

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

GIOVANA DANIELA PECHARKI
CIRURGIÃ-DENTISTA

**“EFEITO DA SACAROSE CONTENDO FERRO CO-CRISTALIZADO NO
BIOFILME DENTAL E NA DESMINERALIZAÇÃO DO ESMALTE”**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do título de Mestre em Odontologia – Área de Cariologia.

PIRACICABA

2003

GIOVANA DANIELA PECHARKI
CIRURGIÃ-DENTISTA

**“EFEITO DA SACAROSE CONTENDO FERRO CO-CRISTALIZADO NO
BIOFILME DENTAL E NA DESMINERALIZAÇÃO DO ESMALTE”**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do título de Mestre em Odontologia – Área de Cariologia.

Orientador: Prof. Dr. Jaime Aparecido Cury

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Jaime Aparecido Cury

Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen

Prof. Dr. Sérgio Roberto Vieira

PIRACICABA

2003

Ficha Catalográfica

P332e	Pecharki, Giovana Daniela. Efeito da sacarose contendo ferro co-cristalizado no biofilme dental e na desmineralização do esmalte. / Giovana Daniela Pecharki.. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2003. xv, 49f. : il. Orientador : Prof. Dr. Jaime Aparecido Cury. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba. 1. <i>Streptococcus mutans</i>. 2. Cáries dentárias. 3. Açúcar. 4. Sulfato ferroso. I. Cury, Jaime Aparecido. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.
-------	--

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marilene Girello CRB/8–6159, da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP.



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



A Deus, que sempre me guia e me permitiu chegar até aqui. Obrigada por todas as graças que me dá diariamente. Que cada batida do meu coração renove este agradecimento que eu dirijo a ti, Senhor.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de MESTRADO, em sessão pública realizada em 15 de Dezembro de 2003, considerou a candidata GIOVANA DANIELA PECHARKI aprovada.

1. Prof. Dr. JAIME APARECIDO CURY

2. Prof. Dr. SÉRGIO ROBERTO VIEIRA

3. Prof. Dr. PEDRO LUIZ ROSALEN

DEDICATÓRIA

À **Deus**, que sempre me guia e me permitiu chegar até aqui. Obrigada por todas as graças que me dá diariamente. Que cada batida do meu coração renove este agradecimento que eu dirijo a ti, Senhor.

Aos meus excelentes pais, **Sônia** e **Daniel**, meus grandes amores, meus grandes ídolos, que sempre me cercaram de carinho, atenção e bons princípios, sempre estiveram presentes, dando apoio e incentivo às minhas decisões. Com vocês aprendi a ser acima de tudo humana, a ir em busca das minhas realizações com entusiasmo e humildade, a saber enfrentar as dificuldades não deixando que elas endureçam meu coração e sim o fortaleçam. Sinto que Deus foi muito generoso comigo quando me colocou na vida de vocês; é muito gratificante saber que tenho em meu pai e minha mãe os melhores exemplos de grandeza de espírito. Amo imensamente vocês e sei que vocês também me amam muito!

À minha querida irmã **Daniele**, minha segunda mãezinha e minha melhor amiga, que desde pequena ajudou a me criar e cuidar de mim com muito amor e que sempre torce e vibra com as minhas conquistas e minha felicidade. Saiba que meu amor por você é muito, muito forte. Sua felicidade é a minha também. Tenho muito orgulho das realizações que tem alcançado. A distância realmente dói bastante, mas me conforta saber que você está ao lado do seu incrível marido Rafael. Vocês serão pais maravilhosos e terão filhos maravilhosos que irei paparicar, brincar e amar muito.

DEDICATÓRIA

À minha irmãzinha **Polianna**, filha do meu pai e da sua querida esposa Adriana, agradeço por tornar minha vida mais alegre e divertida e por me fazer sentir importante. Adoro seu jeito esperto e autêntico de ser; você é o xodózinho meu e da Dani. Te amo muito e torço para que sempre tenha uma vida repleta de vitórias construídas com bondade e felicidade no coração.

Aos queridos amigos, **Maristela, Tatiana, Gustavo, Cristiana, Alexandre, Luciano, Fernanda, Wander, Regiane, Priscila, Andréa, Maria Isabela, Luciana, Juliana e Marcelo**, voluntários da pesquisa, que se dedicaram até o fim; sem vocês esse trabalho não seria bem concretizado.

Agradecimentos aos professores e instituições

Ao meu orientador **Prof. Dr. Jaime Aparecido Cury**, exemplo de seriedade e profunda devoção à Ciência, agradeço por participar ativamente de todas as etapas deste trabalho, dignificando a palavra “Orientador”, por todas as oportunidades concedidas, por auxiliar de forma valiosa meu desenvolvimento intelectual e por me tornar uma pessoa mais forte.

À **Profa. Dra. Cíntia Pereira Machado Tabchoury**, referencial de organização e desvelo, agradeço pela importante colaboração a este trabalho e pela contínua disposição em me atender.

Ao **Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen**, ser humano admirável, professor e pesquisador exemplares, agradeço pelo auxílio e pelos muitos ensinamentos.

À **Profa. Dra. Altair Antoninha Del Bel Cury**, Representante da Área de Odontologia junto à CAPES e Assessora da Pró-Reitoria de Pós-Graduação da UNICAMP, agradeço pela valiosa ajuda na realização deste trabalho.

À Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), por meio do seu Magnífico Reitor, **Prof. Dr. Carlos Henrique de Brito Cruz**.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, na pessoa de seu Diretor, **Prof. Dr. Thales de Mattos Rocha Filho**.

Ao Coordenador Geral dos Cursos de Pós-Graduação, **Prof. Dr. Lourenço Corrêa Sobrinho** e à Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, **Profa. Dra. Maria Cristina Volpato**.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - **CAPES**, pela concessão de bolsa nos seis meses iniciais do mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo - **FAPESP**, pela bolsa que me foi concedida a partir de setembro de 2002 e pelo apoio financeiro para a execução da pesquisa (Proc. 01/11759-0).

À Fundação de Desenvolvimento da UNICAMP – **FUNCAMP** (Conv. 219) pelo auxílio financeiro para aquisição de materiais referentes a esse trabalho.

Ao **Prof. Dr. Marcelo Corrêa Alves**, Analista de Sistemas da ESALQ-USP, pela realização da análise estatística desse estudo, pela competência e por estar sempre acessível para solucionar minhas dúvidas.

Aos professores componentes da minha banca de Pré-Qualificação: **Prof. Dr. Jaime Aparecido Cury, Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen e Profa. Dra. Cíntia Pereira Machado Tabchoury**, pelas contribuições dadas ao meu projeto de pesquisa.

Aos professores componentes da minha banca de Qualificação: **Profa. Dra. Altair Antoninha Del Bel Cury, Profa. Dra. Cíntia Pereira Machado Tabchoury e Profa. Dra. Renata Matos-Granner**, pelas sugestões dadas à minha dissertação.

Aos professores da FOP - UNICAMP, **Fernanda Klein, Maria da Luz, Antônio Pereira, Marcelo Meneghim, Renata Matos-Granner e Sérgio Line** pelo estímulo, atenção, ensinamentos e carinho.

À Universidade Federal do Paraná - **UFPR**, pela minha formação acadêmica.

Aos meus professores da UFPR **Silvio G., Marilene B., Elizabeth G., Aguinaldo F., José Vítor M., Fabian F., Renato G., Beatriz F., Neusa M., Bóros, Sônia V. e Marcus André V.** pelo apoio e amizade.

Agradecimento aos parentes e amigos

Além de dedicar este trabalho à *Deus* e minha família (meus pais, *Sônia* e *Daniel* e minhas irmãs, *Dani* e *Poli*), também gostaria de agradecer a eles com todo meu coração e com toda a minha alma por tudo que eles representam na minha vida e por tudo que sempre fazem por mim. Sem eles, com certeza, eu não teria chegado aonde cheguei. Eles são o motivo pelo qual me sinto feliz todos os dias.

Às minhas adoráveis e maravilhosas tias-irmãs *Mary* e *Nilza* e meus super primos *Rayana* e *Leonardo*, que sempre estiveram ao meu lado torcendo por mim e sempre me fizeram sentir bem aconchegada. Amo muito vocês!

À minha querida vózinha materna *Erna*, meus queridos tios *Paulo*, *Alexandro*, *Sueli* e minha linda prima *Ana Paula* pelo intenso apoio, amor e carinho. Sempre amarei vocês!

