

Influência da sacarose, lactose e glicose + frutose no potencial cariogênico de *S. mutans*: estudo *in situ* e *in vitro*

Influence of sucrose, lactose and glucose + fructose on the cariogenic potential of *S. mutans*: An *in situ* and *in vitro* study

Resumo

Objetivo: Este estudo determinou o efeito *in situ* de sacarose, lactose e glicose+frutose na colonização do esmalte por *S. mutans* e seu potencial cariogênico *in vitro*.

Metodologia: Doze voluntários participaram da etapa *in situ*, tipo duplo-cego, cruzada, em quatro etapas de 48 horas. Dispositivos palatinos contendo três blocos de esmalte bovino receberam uma gota de substrato 4 vezes/dia. O biofilme formado foi inoculado em meio de cultura Mitis-Salivarius-Bacitracina (MSB) para determinação do número de colônias (UFC). No experimento *in vitro*, os açúcares e *S. mutans* foram adicionados ao meio Brain-Heart-Infusion; o pH foi aferido após 6, 12, 24, 48 horas; o peso úmido do biofilme foi determinado e inoculado em MSB.

Resultados: Não houve diferença estatisticamente significativa na colonização pelos microorganismos no modelo *in situ*. No estudo *in vitro*, os meios contendo sacarose e lactose apresentaram maior número de colônias e de peso úmido de biofilme que glicose+frutose ($P<0,05$). O pH reduzido do meio foi mantido por maior período de tempo na presença de sacarose (48h/pH=4,4).

Conclusão: Embora não tenha havido diferença de colonização por *S. mutans* frente à sacarose e lactose neste delineamento *in situ*, o estudo *in vitro* mostrou potencial cariogênico distinto das soluções testadas.

Palavras-chave: Cárie dentária; adesão microbiana; *Streptococcus mutans*

Abstract

Purpose: This study evaluated the *in situ* effect of sucrose, lactose, and glucose+fructose on dental enamel colonization by *S. mutans* and its *in vitro* cariogenic potential.

Methods: Twelve volunteers participated in a crossover double-blind *in situ* study, comprising four 48-hour stages. Acrylic resin appliances with three bovine enamel blocks received a drop of experimental solution 4 times/day. The biofilm formed was inoculated in Mitis-Salivarius-Bacitracin (MSB) culture to determine the number of colonies (CFU). In the *in vitro* experiment, the solutions and *S. mutans* were added to the Brain-Heart-Infusion medium; the pH was measured after 6, 12, 24, and 48 hours; the biofilm-wet weight was determined and inoculated in MSB.

Results: There was no *in situ* effect of any solution on *S. mutans* colonization. The *in vitro* results showed that sucrose and lactose yielded larger number of colonies and biofilm wet-weight than glucose+fructose solution ($P<0.05$); sucrose samples sustained reduced pH values for a longer period of time (48 hours/pH=4.4).

Conclusion: Although there was no difference of *S. mutans* colonization under sucrose and lactose challenge *in situ*, the study *in vitro* showed different cariogenic potential of the tested solutions.

Key words: Dental caries; microbial adhesion; *Streptococcus mutans*

**Marcela Freire Borges^a
Aline Rogéria Freire de Castilho^b
Cássio Vicente Pereira^c**

^a Curso de Odontologia, Centro Universitário de Lavras, UNILAVRAS, Lavras, MG, Brasil

^b Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Odontopediatria, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, UNICAMP, Piracicaba, SP, Brasil

^c Departamento de Microbiologia e Imunologia, Centro Universitário de Lavras, UNILAVRAS, Lavras, MG, Brasil

Correspondência:

Aline Rogéria Freire de Castilho
Faculdade de Odontologia de Piracicaba/UNICAMP
Departamento de Odontologia Infantil
Av. Limeira, 901, Caixa Postal 52
Piracicaba, SP – Brasil
13414-903
E-mail: acastilho@fop.unicamp.br

Recebido: 19 de maio, 2008
Aceito: 11 de setembro, 2008

Introdução

Estudos anteriores têm relacionado os microrganismos colonizadores dos dentes ao início das lesões cáries (1,2), demonstrando a interação entre a necessidade prévia de formação do biofilme bacteriano e o início da patologia, que ainda é a mais frequente da cavidade bucal (3,4). Os estreptococos do grupo mutans estão intimamente associados à cárie dentária, devido à produção de ácidos e à capacidade de produzir polissacarídeos extracelulares. Estes polissacarídeos extracelulares são decorrentes do aproveitamento de energia quando da hidrólise principalmente da sacarose presente na dieta, e facilitam a adesão bacteriana às estruturas dentárias (5,6).

