaque. ARCH. ORAL. BIOL., 12:11-24, 1967.
11. GILLIS, R. E. — A preliminary report on the effect of sodium fluoride on the growth and glycolysis of lactobacillus casei 4646. J. DENT. RES., 33:659, 1954.
12. GUGGENHEIM, B. & SCHROEDER, H. E. — Biochemical and morphological aspects of extracellular polysaccharide produced by cariogenic streptococci. HELV. ODONTOL. ACTA., 11(2): 131-52, 1967.
13. HARDWICK, J. L. — The mechanism of fluorides in lessening susceptibility to dental caries. — BR. DENT. J., 114:222-28, 1963.
14. HOROWITZ; H. S. et alii — The effect on human dental caries of weekly oral rinsing with a sodium fluoride mouthwash. ARCH. ORAL. BIOL., 16(6):609-16, 1971.
15. INTERNATIONAL — Symposium on oral disease. ALA. J. MED. SCI., 5, 1968.
16. JENKINS, G. N. — A note on the possible mode of action of fluoride in dental caries. BR. DENT. J., 104:54-5, 1958.
17. ————. — The effect of fluoride on oral bacteria. J. DENT. RES., 39:1115, 1960.

18. —————. — Some effects of fluoride on the metabolism of salivary bacteria. *J. DENT. RES.*, 39:684, 1960.
19. —————. — The use of fluoride in prevention of dental caries. *BR. DENT. J.*, 114:137-42, 1963.
20. JENKIN, G. N. et alii — Fluoride and the metabolism of salivary bacteria. *HELV. ODONTOL. ACTA.*, 11(1):2-10, 1967.
21. —————. — The mechanism of action of fluoride in reducing caries incidence. *INT. DENT. J.*, 17:552-60, 1967.
22. —————. et alii — The distribution and metabolic effects of human plaque fluorine. *ARCH. ORAL. BIOL.*, 14:105-19, 1969.
23. JORDAN, H. V. & KEYES, P. H. — Aerobic, gram positive filamentous bacteria as etiologic agents of experimental periodontal disease in hamsters. *ARCH. ORAL. BIOL.*, 9:401-14, 1964.
24. —————. — In vitro methods for the study of plaque formation and carious lesions. *ARCH. ORAL. BIOL.*, 11:793-802, 1966.
25. JURGENSEN, C. A. & ARAÚJO, W. C. — Formação da placa bacteriana "In vitro". *ARQ. CENT. ESTUD. FAC. ODONTOL.*, 4:87-93, 1967.
26. KEYES, P. — Research in dental caries. *J. AM. DENT. ASSOC.*, 76:1357-73, 1968.
27. KONIG, K. G. — Diet and caries; cariogenic factors. *ALA. J. MED. SCI.*, 5:269-75, 1968
28. KRASSE, B. — Human streptococci and experimental caries in hamsters. *ARCH. ORAL. BIOL.*, 11:429-36, 1966.
29. LILIENTHAL, B. — Inhibition of acid formation from carbohydrates by stannous fluoride and stannous chlorofluoride. *AUST. DENT. J.*, 1:165-73, 1956.
30. LOURO Fº, P. P. et alii — Jarra FOPA de anaerobiose. *ARQ. CENT. ESTUD. FAC. ODONTOL.*, 2:215-27, 1965.
31. MANDEL, I. D. — Dental plaque: nature, formation and effects. *J. PERIODONTOL.*, 37:357-67, 1966.
32. McCABE et alii — An in vitro method for assessing the plaque forming ability of oral bacteria. *ARCH. ORAL. BIOL.*, 12:1653-56, 1967.
33. McCLURE, F. J. & HEWITT, W. L. — The relation on penicillin to induced rat dental caries and oral *L. acidophilus*. *J. DENT. RES.*, 25:441-43, 1946.
34. MOLAN, P. C. & HARTLES, R. L. — The differential effect of sodium fluoride on the aerobic metabolism of the human oral flora. *ARCH. ORAL. BIOL.*, 11:1163-170, 1966.
35. MOLLER, I. J. — El mecanismo de como actua el fluor en la prevención de la caries dentaria. *REV. ALAFO.*, 5:61-75, 1970.
36. OHLWEILLER, O. A. — Teoria e prática da análise quantitativa inorgânica. Brasília, Univ. de Brasília, 1968. v. 1| p. 86-95.

37. ORGANIZAÇÃO Panamericana de Saúde; Organização Mundial da Saúde e Fundação Kellogg — **Manual do curso sobre técnica de Fluoretação no abastecimento de águas**. Rio de Janeiro, Instituto de Engenharia Sanitária, Divisão de Treinamento e Divulgação, 1970. Cap. 13 p. 29-39.
38. ORLAND, F. J. et alii — Experimental caries in germfree rats inoculated with enterococci. *J. AM. DENT. ASSOC.*, 50:259-72, 1955.
39. SCHNEIDER SANTOS, J. O. et alii — Dextrano; determinação do peso seco (no prelo).
40. SHERN, R. et alii — Prevention of plaque formation by organic fluorides. *J. ORAL. MED.*, 25:93-97, 1970.
41. SIMS, W. — The effect of sodium fluoride on the rate of acid production of surface aggregates of Streptococci and Lactobacilli. *J. DENT. RES.*, 45:915-20, 1966.
42. SNEDECOR, G. W. & COCHRAN, W. C. — **Statistical methods** 6. ed. New York, McGraw-Hill, 1967. p. 432-36.
43. SPEIRS, R. L. — Factors influencing "maturation" of developmental hypomineralized areas the enamel of rat molars. *CARIES RES.*, 1:15-31, 1967.
44. VAN HOUTE, J. et alii — Iodophilic polysaccharide producing bacteria and dental caries in children consuming fluoridated and non-fluoridated drinking water. *CARIES RES.*, 3:178-89, 1969.
45. VIEGAS, A. R. — **Odontologia sanitária; aspectos preventivos da cárie dentária** São Paulo, Fac de Higiene e Saúde Pública 1961, 409 p.
46. VON DER FEHR, F. R. et alii — Experimental caries in man. *CARIES RES.*, 4:131-48, 1970.
47. WEISS, S. & KING, W. J. — Effect of sodium fluoride on polysaccharide synthesis in Streptococcus mitis. *J. DENT. RES.* 43:745-46, 1964.
48. WILLIAMS, R. A. — Glycolytic intermediates in "fluoride trained" and "control cultures" of an oral enterococcus. *ARCH. ORAL. BIOL.*, 14:265-70, 1969.
49. ZINNER, D. D. et alii — Experimental caries induced in animals streptococci of human origin. *PROC. SOC. EXP. BIOL. MED.* 118: 770-76, 1965.