Ao meu admirável cunhado *Rafael*, exemplo puro de pessoa esforçada e vencedora, agradeço muito por ser para mim o irmão homem que não tive e que gostaria de ter e por fazer minha irmã *Daniele* tão feliz.

Ao meu lindo e amado afilhado *Pedro Henrique*, por dar mais luz à minha vida e à sua família por ter me dado esse grande presente.

Aos meus queridos parentes maternos, *Márcia P.L.*, *Dague*, *Gissele*, *Renate*, *Isabelle*, *Guilherme*, *Fábio*, *Giovane*, *Rodrigo*, *Brunilde*, *Guiomar*, *Marcos Felipe*, *Hanelise*, *Karen*, *Marco Pólo*, *Tânia*, *Vítor*, *Marcelo*, *Márcia P.*, *Valdir*, *Luísa*, *Lorena*, *Margareth*, *Jéferson*, *Jakson*, *Ivete*, *João*, *Sueli*, *Dório*, *Márcia*, *Rogério*, *Anita*, *Jhony*, *Eliane* e *Mara* por sempre acreditarem em mim e pela agradável e alegre convivência.

Aos meus queridos tios paternos *Linda, Elis, Landa, Silvio, Paulo, Eliane, Marília, Jane, Adilson, Marcos, Daniel T.*, e primos, *Vinícius (fofinho), Elaine, Jô, Marquinhos, Karine, Alan, Geovani, Givago, Yuri e Junior* pelo estímulo e por serem sempre tão amáveis comigo.

À querida *Adriana*, esposa do meu pai e mãe da minha irmãzinha Polianna pelo apoio e pelo carinho com que sempre me tratou.

Aos queridos tios-amigos *Massakatu, Maria, Regina, Oswaldo* e famílias pelo afeto, incentivo e enorme solidariedade.

À minha grande amiga *Maristela M. Lobo* (Tequinha), pessoa simplesmente incrível, maravilhosa e que eu admiro muito, agradeço por ser nesses dois anos de convívio a amiga de todas as horas, de todos os dias e que, com certeza, será a amiga de todos os anos da minha vida.

À irradiante amiga *Cris Tengan*, por ser sempre tão zelosa comigo e por tornar meus dias em Piracicaba muito mais alegres. Você é realmente especial para mim!

À amigona *Mitsue Hayacibara*, minha anjinha e conselheira, cuja presença transmite muita paz e luz, agradeço por tudo que fez por mim (e são tantas coisas...). Saúde sempre!

À querida *Lívia Tenuta*, símbolo de competência e liderança, agradeço de coração pelas imensas ajudas e por toda a atenção e preocupação que sempre teve comigo; adoro muito você.

À amiga *Adriana F. Paes Leme*, exemplo de dedicação, agradeço muito pelo carinho, incentivo e grande apoio que me deu desde a fase de planejamento deste meu trabalho até sua concretização.

À *Mariza Soares*, pessoa pela qual eu tenho um profundo carinho e admiração, sempre tão prestativa, dedicada e competente, agradeço pelo enorme auxílio e doçura.

À fofíssima e queridíssima *Cecília Ribeiro de Almeida*, por compartilhar comigo vários momentos aqui em Piracicaba, pelos conselhos e carinho. Você estará para sempre em minha memória.

À super *Carol Aires*, pessoa que encanta a todos, agradeço pela prestatividade, incentivo constante e grande força que me deu em várias ocasiões.

Ao amigo *Celso Queiroz*, por sempre estar disposto a ajudar e explicar e pelos inúmeros momentos de risadas e descontração.

À *Ynarinha Arsati*, por sempre me dar estímulo e por sempre ser tão gentil e generosa.

À *Nilza Gonçalves* (Nilzete) pelo apoio e pelo convívio sempre repleto de bom astral.

Ao *Alfredo-Fofão*, meu alegre amigo, agradeço pela ajuda e por atender sempre com boa vontade aos meus recados e solicitações.

Aos meus enormes amigos *Elaine T., Tatiana C., Gustavo G., Luciano P., Alexandre E.S., Silvia C., Fernanda F., Wander S., Regiane Y., Priscila S., Fábio B., Beth T., Débora S., Giovana T., Ramiro M., Lidiany A., Ana Paula T., Andréa A., Iriana Z., Viviane G., Magda G., Simone D., Lívia G., Lílian R., Luciane Z., Vanessa P., Maria Isabela C., Marcelo N. e Juliana C.* pela amizade que levarei para sempre em meu coração, pela ótima companhia, incentivo e por me proporcionarem vários momentos adoráveis e felizes.

Aos amigos *Rodrigo, Gustavo, Renato, Lília, Daniela e Vanessa* e Anderson pela ótima convivência no laboratório de Bioquímica.

Às queridas *Eliza e Eliane* (Farmacologia), *D. Jose* (Prótese), *Feliciano, Eriquinha e Eliete* (Fisiologia), *Cida* (Telefonia), *Érica e Sônia* (Secretaria de Pós-Graduação), *Marilene e Helóisa* (Biblioteca) minha gratidão pela boa vontade, atenção, paciência e ajuda.

Ao *Dario*, doutorando CENA-USP, pela disponibilidade e pelas valiosas informações sobre preparo de curva de calibração de ferro.

Aos funcionários *William, Marcelo, Danilo e Marcus* (Portaria FOP-UNICAMP) pela paciência e segurança em várias madrugadas e fins de semana no laboratório.

Às minhas grandes e eternas amigas *Tati, Pri, Amandinha, Dani M., Sabrina, Ida, Ivana, Cláudia, Camila, Bi, Paula e Gaby* agradeço pela grande torcida e pela valiosíssima amizade.

Aos amigos *Ricardo, Val, Alessandra A., Paulo Guilherme, Ale Bona, Bruno, Bia, Michele, Kika, Pedro e Alexandre* pelo carinho e pelas palavras de incentivo.

A todos os meus *colegas de faculdade da UFPR*, por terem me incentivado a fazer mestrado e por tornar o tempo de graduação inesquecível.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Agradecimento aos que partiram dessa vida...

Aos meus queridos avós que infelizmente já partiram, *Waldemar, Daniel e Noemia (in memoriam)*, por me inspirarem a ser uma pessoa batalhadora, digna e boa para com os outros e por olharem sempre por mim. Amarei vocês eternamente. Saudades...

Ao tio *Vítor*, um exemplo para mim que partiu muito cedo para brilhar lá em cima...

Aos tios *Edil, Valmor, Nadir, Síría e Conrado*, nunca esquecerei de vocês...

Muitas vezes as pessoas são egocêntricas,
ilógicas e insensatas.

Perdoe-as assim mesmo.

Se você é gentil, as pessoas podem acusá-lo
de dissimulado, interesseiro.

Seja gentil assim mesmo.

Se você é um vencedor, terá alguns falsos
amigos e alguns inimigos verdadeiros.

Vença assim mesmo.

Se você é honesto e franco, as pessoas
podem enganá-lo.

Seja honesto e franco assim mesmo.

O que você levou anos para construir, alguém
pode destruir de uma hora para outra.

Construa assim mesmo.

Se você tem paz e é feliz, as pessoas podem
sentir inveja. Seja feliz assim mesmo.

O bem que você faz hoje pode ser esquecido
amanhã. Faça o bem assim mesmo.

Dê ao mundo o melhor de você, mas isso
pode nunca ser o bastante. Dê o melhor de
você assim mesmo.

Veja você que, no final das contas, é entre
você e Deus. Nunca foi entre você e as outras
pessoas.