Resultados de experimentos em animais, desenvolvidos para avaliar a participação da dieta no processo cárie, ressaltaram a importância da sacarose como o carboidrato mais cariogênico em relação a outros açúcares (7,8). O início e a evolução da cárie dentária são determinados por uma interrelação parasita-hospedeiro influenciada por diversos fatores ambientais como a presença de nutrientes, principalmente os diferentes carboidratos encontrados na dieta, cujas demonstrações *in vitro* e *in situ* são provas da reprodutibilidade ou existência desse fenômeno *in vivo* (4,9).

Sendo assim, a presente pesquisa visou determinar por meio de um estudo *in situ* a ação de diferentes açúcares (sacarose, lactose, glicose+frutose) na colonização da superfície dentária por estreptococos do grupo mutans e o potencial cariogênico da espécie *S. mutans* frente aos mesmos açúcares por meio da determinação *in vitro* da produção de ácidos, biofilme bacteriano e do número de colônias.

Metodologia

1. Etapa *in situ*

Delineamento experimental

O estudo foi do tipo duplo-cego cruzado, consistindo de quatro grupos de tratamentos nos quais doze voluntários utilizaram dispositivos intra-orais contendo três blocos de esmalte bovino distribuídos aleatoriamente (10) em: Grupo I – sacarose 20%, 4 vezes/dia, Grupo II – lactose 20%, 4 vezes/dia, Grupo III – glicose (10%)+frutose (10%), 4 vezes/dia, e Grupo IV – controle (sem uso de açúcar). O período total de estudo compreendeu quatro (4) etapas de 48 horas com intervalos de mesmo tempo entre cada etapa. Em cada etapa participaram 12 voluntários, sendo três por tratamento, de tal forma que todos os voluntários foram submetidos a todos os tratamentos ao final dos cruzamentos.

Preparação dos blocos dentais e confecção dos dispositivos intra-orais

Foram utilizados dentes bovinos hígidos, sem defeito no esmalte, armazenados em solução de Timol a 0,1% (Merck, Darmstadt, Alemanha), por 30 dias para esterilização, a aproximadamente 4°C. Os dentes tiveram suas raízes e as

faces palatinas das coroas seccionadas com disco diamantado dupla face (Buehler UK LTD, Lake Bluff, IL, USA) em uma máquina de corte (Isomet 1000, Buehler LTD., Lake Bluff, IL, USA). A seguir, foram utilizados dois discos diamantados dupla-face, separados por espaçador de 4mm, para cortar o esmalte da face vestibular em blocos. Os cortes foram feitos sob refrigeração (água deionizada) para evitar trincas no esmalte. A espessura dos blocos foi conferida utilizando-se paquímetro digital (Starrett Indústria e Comércio Ltda., São Paulo, SP, Brasil). Em seguida os blocos foram polidos com pasta profilática (Dentsply, São Paulo, SP, Brasil) e pedrapomes (SS White, São Paulo, SP, Brasil) por 2min. Assim, foram obtidos 36 blocos de esmalte, os quais foram divididos aleatoriamente entre os voluntários em cada etapa.

Foi confeccionado um dispositivo intra-oral palatino para cada voluntário, nos quais foram preparadas três cavidades (3x3x2mm), sendo duas de cada lado na região de pré-molares e uma na região de molares, ao centro do palato, onde foram fixados os blocos dentais. Em seguida, uma tela plástica foi fixada sobre os blocos dentais deixando-se um espaço de 1mm entre o bloco e a tela para permitir o acúmulo de biofilme dental (10).

Fase experimental

Doze voluntários adultos com bom estado de saúde oral e geral participam deste estudo de acordo com as normas e aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Universitário de Lavras – Unilavras. Foram excluídos deste estudo indivíduos com aparelho ortodôntico fixo ou móvel e aqueles que fizeram uso de antibiótico nos últimos 3 meses ou no momento do estudo.