Madre Teresa de Calcutá

SUMÁRIO

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUÇÃO.....	3
2. CAPÍTULO.....	8
3. CONCLUSÃO.....	29
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30
ANEXOS.....	35

RESUMO

Estudos anteriores realizados com animais de laboratório mostraram que sacarose contendo ferro co-cristalizado (Fe-sacarose) é menos cariogênica que o açúcar puro. Entretanto, o efeito do Fe-sacarose no desenvolvimento da cárie dental em humanos é desconhecido. Assim, o objetivo deste estudo cruzado foi avaliar *in situ* o efeito de Fe co-cristalizado a sacarose na acidogenicidade, composição microbiológica e bioquímica do biofilme dental, e na desmineralização do esmalte. Dezesseis voluntários utilizaram, durante duas fases de 14 dias, dispositivos palatinos contendo blocos de esmalte humano os quais foram submetidos a 4 grupos de tratamentos: T1- Água destilada e deionizada (controle negativo); T2- Solução de sacarose a 20% (controle positivo) e grupos experimentais T3 e T4 tratados com soluções de sacarose a 20% contendo 18 e 70 µg Fe/mL, respectivamente. As soluções de Fe-sacarose foram preparadas diariamente a partir de sacarose contendo sulfato ferroso co-cristalizado. Os tratamentos foram realizados 8x/dia através de gotejamento das soluções sobre os blocos e dentifrício fluoretado foi utilizado 3x/dia. Após cada fase, o biofilme dental formado sobre o esmalte foi analisado com relação à acidogenicidade, composição microbiológica e bioquímica; no esmalte foram determinadas a porcentagem de perda de dureza de superfície e a área de lesão de cárie. Foi encontrada menor desmineralização no esmalte submetido à Fe-sacarose (70 µg Fe/mL) do que no tratado com sacarose ($p < 0,05$). Esta concentração de Fe também reduziu a contagem de estreptococos do grupo mutans (EGM) no biofilme formado. Concluiu-se que o ferro co-cristalizado a sacarose reduz *in situ* o potencial cariogênico deste açúcar e o efeito parece estar relacionado à redução de EGM no biofilme dental formado.

ABSTRACT

Previous studies using laboratory animals have shown that sucrose with iron co-crystallized (Fe-sucrose) is less cariogenic than the pure sugar. However, the effect of Fe-sucrose on human caries development is unknown. Thus, the aim of this crossover study was to evaluate *in situ* the effect of iron co-crystallized with sucrose on the acidogenicity, microbiological and biochemical composition of dental biofilm and enamel demineralization. Sixteen volunteers, wearing palatal appliances containing human enamel blocks, took part in this study conducted in two phases of 14 days. The treatments/groups were: T1- Distilled and deionized water (DDW, negative control), T2- 20% sucrose solution (positive control), and experimental groups T3 and T4 treated with 20% sucrose solutions containing 18 and 70 µg Fe/mL, respectively. The Fe-sucrose solutions were prepared every day with sucrose containing ferrous sulfate co-crystallized. The solutions and DDW were dripped onto the blocks 8x/day and F-dentifrice was used 3x/day. After each phase, the acidogenicity, microbiological and biochemical composition were evaluated in the dental biofilm formed; the percentage of surface microhardness change and area of mineral loss were determined on the enamel. Lower demineralization was found in the blocks submitted to Fe-sucrose (70 µg Fe/mL) than in those treated with sucrose ($p < 0.05$). This concentration of Fe also reduced significantly the count of mutans streptococci group (MS) in the biofilm. In conclusion, iron reduces *in situ* the cariogenic potential of sucrose and the effect seems to be related to the reduction of MS in the dental biofilm formed.

1. INTRODUÇÃO

A deficiência de ferro é considerada uma carência nutricional muito freqüente, principalmente nos países em desenvolvimento, afetando lactentes, pré-escolares, adolescentes e gestantes (Vannuchi *et al.*, 1992; Szarfarc, 1995). A anemia ferropriva é a principal consequência da deficiência de ferro e provoca apatia, interfere no desenvolvimento e desempenho intelectual da criança, além de aumentar a vulnerabilidade a infecções (Cook *et al.*, 1992). A incidência de anemia ferropriva nos estados de São Paulo, Pernambuco e no Distrito Federal varia de 40-50%, atingindo no Brasil cerca de 10 milhões de crianças (Brasil, 2001). Recentemente, foi estabelecido entre todos os setores da sociedade brasileira um Compromisso Social para Redução da Anemia por Carência de Ferro. Assim, medidas têm sido tomadas como a suplementação de ferro na alimentação através da adição de sais de ferro (sulfato ferroso, fumarato ferroso, ferro reduzido, eletrolítico, EDTA de ferro e sódio, ferro bisglicina quelato) às farinhas de trigo e milho comercializadas no país (Brasil, 2002).

Com relação à cárie dental, embora dados atuais mostrem que nos últimos anos tenha havido um declínio no Brasil (Narvai *et al.*, 1999), esta continua sendo um problema de saúde pública. Sua prevalência é baixa em alguns estados do nosso país como São Paulo (São Paulo, 2002), mas permanece alta nos menos desenvolvidos, pois esta doença é reflexo de desigualdade social (Narvai & Castellanos, 1999; Reisine & Psoter, 2001). Além do mais, o declínio de cárie ocorrido mundialmente, assim como no Brasil, tem sido explicado pelo uso

abrangente de fluoreto, porém outras medidas deveriam ser vislumbradas para um melhor resultado em termos de saúde pública.

Entre estas medidas, uma delas seria diminuir a cariogenicidade da sacarose, a qual além de ser considerada o carboidrato mais patogênico (Cury *et al.*, 2000), é de alto consumo no Brasil e no mundo (Pinto, 2000; Sheiham, 1981). Assim, tem sido demonstrado que ferro co-cristalizado à sacarose apresentou efeito cariostático em animais de laboratório (Bowen & Pearson, 1992; Rosalen *et al.*, 1996; Miguel *et al.*, 1997a,b,c). Além disso, a adição de ferro ao açúcar tem sido utilizada com sucesso para reduzir anemia ferropriva (Yip, 1996). De acordo com Layrisse *et al.* (1976), o açúcar seria um veículo mais adequado para suplementação de ferro quando comparado ao trigo, pois não apresenta substâncias que inibem a absorção deste íon. Dessa forma, a possibilidade de adicionar ferro ao açúcar a fim de aliviar dois grandes problemas de saúde pública, anemia e cárie dental, torna-se atrativa.

Entretanto, os resultados promissores de redução de cárie dental pelo uso do Fe co-cristalizado à sacarose foram constatados em animais de laboratório expostos a uma condição não usual de consumo de açúcar. Assim, o efeito observado em ratos foi avaliado pela ingestão de açúcar cristalino, oferecido aos animais de tempos em tempos através de uma máquina de alimentação. Deste modo, como o açúcar contendo Fe co-cristalizado se encontrava na forma não dissolvida, poderia ter sido atingida na cavidade bucal uma concentração suficientemente alta que explicaria os resultados obtidos.

Além do mais, embora o modelo de cárie experimental em animais seja reconhecido, um estudo mais próximo do possível em humanos deveria ser realizado. A este respeito, os estudos *in situ* são apropriados como indicadores de um estudo clínico final (Zero, 1995). Em acréscimo, o mecanismo pelo qual o Fe atuaria na redução de cárie dental é desconhecido e algumas sugestões têm sido feitas como: aumento da resistência do esmalte à desmineralização; efeito antibacteriano e até mesmo um efeito específico diminuindo a atividade das glicosiltransferases (GTFs) de estreptococos do grupo mutans.

A hipótese de que o ferro aumentaria a resistência do mineral à desmineralização foi testada em estudo com hamsters expostos à água ou dieta contendo sais de ferro onde se observou, através de microscopia de varredura, transmissão, raio-x ou difração eletrônica, a presença de géis ou cristais de hidróxidos de ferro sobre o esmalte (Torell, 1988). De acordo com o autor, esses produtos formados aumentariam a resistência do esmalte à dissolução por ácidos. Por outro lado, estes produtos poderiam estar também interferindo na aderência bacteriana ao esmalte.

Com relação ao efeito antibacteriano, este poderia ocorrer através de alguns mecanismos, entre os quais a inibição da fermentação de carboidratos pelas bactérias da placa dental. Assim, Oppermann & Rolla (1980) mostraram que enxaguatório experimental contendo FeCl_3 a 20 mM (1120 $\mu\text{g Fe/mL}$) reduziu a acidogenicidade da placa dental de voluntários. Este efeito, segundo os autores, poderia ser atribuído à oxidação de grupamentos tiol (-SH) de enzimas glicolíticas

dos microrganismos bucais, ou à formação de complexos insolúveis com Mg^{+2} , importante cofator enzimático.

Ainda em relação ao efeito antimicrobiano, foi observado que Fe^{+2} inibe a F-ATPase de estreptococos do grupo mutans (Dunning & Marquis 1998). Tendo em vista que essa enzima é responsável pela manutenção do pH intracelular bacteriano, bombeando prótons para o meio extracelular (Quivey *et al.*, 2000), sua inibição não só teria efeito geral bacteriostático e bactericida, como ecologicamente comprometeria a sobrevivência das bactérias bucais acidúricas, como os estreptococos do grupo mutans e lactobacilos.

Também tem sido mostrado que o ferro reduz atividade das GTFs, enzimas responsáveis pela síntese de polissacarídeos extracelulares, os quais aumentam a porosidade, aderência de microrganismos à superfície dentária e adesão interbacteriana (Dibdin & Shellis, 1988; Rölla *et al.*, 1989; Schilling & Bowen, 1992), potencializando a cariogenicidade da sacarose (Cury *et al.*, 2000). Este efeito foi mostrado laboratorialmente tanto nas enzimas em solução como aderidas a hidroxiapatita (Wunder & Bowen, 1999) e uma das suposições relatadas para este fato seria que proteínas, como as GTFs, seriam desnaturadas oxidativamente.

Desse modo, tendo em vista a necessidade de estudos em humanos e que analisem o efeito do ferro co-cristalizado à sacarose na redução de cárie dental, o objetivo deste trabalho foi avaliar *in situ* o efeito do ferro co-cristalizado à

sacarose na acidogenicidade, composição bioquímica e microbiológica do biofilme dental e na desmineralização do esmalte dental.

2. CAPÍTULO

De acordo com a Deliberação CCPG – 001/98, que regulamenta o formato de teses de Mestrado e de Doutorado da UNICAMP, o presente capítulo contém cópia de 01 (um) artigo, o qual foi submetido à publicação no periódico “Caries Research” (MS nº 174/03, anexo 1).

Effect of Sucrose Containing Iron on Dental Biofilm and Enamel Demineralization

G. D. PECHARKI¹, J. A. CURY¹, A. F. PAES LEME¹, C. P. M. TABCHOURY¹,
A. A. DEL BEL CURY¹, P. L. ROSALEN¹, W. H. BOWEN², ¹Faculty of Dentistry of
Piracicaba - UNICAMP, Brazil, ²University of Rochester, USA.

Correspondence:

Professor Jaime A Cury
Av. Limeira, 901
CEP 13414-903, Piracicaba, SP
Brazil
Phone: +55-19-3412-5302, Fax: +55-19-3412-5218.
E-mail: JCury@fop.unicamp.br

Running title: Fe-sucrose effect on dental biofilm and caries

Key Words: iron, sucrose, dental biofilm, demineralization, enamel

ABSTRACT

Since the effect of Fe on the cariogenicity of sucrose in humans is unexplored, this crossover study assessed in situ the effect of Fe co-crystallized with sucrose (Fe-sucrose) on the acidogenicity, biochemical and microbiological composition of the dental biofilm, and on the demineralization of the enamel. During two phases of 14 days each, 16 volunteers wore palatal appliances containing blocks of human enamel, which were submitted to 4 groups of treatments: Water; 20% sucrose and Fe-sucrose, in which sucrose was at 20% and Fe at 18 and 70 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The solutions were dripped onto the blocks 8x/day. Lower demineralization was found in the blocks submitted to Fe-sucrose (70 μg Fe/mL) than in those treated with sucrose ($p < 0.05$). This concentration of Fe also reduced significantly the populations of mutans streptococci (MS) in the biofilm formed on the blocks. In conclusion, iron reduces in situ the cariogenic potential of sucrose and the effect seems to be related to the reduction of MS in the dental biofilm formed.

INTRODUCTION

Iron deficiency anemia and dental caries are still among the most prevalent maladies found in public health surveys, mainly in developing countries [Bowen, 1995; Szarfarc et al., 1995]. Anemia can be prevented and treated by supplementing food with iron [Cook & Reusser, 1983; Trowbridge et al., 1993]; caries is a diet-dependent disease that may be avoided by reducing frequency of sugar and reduction in consumption is probably not feasible, an alternative strategy would be to reduce the cariogenicity of sucrose, through appropriate supplementation.

Results from studies in rats have shown that sucrose containing iron co-crystallized (Fe-sucrose) is significantly less cariogenic than pure sugar [Bowen and Pearson, 1992; Rosalen et al., 1996b; Miguel et al., 1997a,b,c]. Supplements of iron in sucrose have also been used successfully to reduce iron deficiency anemia [Yip, 1996]. Thus it is possible that by adding iron to sugar two of the most prevalent diseases could be alleviated.

The exact mechanism by which Fe exerts its cariostatic effects have not been definitely determined, possibilities include the following: (i) reduction of enamel solubility in acids [Torell, 1988]; (ii) decreasing the acidogenicity of dental plaque [Oppermann & Rölla, 1980]; (iii) bactericide and bacteriostatic effect on oral streptococci [Dunning et al., 1998] and (iv) reduction of activity of the glucosyltransferases (GTFs) of mutans streptococci [Wunder & Bowen, 1999].

Thus, the objective of this study was to assess in situ the effect of Fe-sucrose on the acidogenicity, biochemical and microbiological composition of dental biofilm and demineralization of the enamel.

MATERIALS AND METHODS

Experimental Design

This study was approved by the Research and Ethics Committee of FOP-UNICAMP (Protocol No. 008/2002). It involved a single blind crossover design and was performed in two phases of 14 days, during which 16 volunteers wore acrylic palatal appliances containing 2 groups in triplicate of human dental enamel blocks. Each group of 3 blocks was submitted in each phase to one of the treatments: T1- distilled and deionized water (negative control), T2- 20% sucrose solution (positive control) and experimental groups T3 and T4 treated with 20% sucrose solutions containing 18 and 70 μg Fe/mL, respectively. The volunteers were randomly allocated to treatments and who that done the treatments T1 and T3 in the first phase, done the T2 and T4 in the second phase, and vice-versa. The use of 2 treatments (split-mouth) in the same intra-oral palatal appliance was supported by the literature [Cury et al., 2001; Hara et al., 2003; Paes Leme et al., 2003] and the results of a pilot study. The acidogenicity of the biofilms formed on the enamel blocks was evaluated after the 13th day of treatments. On the 14th day of each phase, the biofilms were collected for biochemical and microbiological analyses and in the enamel the variation in its mineral content was determined. For statistical analysis, the volunteer was considered as a unit and the treatment as an individualized block.

Enamel blocks and palatal appliance preparation

For this study, 192 blocks of human dental enamel, prepared as previously described [Cury et al., 1997, 2000], and with a known surface microhardness were

randomly divided into 4 groups of 48 specimens according to the treatments. On the left and right sides of the intra-oral palatal appliances 2 cavities of 13 x 5 x 3 mm were made and into each of them, side by side, 3 blocks of enamel were placed. Further details of appliance preparation are described in a previous publication [Hara et al., 2003], and colorless or red resin was used to fix the plastic meshes to the acrylic, indicating where each treatment should be performed [Cury et al., 2001; Paes Leme et al., 2003].

Treatments

The solutions used for the treatments were prepared daily and those that contained iron and sucrose (T3 and T4) were obtained from sucrose containing co-crystallized ferrous sulfate [Rosalen et al., 1996a, for further information about co-crystallization process]. The use of 20% sucrose was based on results of mineral loss found in previous studies [Cury et al., 1997, 2000], and the concentrations of Fe were estimated on the basis of results of caries reduction in rats [Miguel et al., 1997c] and data from a pilot study previously carried out in situ.

At pre-determined times (8x/day) the volunteers were instructed to remove the appliance and drip one drop of the solutions onto each enamel block, according to the treatments. The excess of fluid was removed with a cotton swab in attempt to avoid across-effect of the treatments and after 5 minutes the appliance was replaced in the mouth.

Fluoridated dentifrice (Sorriso Fresh, silica-based, containing 1100 µg F/g, w:w, as NaF) was used by the volunteers throughout the experiment, including the lead-in and wash-out periods of seven days each. Oral hygiene was performed 3 times a day and the appliances were brushed, except for the enamel blocks. The

volunteers consumed fluoridated water (0.70 mg F/L) and received instructions as previously described [Cury et al, 2000].

The evaluation of bacterial acidogenicity was done on the 13th day of each phase, and in the following day the biofilm was collected and the enamel blocks were recovered for analysis.