Os voluntários utilizaram os dispositivos intra-orais diariamente, inclusive para dormir, mantendo-os em ambiente úmido durante as refeições e a escovação habitual. Para simular a ação dos diferentes carboidratos (sacarose 20%, lactose 20% e frutose 10%+glicose 10%) (Labsynth, Diadema, SP, Brasil) na colonização microbiana do esmalte, os voluntários foram orientados, por escrito, a colocar uma gota de solução de sacarose 20%, lactose 20% ou frutose 10%+glicose 10%, aleatoriamente, sobre cada bloco de esmalte dentário às 8, 12, 16 e 20 horas. Após 5min o dispositivo foi recolocado na boca.

Após cada etapa do período experimental o biofilme bacteriano formado sobre os blocos de esmalte dentário foi coletado, diluído e inoculado em meio de cultura para posterior contagem do número de colônias (UFC/mg) do biofilme.

Fase laboratorial

Ao final de cada etapa do experimento as telas plásticas que recobriram os blocos de esmalte foram removidas com lâminas de bisturi nº 15 e o biofilme bacteriano formado sobre os blocos foi coletado com uma espátula plástica de ponta fina, sendo imediatamente transferido para tubos de Eppendorf, diluídos em séries decimais de 10^{-1} a 10^{-4} em água esterilizada, agitados e plaqueados em meio de cultura MSB (Mitis Salivarius Bacitracina) (Difco, São Paulo, SP,

Brasil) para cultivo de estreptococos do grupo mutans. Após a inoculação, as placas de petri contendo o meio de cultura foram incubadas por 48h a 37°C em estufa bacteriológica (Marconi Equipamentos para Laboratório Ltda., Piracicaba, SP, Brasil) sob a concentração gasosa de 10% de CO₂. Após 48 horas, as placas foram submetidas à contagem do número total de colônias (Contador de Colônias Phoenix – UFC/mg de biofilme), permitindo a determinação o efeito dos diferentes carboidratos (sacarose 20%, lactose 20% e frutose 10%+glicose 10%) na colonização da superfície do esmalte dentário *in situ*.

2. Etapa *in vitro*

Preparação dos meios de cultura

Cada tubo de vidro foi preparado com 5mL de solução de BHI (Brain-Heart-Infusion) (Difco, São Paulo, SP, Brasil) acrescido do respectivo açúcar (sacarose 20%, lactose 20% ou frutose 10%+glicose 10%) (Labsynth, Diadema, SP, Brasil) e um bastão-capilar em forma de bengala (Laborglass, São Paulo, SP, Brasil) pré-pesado em balança de alta precisão (BEL Engineering, São Paulo, SP, Brasil) (11). Os tubos foram esterilizados em autoclave e inoculados com alíquotas de 100µL de cultura de cepas padrão de *S. mutans* (32K), pertencentes ao acervo de microrganismos do Laboratório de Microbiologia e Imunologia Oral da Unilavras, padronizados pelo tubo 2 da escala de Mc Farland (equivalente a 1-2x10⁸ UFC), sendo então incubados por 48h a 37°C em estufa bacteriológica (Marconi Equipamentos para Laboratório Ltda., Piracicaba, SP, Brasil) sob concentração 10% de CO₂.

Determinação da produção de ácidos

Para a determinação da capacidade de produção de ácido pelas amostras, foram utilizadas medições contínuas, em intervalos de tempo regulares, do pH do meio de cultura (medidor de pH Modelo PH 300M, Analyser Com. e Ind. Ltda, São Paulo, SP, Brasil). As medições foram realizadas em intervalos de tempo pré-estabelecidos, modificados a partir de alguns padrões encontrados na literatura (11), sendo a primeira medição no momento da inoculação (zero hora) e as seguintes em 6, 12, 24 e 48 horas, de modo que o período total de incubação foi dividido em períodos regulares e crescentes, possibilitando uma avaliação das quedas de pH durante todo o período de crescimento das amostras microbianas. Os dados foram analisados por regressão linear.

Pesagem do biofilme úmido

Após 48h os tubos foram retirados da estufa e o bastão-capilar foi novamente pesado em balança de alta precisão para quantificar o biofilme formado *in vitro*.

Diluição e inoculação do biofilme

Após o bastão de vidro ser pesado, este foi colocado num tubo de ensaio contendo 40mL de água destilada esterilizada e agitado; as soluções foram colocadas em placas contendo meio de cultura MSB para cultivo de estreptococos do grupo

mutans. Após a inoculação, as placas foram incubadas por 48h a 37°C em estufa bacteriológica sob concentração gasosa de 10% de CO₂, para posterior contagem do número de colônias aderidas ao bastão-capilar (UFC/mg do biofilme *in vitro*).