Biofilm Analysis

Dental Biofilm Acidogenicity

The initial pH of the biofilm and its change after the respective treatment were determined on the 13th day of treatments. The analysis was performed in the morning, with the volunteers at overnight fasting and before starting the daily treatment sessions. The determinations were made in the volunteer mouth. The palladium microelectrode (Beetrotde® MEPH3L, WPI, USA) was inserted into the biofilm and the pH was determined in two positions, one anterior and another posterior to the biofilm formed on the 3 blocks placed at each side of the appliance. A mean pH value of the 2 sites for each treatment was calculated. After determining the initial pH, the palatal appliance was removed and treatment was carried out as usual. After 1 minute the appliance was replaced in the mouth and after 4 minutes, duplicates of new pH measurements were taken (final pH) at the same places as the initial ones, and the difference (Δ pH) was calculated. The electrode was connected to a pH meter (Orion- 720-A, USA) coupled with a glass reference electrode (Orion – 9002, USA). A salt bridge was created in a 3 M KCl solution between the glass electrode and the volunteer's finger [Lingström and Birkhed, 1993; Lingström et al., 1994]. The microelectrode was calibrated with

standard buffers at pH 4.0 and 7.0, before each experimental session.

Dental Biofilm Composition

Ten hours after the last exposure to treatments, all the biofilm formed on the enamel blocks was collected [Cury et al., 1997, 2000]; an homogeneous part of it was used for the microbiological analysis and the rest dehydrated for biochemical analysis.

For microbiological analysis, the biofilm was weighed (± 0.01 mg) in a sterilized microcentrifuge tube, suspended in 0.9% NaCl solution (1 mL/mg plaque wet weight) and sonicated [Bowen et al., 1986]. The resulting suspension was diluted and inoculated, by means of a spiral plater (Spiral System[®]), in mitis salivarius agar to determine total streptococci and in mitis salivarius agar plus 0.2 units bacitracin/mL to determine mutans streptococci populations [Gold et al., 1973]. For lactobacilli counts the suspension was incubated in Rogosa medium (Difco). The plates were incubated in 10% CO₂ at 37°C for 48 h. The colony-forming units were counted and the results were expressed in UFC/mg plaque, and in percentage of mutans streptococci with regard to the total streptococci (% MS).

For biochemical analysis, dry samples of plaque were weighed in microcentrifuge tubes and treated as described previously [Cury et al., 1997], but with a modification in the proportion of the solutions (100 μ L of HCl and 200 μ L of NaOH/mg of dry weight dental plaque) for the extraction of the inorganic and polysaccharide components, respectively. Iron (Fe) was analyzed by atomic absorption spectrophotometer and the standards (0.5 to 4.0 μ g Fe/mL) were prepared from the Merck[®] Standard (Lot OC124998). Fluoride (F), calcium (Ca),

inorganic phosphorus (P_i) and insoluble polysaccharide (IP) analyses were done as described by Cury et al. [1997, 2000].

Enamel Analysis

After each treatment phase, the enamel surface microhardness (SMH) of the 3 blocks submitted to each one of the 4 treatments by the volunteers was measured again, and an average per volunteer was obtained. These analyses were carried out according to Cury et al. [2000] and the percentage of surface microhardness change (%SMC) was calculated.

After SMH analysis, all blocks were longitudinally sectioned through the center for cross-sectional microhardness determination (CSMH). The CSMH was performed according to Cury et al. [2000], but the indentations were made at 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, and 200 μm from the outer enamel surface. CSMH values were converted to mineral content (vol %) according to Featherstone et al. [1983], and the area of mineral loss (ΔZ) for each treatment was calculated [White and Featherstone, 1987].

The microhardness tester, Future-Tech FM, coupled to software FM-ARS, was used for these analyses. A Knoop indenter was used with a 50-g or 25-g load for 5 sec, for SMH e CSMH, respectively.

Statistical Analyses

The assumptions of equality of variances and normal distribution of errors were checked for all the response variables tested and those that did not satisfy were transformed [Box et al., 1978]. The Analysis of Variance followed by Tukey test were used for most of the variables, except F, IP and %MS, when Friedman

test was used followed by t-test. The software SAS (version 8.02, SAS Institute Inc., Cary: NC, 1999) was used and the significance limit was set at 5%.

RESULTS

The values of lactobacilli counts, %SMC, ΔZ were transformed by $\log_{10}$ and those of final pH, ΔpH , Fe, P_i , Ca, total streptococci, mutans streptococci were, respectively, transformed by power of 0.8, 0.5, -2.8, -0.5, -0.3, 0.3 and 0.1 allowing a parametric statistical analysis of the data. The values of initial pH did not need transformation to conduct a statistical parametric analysis and the other variables did not allow transformation being analyzed by the appropriate test described.

Statistically significant effect of the treatments was found for most of the dependent variables evaluated ($p < 0.001$), with exception for total streptococci ($p = 0.331$).

The values of initial pH, final pH, and ΔpH found for the negative control (Table 1) were statistically different from those observed for the other treatments ($p < 0.05$), which did not differ between each other ($p > 0.05$).

The concentrations of Fe (Table 2) in the biofilms of the experimental groups treated with Fe-sucrose (T3 and T4) were statistically higher ($p < 0.05$) than those found for the negative and positive controls. T4 presented the highest concentration of Fe in the biofilm ($p < 0.05$), and the difference between the control groups was not statistically significant ($p > 0.05$).

The concentrations of F in the biofilms formed by treatments T2, T3 and T4 (Table 2) were statistically lower than those found in the negative control ($p < 0.05$), but among them the difference was not significant ($p > 0.05$); the same pattern was

observed for the concentration of P_i .

The concentration of Ca (Table 2) in the biofilm of the positive control and the experimental groups presented significantly lower values than that in the negative control group ($p < 0.05$). The concentration of T4 did not differ statistically from the concentrations of T2 or T3 ($p > 0.05$), however these two groups differed from each other ($p < 0.05$).

The concentrations of IP in the biofilms formed by T2, T3 and T4 (Table 2) were significantly higher than that of the negative control ($p < 0.05$). The concentration of IP in group T3 was lower than T4 ($p < 0.05$), but both of them did not differ from T2 ($p > 0.05$).

The lactobacilli count was statistically lower ($p < 0.05$) in the biofilm of the negative control group than those in the groups T2, T3 and T4 (Table 2), which did not differ among each other ($p > 0.05$).

In mutans streptococci counts (Table 2), while the values of the experimental groups T3 and T4 did not differ from the negative control ($p > 0.05$), the value of the positive control was statistically higher than the values of negative control and T4 ($p < 0.05$). In addition, the positive control did not differ from T3 ($p > 0.05$). With regard to the % mutans streptococci in relation to total streptococci, T2 and T3 presented statistically higher values than the negative control and T4 ($p < 0.05$), and the values of the latter two did not differ between them ($p > 0.05$).

In the analysis of the dental enamel, surface microhardness changes (%SMC) of the positive control and the experimental groups (T3 and T4) were statistically higher than the negative control ($p < 0.05$). Furthermore, %SMC was statistically lower in the group treated with the highest iron concentration (T4) than

in the positive control (T2) treated only with sucrose ($p < 0.05$). This behavior was repeated for ΔZ analysis and in addition, when the enamel was submitted to treatment with sucrose containing the highest iron concentration (T4), the mineral loss in the caries lesion inclusively did not differ statistically from the negative control ($p > 0.05$).

DISCUSSION

The results of mineral loss, assessed both by SMH and CSMH, showed that enamel exposed to Fe-sucrose display significantly less demineralization than did those treated with pure sucrose (Table 3). These in situ data, which simulate the consumption of a drink sweetened with Fe-Sucrose, confirm study in hamsters [Emilson and Krasse, 1972] and extend the results found in rats fed to a diet with Fe-sucrose [Rosalen et al., 1996b; Miguel et al., 1997a,b,c]. The effect observed should be attributed to Fe, which in fact was found at high concentration in the biofilms exposed to the solutions containing this ion (Table 2), and its concentration in the biofilm was proportional to that used in the treatments. This finding of significant difference of Fe concentration in the biofilms formed on both sides of the same oral appliance by different treatments (T1 and T3, T2 and T4) shows that there was no across-effect during the study, confirming our previous in situ studies evaluating simultaneously two treatments in a palatal appliance [Cury et al, 2001; Hara et al., 2003; Paes Leme et al., 2003].

With regard to the effect of Fe in the biofilms formed, the data suggest that the reduction in enamel demineralization may not be attributed to the inhibition of sucrose fermentation, since the values of decreased pH observed for the groups

T3 and T4 (Table 1) were not statistically different from the sucrose group (T2). Although this result is in agreement with that observed in rats [Miguel et al., 1997b], it disagrees with that observed in vivo [Oppermann and Röllä, 1980]. This apparent discrepancy may be explained by the fact that latter authors used Fe^{3+} ions and at a concentration 20-70 higher than those used in this study.

With regard to the organic and inorganic composition of the biofilms (Table 2), the data suggest that the effect of Fe seems not to be related to the polysaccharide composition of the biofilm matrix, F, Ca and P_i , because the differences among the experimental groups (T3 and T4) and the positive control (T2) did not reach statistical significance (Table 2). Our observations on the polysaccharide content are in agreement with the results from study of Miguel et al. [1997b] conducted in rats, but appear inconsistent with the in vitro results of inhibition of GTFs activity by Fe^{2+} [Wunder & Bowen, 1999] suggesting that the inhibition of these purified enzymes by Fe does not seem to occur in biofilms. On the other hand, it must be emphasized that in this study was determined the total alkali soluble concentration of extracellular polysaccharide [Cury et al., 1997, 2000], not differentiating the insoluble glucans produced by GTF B and C, and the inhibition of one of them may be compensated by the increase of the other, without altering the total amount of glucan, which may be relevant in terms of cariogenicity.

With regard to the absence of Fe effect on the inorganic composition of the biofilms as examined here (Table 2), the data are consistent with our previous observations since the concentration of IP was unaffected and there is an inverse relation between the concentration of IP, and that of F, Ca and P_i in the matrix of the biofilm formed in the presence of sucrose [Cury et al., 1997, 2000; Paes Leme

et al., 2003].

Thus, the data of this study suggest that the effect of Fe appears to be related to its ability to interfere specifically with the bacterial ecology. Therefore, either the absolute mutans streptococci count or its % in relation to total streptococci was reduced in the biofilms formed, but total streptococci and lactobacilli counts were not affected (Table 2). The reduction in the % of mutans due to the treatment with the higher concentration of Fe (T4) was statistically greater than that with treatment T3, suggesting that there is a response to dose effect. This result in some way is in agreement with the in vitro study showing that strains of mutans streptococci are susceptible to Fe^{+2} , and the effect is dose-dependent [Dunning et al., 1998]. The reduction of mutans streptococci populations in animals by iron has not been consistent [Miguel et al., 1997a,b,c], but our data are in agreement with the study conducted in rats by Beigthon and McDougall [1981]. Considering this effect of iron in the bacteria directly involved with dental caries development, its combination with fluoride should be advised because the effect of caries reduction may be enhanced since Fe showed antibacterial action and F has a recognized physicochemical effect on enamel-dentine demineralization and remineralization.

The absence of Fe effect on the increase of lactobacilli caused by the frequent exposure to sucrose (Table 2) is in agreement with previous reports, which show that *Lactobacillus casei* is insensitive to Fe^{2+} in vitro [Dunning et al., 1998].

The possible effect of iron reducing enamel demineralization by acid [Torell, 1988] was not evaluated in the present study, but it should not be considered

because the concentration used for this effect is extremely higher (11200 µg Fe/mL) than those used here.

In conclusion, this in situ study confirms that iron co-crystallized with sucrose reduces enamel demineralization caused by this carbohydrate. This effect of iron seems to be associated with the reduction of mutans streptococci in the dental biofilm formed, however more specific studies are necessary, because the mechanism of action was not clearly elucidated.

ACKNOWLEDGMENTS

To the volunteers for their valuable participation in this study, to the technicians of the Laboratory of Oral Biochemistry of the Faculty of Dentistry of Piracicaba - UNICAMP Mariza J.C. Soares and José Alfredo da Silva for the technical assistance. This study was supported by FAPESP (Proc. 01/11759-0) and FUNCAMP (Conv. 219). The manuscript was based on a thesis submitted by the first author to Faculty of Dentistry of Piracicaba, UNICAMP, SP, Brazil, as a partial fulfillment of the requirements of the Master Program in Dentistry, concentration in Cariology.

REFERENCES

- Beighton D, Mc Dougall WA: The influence of certain added water-borne trace elements on the percentage bacterial composition of tooth fissure plaque from conventional Sprague-Dawley rats. Arch Oral Biol 1981;26:419-425.
- Bowen WH, Pearson S, Young D, Thibodeau E: The effect of partial desalivation on coronal and root surface caries in the rat; in: Leach SA (ed): Factors relating to demineralization and remineralization of the teeth. Oxford, IRL Press, 1986, pp.243-250.

- Bowen WH, Pearson SK: The effect of ions co-crystallized with sugar on caries on desalivated rats (abstract). J Dent Res 1992;71:522.
- Bowen WH: Are current models for preventive programs sufficient for the needs of tomorrow? Adv Dent Res 1995;9:77-81.
- Box GEP, Hunter WG, Hunter JS: Statistics for experimenters. New York, John Wiley & Sons Inc, 1978.
- Cook JM, Reusser ME: Iron fortification: an update. Am J Clin Nutr 1983;38:648-659.
- Cury JA, Rebello MA, Del Bel Cury AA: In situ relationship between sucrose exposure and the composition of dental plaque. Caries Res 1997;31:356-360.
- Cury JA, Rebelo MAB, Del Bel Cury AA, Derbyshire MTVC, Tabchoury CPM: Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in the presence of sucrose or glucose and fructose. Caries Res 2000;34:491-497.
- Cury JA, Hashizume LN, Del Bel Cury AA, Tabchoury CPM: Effects of dentifrice containing fluoride and/ or baking soda on enamel demineralization/ remineralization: an in situ study. Caries Res 2001;35:106-110.
- Dunning JC, Ma Y, Marquis RE: Anaerobic killing of oral streptococci by reduced transition metal cations. Appl Environ Microbiol 1998;64:27-33.
- Emilson CG, Krasse B. The effect of iron salts on experimental dental caries in the hamster. Arch Oral Biol. 1972;17:1439-1443.
- Featherstone JDB, ten Cate JM, Shariati M, Arends J: Comparison of artificial caries-like lesions by quantitative microradiography and microhardness profiles. Caries Res 1983;17:385-391.

- Gold OG, Jordan HV, van Houte J: A selective medium for *Streptococcus mutans*. Arch Oral Biol 1973;18:1357-1364.
- Hara AT, Queiroz CS, Paes Leme AF, Serra MC, Cury JA: Caries progression and inhibition in human and bovine root dentine in situ. Caries Res 2003;37:339-344.
- Lingström P, Birkhed D: Plaque pH and oral retention after consumption of starchy snack products at normal and low salivary secretion rate. Acta Odontol Scand 1993;51:379-388.
- 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 1994;73:652-660.
- Miguel JC, Bowen WH, Pearson SK: Effects of frequency of exposure to iron-sucrose on the incidence of dental caries in desalivated rats. Caries Res 1997a;31:238-243.
- Miguel JC, Bowen WH, Pearson SK: Effects of iron salts in sucrose on dental caries and plaque in rats. Arch Oral Biol 1997b;42:377-383.
- Miguel JC, Bowen WH, Pearson SK: Influence of iron alone or with fluoride on caries development in desalivated and intact rats. Caries Res 1997c;31:244-248.
- Oppermann RV, Rolla G: Effect of some polyvalent cations on the acidogenicity of dental plaque in vivo. Caries Res 1980;14:422-427.

- Paes Leme AP, Dalcico R, Tabchoury CPM, Del Bel Cury AA, Rosalen PL, Cury, JA: In situ effect of frequent sucrose exposure on enamel demineralization and on plaque composition after APF application and F-dentifrice use. J Dent Res 2004;83:71-75. *In press*.
- Rosalen PL, Bowen WH, Pearson SK: Effect of copper co-crystallized with sugar on caries development in desalivated rats. Caries Res 1996a;30:367-372.
- Rosalen PL, Pearson SK, Bowen WH: Effects of copper, iron and fluoride co-crystallized with sugar on caries development and acid formation in desalivated rats. Arch Oral Biol 1996b;41:1003-1010.
- Szarfarc SC, Stefanini MLR, Lerner BR. Nutritional anemia in Brazil (in Portuguese). Cad Nutr 1995;9:5-24.
- Torell P: Iron and dental caries. Swed Dent J 1988;12:113-124.
- Trowbridge FL, Harris SS, Cook J, Dunn JT, Florentino RF, Kodyat BA, Mannar MG, Reddy V, Tontisirin K, Underwood BA, Yip, R: Coordinated strategies for controlling micronutrient malnutrition: a technical workshop. J Nutr 1993;123:775-787.
- White DJ, Featherstone, JDB: A longitudinal microhardness analysis of fluoride dentifrice effects on lesion progression in vivo. Caries Res 1987;21:502-512.
- Wunder D, Bowen WH: Action of agents on glucosyltransferases from Streptococcus mutans in solution and adsorbed to experimental pellicle. Arch Oral Biol 1999;44:203-214.
- Yip R: Prevention and control of iron deficiency in developing countries. Curr Issues Public Health 1996;2:253-263.