Os dados foram analisados por ANOVA e teste de Tukey, ao nível de significância de 5%.

Resultados

Na Tabela 1 estão expressos os valores médios da produção do número de colônias (UFC/mg do biofilme) de estreptococos do grupo mutans aderidas aos blocos dentais. Na etapa *in situ*, não houve diferença estatisticamente significativa do número de colônias (UFC/mg do biofilme) de estreptococos do grupo mutans cultivados em meio acrescido de sacarose, lactose, glicose+frutose e controle. Na etapa *in vitro*, os meios contendo sacarose e lactose apresentaram maior número de colônias e de peso úmido de biofilme que glicose+frutose ($P<0,05$).

Tabela 1. Valores médios da produção do número de colônias (UFC/mg biofilme) de estreptococos do grupo *mutans* nos diferentes substratos, nas etapas *in situ* e *in vitro*.

Etapa	Substrato	Médias (UFC/mg placa)*
<i>In situ</i>	Sacarose (20%)	1,0x10 ⁶ ^a
	Lactose (20%)	1,3x10 ⁶ ^a
	Glicose (10%) + Frutose (10%)	0,7x10 ⁶ ^a
	Controle	0,8x10 ⁶ ^a
<i>In vitro</i>	Sacarose (20%)	2,8x10 ⁶ ^a
	Lactose (20%)	2,6x10 ⁶ ^a
	Glicose (10%) + Frutose (10%)	1,5x10 ⁶ ^b

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($P<0,05$).

A Tabela 2 demonstra os valores encontrados nas medições de pH do meio de cultura, onde foram cultivadas as amostras de estreptococos grupo mutans, em intervalos de tempo crescentes nos diferentes substratos, de acordo com a avaliação estatística de regressão. A sacarose foi o substrato que apresentou maior queda de pH nos intervalos de tempo inicial e final, seguida da lactose e glicose+frutose.

Tabela 2. Valores médios de pH, em intervalos de tempo crescentes das amostras de estreptococos do grupo mutans nos diferentes substratos.

Substrato	0 hora	6 horas	12 horas	24 horas	48 horas
Sacarose	7,0	5,9	5,5	5,4	4,4
Lactose	7,0	6,0	6,0	5,5	4,5
Frutose+glicose	7,0	6,2	5,3	5,9	5,6

Em relação aos resultados peso úmido do biofilme *in vitro* (Tabela 3), uma maior quantidade de biofilme foi formada quando da exposição à sacarose, seguida da lactose, com diferença estatisticamente significativa em relação à glicose+frutose.

Tabela 3. Média dos pesos do biofilme, por bastão capilar, em função dos tratamentos.

Substrato	Médias (mg)
Sacarose (20%)	52,8 ^a
Lactose (20%)	44,1 ^a
Glicose (10%)+Frutose (10%)	20,6 ^b

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($P < 0,05$).

Discussão

O desenvolvimento da cárie é um processo extremamente complexo e dinâmico, que envolve muitos fatores de inter-relacionamento na formação do biofilme sobre as superfícies do esmalte como as interações bacterianas com a superfície dental e entre si, as mudanças ecológicas provocadas pela dieta, os aspectos físico-químicos inerentes ao processo e a composição e propriedades da matriz do biofilme. A adesão dos estreptococos do grupo mutans às superfícies dentárias tem sido estudada desde que o seu isolamento na cavidade bucal foi correlacionado com a cárie dentária (11-16).

Os resultados do presente trabalho mostram que o biofilme formado *in situ* na presença de lactose apresentou maior valor médio do número de colônias de estreptococos do grupo mutans, seguida da sacarose, grupo controle e dos monossacarídeos associados da sacarose (glicose+frutose). Esses resultados discordam de achados anteriores em que a sacarose foi o substrato que mais favoreceu a proliferação dos estreptococos do grupo mutans, sendo, portanto, com maior potencial cariogênico (17). Por outro lado, os resultados obtidos concordam com diversos estudos prévios (10,12,18) ao demonstrar o baixo potencial cariogênico dos monossacarídeos (glicose+frutose). Segundo Ostrom e Koulourides (19), estes fatores de variação de resposta podem ser característicos de cada indivíduo, dependendo de sua higiene e dieta e diferenças ecológicas em cada paciente podem ocorrer (20,21). A formação do biofilme bacteriano *in vitro*, através da utilização de bastões-capilares ou lamínulas, mergulhados em meio sacarado, mostrou ser um recurso importante como modelo experimental para estudar a capacidade de adesão de microrganismos às superfícies lisas, como fator de virulência (11). A observação do crescimento bacteriano aderente ao bastão-capilar em meio de cultura acrescido dos diferentes substratos foi realizada objetivando-se o melhor entendimento do desenvolvimento do biofilme dentário *in vitro*, visualizado através dos depósitos bacterianos, à semelhança de modelos já descritos (22). Confirmando os achados de Jürgensen e Araújo (22) e de Cury *et al.* (10),