Table 1: Analysis of dental biofilm pH according to the treatments (Avg $\pm$ SD, n)^a

TREATMENTS	ANALYSIS		
	initial pH	final pH	Δ pH (initial pH– final)
T1 = H₂O	7.8 $\pm$ 0.4 A (n=15)	7.7 $\pm$ 0.4 A (n=15)	0.2 $\pm$ 0.3 A (n=15)
T2 = 20% sucrose	6.8 $\pm$ 0.7 B (n=16)	5.3 $\pm$ 0.6 B (n=16)	1.7 $\pm$ 0.5 B (n=15)
T3 = Fe-sucrose^b	6.9 $\pm$ 0.7 B (n=15)	5.3 $\pm$ 0.4 B (n=15)	1.5 $\pm$ 0.8 B (n=15)
T4 = Fe-sucrose^c	7.0 $\pm$ 0.6 B (n=16)	5.4 $\pm$ 0.5 B (n=16)	1.6 $\pm$ 0.6 B (n=16)

^aTreatments whose means are followed by distinct capital letters differ statistically (p<0.05).^{b,c}Groups treated with solution containing 20% sucrose and Fe²⁺, at 18 and 70 μ g/mL, respectively.

Table 2: Biochemical and microbiologic analysis of dental biofilm according to the treatments (Avg $\pm$ SD, n)^a

ANALYSIS	TREATMENTS			
	T1 = H ₂ O	T2 = 20% sucrose	T3 = Fe-sucrose ^b	T4 = Fe-sucrose ^c
Fe (μg /mg)	0.05 $\pm$ 0.07 A (n=15)	0.03 $\pm$ 0.03 A (n=15)	0.16 $\pm$ 0.13 B (n=16)	0.38 $\pm$ 0.14 C (n=16)
F (μg/g)	352.0 $\pm$ 271.3 A (n=15)	28.2 $\pm$ 79.0 B (n=16)	66.5 $\pm$ 108.1 B (n=16)	32.0 $\pm$ 48.0 B (n=16)
Ca (μg/mg)	45.9 $\pm$ 27.0 A (n=12)	2.1 $\pm$ 1.8 B (n=16)	3.8 $\pm$ 3.3 C (n=16)	2.5 $\pm$ 1.2 BC (n=16)
P_i (μg/mg)	23.5 $\pm$ 14.2 A (n=13)	3.0 $\pm$ 1.5 B (n=14)	3.6 $\pm$ 2.4 B (n=15)	3.4 $\pm$ 1.3 B (n=15)
Insoluble polyssacharide (μg/mg)	35.4 $\pm$ 7.4 A (n=15)	193.5 $\pm$ 124.6 BC (n=16)	170.0 $\pm$ 118.2 B (n=16)	195.8 $\pm$ 131.0 C (n=16)
Lactobacilli (CFU/mg x 10⁶)	0.0083 $\pm$ 0.0 A (n=15)	1.8 $\pm$ 1.4 B (n=15)	1.6 $\pm$ 1.8 B (n=15)	1.3 $\pm$ 1.3 B (n=15)
Total streptococci (CFU/mg x 10⁵)	8.6 $\pm$ 8.5 A (n=16)	16.8 $\pm$ 19.7 A (n=16)	6.9 $\pm$ 8.7 A (n=16)	7.51 $\pm$ 6.3 A (n=16)
Mutans streptococci (CFU/mg x 10³)	1.3 $\pm$ 3.6 A (n=16)	8.1 $\pm$ 14.9 B (n=16)	4.4 $\pm$ 12.0 AB (n=16)	0.2 $\pm$ 0.2 A (n=16)
% Mutans in relation to total streptococci	0.11 $\pm$ 0.3 A (n=16)	0.66 $\pm$ 1.4 B (n=16)	0.78 $\pm$ 1.2 B (n=16)	0.04 $\pm$ 0.1 A (n=16)

^aTreatments whose means are followed by distinct capital letters differ statistically (p<0.05).

^{b,c}Groups treated with solution containing 20% sucrose and Fe²⁺, at 18 and 70 μ g/mL, respectively.

Table 3: Analysis of dental enamel according to the treatments (Avg $\pm$ SD, n)^a

TREATMENTS	ANALYSIS	
	%SMC ^b (kg/mm ²)	ΔZ ^c (% Mineral vol x μ m)
T1 = H₂O	-5.1 $\pm$ 7.6 A (n=15)	459.4 $\pm$ 212.6 A (n=16)
T2 = 20% sucrose	-57.3 $\pm$ 32.3 B (n=15)	2165.5 $\pm$ 1890.3 B (n=16)
T3 = Fe-sucrose^d	-49.0 $\pm$ 30.1 BC (n=15)	1519.2 $\pm$ 1078.1 BC (n=16)
T4 = Fe-sucrose^e	-34.3 $\pm$ 24.0 C (n=16)	986.9 $\pm$ 954.9 AC (n=16)

^aTreatments whose means are followed by distinct capital letters differ statistically ($p < 0.05$).

^bSurface microhardness change.

^cArea of mineral loss.

^{d,e}Groups treated with solution containing 20% sucrose solution and Fe²⁺, at 18 and 70 μ g/mL, respectively.

3. CONCLUSÃO

Este estudo *in situ* confirma que o ferro co-cristalizado à sacarose reduz a desmineralização do esmalte provocada pela metabolização bacteriana deste carboidrato. Este efeito do ferro, na concentração de 70 µg/mL, parece estar associado à redução de estreptococos do grupo mutans no biofilme dental formado, porém estudos mais específicos são necessários, pois o mecanismo de ação não pôde ser claramente elucidado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

Bowen WH, Pearson SK. The effect of ions co-crystallized with sugar on caries on desalivated rats. *J Dent Res*. 1992; 71: 522. [Abstract 51].

Brasil. Ministério Da Saúde. Situação da Saúde da Criança no Brasil. Secretaria de Políticas de Saúde. Disponível em: URL: <<http://www.saude.gov.br/sps/areastecnicas/scrianca/crianca/situacao.htm>>.

Acesso em: 20 out. 2001.

Brasil. Resolução - RDC nº 344, de 13 de dezembro de 2002. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 18 dez. 2002. Disponível em: URL: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/344_02rdc.htm>. Acesso em: 14 out. 2003.

Cook JD, Baynes RD, Skikne BS. Iron deficiency and measurement of iron status. *Nutr Res Rev*. 1992; 5: 198-202.

Cury JA, Rebelo MAB, Del Bel Cury AA, Derbyshire MTVC, Tabchoury CPM. Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in the presence of sucrose or glucose and fructose. *Caries Res*. 2000; 34(6): 491-7.

* De acordo com a norma utilizada na FOP/Unicamp, baseada no modelo Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

Dibdin GH, Shellis RP. Physical and biochemical studies of *Streptococcus mutans* sediments suggest new factors linking the cariogenicity of plaque with its extracellular polysaccharide content. *J Dent Res*. 1988; 67(6): 890-5.

Dunning JC, Ma Y, Marquis RE. Anaerobic killing of oral streptococci by reduced transition metal cations. *Appl Environ Microbiol*. 1998; 64(1): 27-33.

Layrisse M, Martinez-Torres C, Renzi M, Velez F, González M. Sugar as a vehicle for iron fortification. *Am J Clin Nutr*. 1976; 29: 8-18.

Miguel JC, Bowen WH, Pearson SK. Effects of frequency of exposure to iron-sucrose on the incidence of dental caries in desalivated rats. *Caries Res*. 1997a; 31(3): 238-43.

Miguel JC, Bowen WH, Pearson SK. Effects of iron salts in sucrose on dental caries and plaque in rats. *Arch Oral Biol*. 1997b; 42(5): 377-83.

Miguel JC, Bowen WH, Pearson SK. Influence of iron alone or with fluoride on caries development in desalivated and intact rats. *Caries Res*. 1997c; 31(3): 244-8.

Narvai PC, Frazão P, Castellanos RA. Declínio na experiência de cárie em dentes permanentes de escolares brasileiros no final do século XX. *Odontol Saúde*. 1999; 1(1/2): 25-9.