os resultados obtidos *in vitro* demonstraram que a sacarose demonstrou maior média de número de colônias, seguida da lactose e da glicose+frutose. A sacarose e a lactose não apresentaram diferença estatística significativa, ao contrário de Jordan e Keyes (3), que utilizaram metodologia similar, mas em concentrações de substratos bem inferiores aos testados neste estudo. Já a pequena influência da glicose+frutose na formação de biofilme bacteriano *in vitro* também foi relatada anteriormente (12).

Diversos estudos demonstraram uma correlação positiva entre dieta, microrganismos e aumento dos índices de cárie, com um aumento inicial da formação de biofilme (12,23). A maior quantidade de biofilme formado na presença de sacarose pode ser explicada pela síntese de polissacarídeos extracelulares decorrentes da variação de energia livre da hidrólise da sacarose pela ação de glicosiltransferases (24). Na presente pesquisa, a combinação glicose+frutose foi o substrato que apresentou menor peso úmido do biofilme a exemplo de estudos anteriores (3,22). Além disso, parece haver pelo menos quatro diferentes formas de transporte de sacarose que facilitam o metabolismo desse açúcar pelo *S. mutans*, favorecendo a nutrição e patogenicidade desses microrganismos e aumentando, portanto, a formação de biofilme (25).

Jordan e Keyes (3) citam a lactose como não indutora de formação de biofilme, diferindo da presente pesquisa *in vitro* onde a formação do biofilme foi maior para sacarose, seguida da lactose. É possível que fatores locais do ambiente *in vivo*, envolvam mecanismos mais complexos de interação microbiana com o hospedeiro na presença dos substratos que podem não ser detectados *in vitro*. Além disso, a forma de apresentação do substrato no meio de cultura também pode influenciar na formação de biofilme bacteriano. Quanto à capacidade *in vitro* dos estreptococos do grupo mutans na produção de ácidos frente aos diferentes açúcares, a sacarose apresentou-se potencialmente mais cariogênica em razão da maior redução do pH do meio ao longo do período de incubação, seguido pelo meio acrescido de lactose. Esses resultados colaboram com estudos que demonstram por meio de metodologias semelhantes o maior potencial cariogênico da sacarose em relação aos demais substratos (3,22).

A análise global dos resultados mostra maior potencial cariogênico *in vitro* do biofilme na presença de sacarose e lactose em relação à glicose+frutose, não obstante os resultados negativos do estudo *in situ*. Assim, pesquisas adicionais são necessárias para confirmar esta tendência do fenômeno biológico *in vivo* e com outros protocolos de desafio cariogênico tanto em esmalte quanto em dentina.

Conclusões

Embora os açúcares sacarose 20%, lactose 20% e glicose 10%+frutose 10% não tenham influenciado a colonização da superfície de esmalte por estreptococos do grupo mutans *in situ*, os meios de cultura com sacarose 20% ou lactose 20% apresentaram maior produção de biofilme *in vitro*. Além disso, o acréscimo de açúcares aos meios de cultura

favoreceu quedas acentuadas de pH no biofilme em função da produção de ácidos pelos *S. mutans*, indicando a relação açúcar-dependente dos microrganismos cariogênicos.

Referências

1. Ahmady K, Marsh PD, Newman HN, Bulman JS. Distribution of *S. mutans* and *S. sobrinus* at sub sites in human approximal dental plaque. *Caries Res* 1993; 27:135-9.
2. Borden LW, Ostrom CA, Konlonrides T. Establishment of potentially cariogenic in an experimental human plaque: *Streptococcus mutans*. *J Dent Res* 1980;59:588-93.
3. Jordan HV, Keyes PH. In vitro methods for the study of plaque formation and carious lesions. *Arch Oral Biol* 1966;11:793-802.
4. Olsson J, van der Heijde Y, Holmberg K. Plaque formation in vivo and bacterial attachment in vitro on permanently hydrophobic and hydrophilic surfaces. *Caries Res* 1992;26:428-33.
5. Donoghue HD, Perrons CJ. Effect of nutrients on defined bacterial plaques and *Streptococcus* C67-1 implantation in a model mouth. *Caries Res* 1991;25:108-15.
6. Wennerholm K, Birkhed D, Emilson CG. Effects of sugar restriction on *Streptococcus sobrinus* in saliva and dental plaque. *Caries Res* 1995;29:54-61.
7. Vacca-Smith AM, Van Wuyckhuysse BC, Tabak LA, Bowen WH. The effect of milk and casein proteins on the adherence of *Streptococcus mutans* to saliva-coated hydroxyapatite. *Arch Oral Biol* 1994; 39:1063-9.
8. Vacca-Smith AM, Bowen WH. The effect of milk and kappa casein on streptococcal glucosyltransferase. *Caries Res* 1995;29: 498-506.
9. Bowen WH, Pearson SK, VanWuyckhuysse BC, Tabak LA. Influence of milk, lactose-reduced milk, and lactose on caries in desalivated rats. *Caries Res* 1991;25:283-6.
10. Cury JA, Rebello MA, Del Bel Cury AA. In situ relationship between sucrose exposure and the composition of dental plaque. *Caries Res* 1997;31:356-60.
11. Pereira CV, Rosa EA, Spolidorio DM, Höfling JF. Formation of in vitro bacterial plaque, extracellular polysaccharides and acid production by mutans streptococci from the oral cavity. *Revista da Confederação Odontológica latino-americana/FOLA ORAL* 2000;VI:34-40.
12. Edwardsson S, Krasse B. Human streptococci and caries in hamsters fed diets with sucrose or glucose. *Arch Oral Biol* 1967;12:1015-16.
13. Rosan B, Lamont RJ. Dental plaque formation. *Microbes Infect* 2000;2:1599-607.
14. Paes Leme AF, Koo H, Bellato CM, Bedi G, Cury JA. The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation - new insight. *J Dent Res* 2006;85:878-87.
15. Tenuta LM, Del Bel Cury AA, Bortolin MC, Vogel GL, Cury JA. Ca, Pi, and F in the fluid of biofilm formed under sucrose. *J Dent Res* 2006;85:834-8.
16. Shimotoyodome A, Kobayashi H, Tokimitsu I, Hase T, Inoue T, Matsukubo T, et al. Saliva-promoted adhesion of *Streptococcus mutans* MT8148 associates with dental plaque and caries experience. *Caries Res* 2007;41:212-8.
17. Brudevold F, Techrani A, Attazardeh F, van Houte J, Russo J. Enamel demineralization potential of dietary carbohydrates. *J Dent Res* 1983;62:1218-20.
18. DuBois LM, Lolkus LJ, Hunter JS, Jackson TR, Hodges RE. A comparison between the effects of sucrose and fructose intake on early formation. *Clin Prev Dent*; 1984;6:6-8.
19. Ostrom CA, Koulourides T. The intraoral cariogenicity test in young subjects. *Caries Res* 1976; 10:442-52.
20. Minah GE, Lovekin GB, Finney JP. Sucrose-induced ecological response of experimental dental plaques from caries-free and caries-susceptible Human volunteers. *Infect Immun* 1981;34:662-75.
21. Nyvad B, Fejerskov O. Structure of dental plaque and the plaque-enamel interface in human experimental caries. *Caries Res* 1989; 23:151-8.
22. Jürgensen CA, Araujo WC. Formação de placa bacteriana in vitro. *Arq Cent Est Fac Odontol* 1967;4:87-93.
23. Brex M, Theilade J, Attström R. Ultrastructural estimation of the effect of sucrose and glucose rinses on early dental plaque formed on plastic films. *Scand J Dent Res* 1981;89:157-64.
24. Hotz P, Guggenheim B, Schmid R. Carbohydrates in pooled dental plaque. *Caries Res* 1972; 6:103-21.
25. Kilic AO, Honeyman AL, Tao L. Overlapping substrate specificity for sucrose and maltose of two binding protein-dependent sugar uptake systems in *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiol Lett* 2007;266:218-23.