Narvai PC, Castellanos RA. Levantamento epidemiológico em saúde bucal: Estado de São Paulo, 1998. *J Cosems*. 1999; 7: 4.

Oppermann RV, Rolla G. Effect of some polyvalent cations on the acidogenicity of dental plaque *in vivo*. *Caries Res*. 1980; 4: 422-7.

Pinto VG. Açúcares – suas relações epidemiológicas e econômicas com a cárie dental. In: *A saúde bucal coletiva*. São Paulo: Santos; 2000. p.403-428.

Quivey RG Jr, Kuhnert WL, Hahn K. Adaptation of oral streptococci to low pH. *Adv Microb Physiol*. 2000; 42: 239-74.

Reisine ST, Psoter W. Socioeconomic status and selected behavioral determinants as risk factors for dental caries. *J Dent Educ*. 2001; 65(10): 1009-16.

Rölla, G. Why is sucrose so cariogenic? The role of glucosyltransferase and polysaccharides. *Scand J Dent Res*. 1989; 97: 115-9.

Rosalen PL, Pearson SK, Bowen WH. Effects of copper, iron and fluoride co-crystallized with sugar on caries development and acid formation in desalivated rats. *Arch Oral Biol*. 1996; 41(11): 1003-10.

São Paulo (Estado). Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo. Relatório das Condições de Saúde Bucal no Estado de São Paulo em 2002. Disponível em: <http://www.saude.sp.gov.br/html/fr_sbucal.htm> Acesso em: 30 out. 2003.

Sheiham A. Health behaviour and dental health education. *N Z Dent J*. 1981; 77: 4-8.

Schilling KM, Bowen WH. Glucans synthesized *in situ* in experimental salivary pellicle function as specific binding sites for *Streptococcus mutans*. *Infect Immun*. 1992; 60(1): 284-95.

Szarfarc SC, Stefanini MLR, Lerner BR. Anemia nutricional no Brasil. *Cad Nutr*. 1995; 9: 5-24.

Torell P. Iron and dental caries. *Swed Dent J*. 1988; 12(3): 113-24.

Vannuchi H, Freitas MLS, Szarfarc SC. Prevalência de anemias nutricionais no Brasil. *Cad Nutr*. 1992; 4: 7-26.

Wunder D, Bowen WH. Action of agents on glucosyltransferases from *Streptococcus mutans* in solution and adsorbed to experimental pellicle. *Arch Oral Biol*. 1999; 44: 203-14.

Yip R: Prevention and control of iron deficiency in developing countries. *Curr Issues Public Health* 1996; 2: 253-263.

Zero DT. *In situ* caries models. *Adv Dent Res.* 1995; 9(3): 214-30.

ANEXO 1

ANEXO 2

TERMO DE DOAÇÃO DE DENTES

Eu, _____, CRO _____, estou doando ____ dentes terceiros molares retidos, extraídos no meu consultório localizado a _____ (rua, cidade) por necessidades clínicas e sob o consentimento dos pacientes, para a pesquisa intitulada “Avaliação *in situ* do efeito anticariogênico do ferro co-cristalizado à sacarose”, que será realizada na Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP pelos pesquisadores: CD Giovana Daniela Pecharki (mestranda em Cariologia) e Prof. Jaime Aparecido Cury (Orientador).

Curitiba, ____ de _____ de _____

**Assinatura e carimbo
do cirurgião-dentista**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da Pesquisa

Avaliação *in situ* do efeito anticariogênico do ferro co-cristalizado à sacarose.

Objetivo da Pesquisa

Avaliar a eficácia do ferro relacionada ao potencial de redução da cariogenicidade da sacarose.

Justificativa

A anemia e a cárie dental ainda estão entre as doenças mais relevantes em termos de saúde pública, principalmente nos países em desenvolvimento. Enquanto a anemia pode ser prevenida pela suplementação de ferro (Fe) na alimentação, cárie é uma doença dieta-dependente que poderia ser evitada pela restrição do consumo de sacarose (açúcar). Alguns trabalhos têm mostrado que sacarose contendo ferro co-cristalizado (Fe-sacarose) é menos cariogênica que açúcar puro, porém estudos adicionais são necessários. Deste modo, Fe-sacarose poderia ser uma alternativa para minimizar o problema de cárie e anemia. A presente pesquisa tem como proposta avaliar se o ferro apresenta potencial de redução de cariogenicidade da sacarose *in situ*.

Procedimentos

Será realizado um estudo do tipo cruzado que compreenderá 4 tratamentos, sendo duas fases de 14 dias cada, durante as quais vocês utilizarão dispositivos intra-orais palatinos contendo 6 blocos de esmalte dental humano (3 em cada lado). Os tratamentos serão:

Tratamento 1: água destilada e deionizada (água d. d.);

Tratamento 2: solução de sacarose a 20%;

Tratamento 3: solução de sacarose a 20% contendo 17,6 ppm de Fe (sulfato ferroso);

Tratamento 4: solução de sacarose a 20% contendo 70 ppm de Fe (sulfato ferroso);

O estudo compreenderá 4 tratamentos, porém serão feitos somente 2 cruzamentos. Assim, enquanto em uma etapa da pesquisa metade dos voluntários submeterão os blocos dentais aos tratamentos 1 e 3 (por exemplo), os demais voluntários farão os tratamentos 2 e 4. Numa segunda etapa será feita o cruzamento entre voluntários e tratamentos. O fato de que o estudo será dividido em apenas duas fases lhes proporcionará maior comodidade.

Em um período anterior ao início das fases do experimento (7 dias), vocês deverão fazer uso do dentífrico fluoretado pré-determinado a fim de padronizar as concentrações de flúor na saliva. Considerando o delineamento cruzado deste estudo, será estabelecido um intervalo de 7 dias entre as fases dos tratamentos para eliminar o possível efeito residual dos tratamentos anteriores. Nesse intervalo, vocês prosseguirão no uso do dentífrico estabelecido.

Além dos dentífricos Sorriso Fresh (Kolynos), vocês também receberão: escovas dentais, porta-aparelho ortodôntico, lenços de papel absorvente, gaze e estojo para acomodação desses itens. As instruções fornecidas a cada voluntário serão as seguintes:

- a) Na **fase 1**: Solução **A** deverá ser gotejada sobre os três blocos de esmalte contidos em um lado do dispositivo (1 gota para cada bloco), enquanto que a solução **B** deverá ser gotejada sobre os outros 3 blocos restantes (localizados do outro lado do dispositivo) ;
- b) Na **fase 2**: 3 blocos receberão a solução **C**, enquanto que os outros 3 blocos receberão **D**;
- c) utilizar o dispositivo intra-oral palatino diariamente, inclusive para dormir;
- d) remover o dispositivo intra-oral durante as refeições, porém conservando-o no estojo fornecido e em ambiente úmido com o objetivo de manter as bactérias da placa viáveis;
- e) secar delicadamente o aparelho com lenço de papel absorvente e utilizar 1 gota da solução determinada sobre cada bloco de esmalte 8 vezes ao dia de

acordo com o cronograma estabelecido. Após 5 min, colocar o dispositivo na boca sem lavar;

f) fazer uso do dentífrico padronizado (Sorriso Fresh-Kolynos) três vezes ao dia durante a escovação. Durante a escovação o dispositivo deverá ser removido e retornado para a boca imediatamente após a escovação.

Desconfortos e Riscos

1. Vocês poderão apresentar discreta halitose durante o período experimental, o que poderá ser resolvido com adequada higiene da parte interna do dispositivo intra-oral.
2. O uso das soluções será apenas como gotas sobre os blocos de esmalte presentes nos dispositivos intra-orais, não implicando em qualquer aumento de risco de cárie dental nos voluntários.
3. O dispositivo intra-oral pode causar um leve desconforto, que é, entretanto, semelhante ao desconforto causado por um aparelho ortodôntico móvel.

Durante todo o período da pesquisa, acompanhamentos semanais serão realizados, para verificar as condições do aparelho e da sua saúde bucal

O benefício que vocês terão será um auxílio indireto, contribuindo para a realização deste projeto e o conhecimento que vocês adquirirão sobre a eficácia do ferro relacionada ao potencial de redução da cariogenicidade da sacarose. Este conhecimento poderá ser utilizado futuramente em prol da população para manutenção da saúde geral e oral.

Forma de acompanhamento e assistência

Os pesquisadores envolvidos na pesquisa estarão à disposição de vocês para ajuste no aparelho intra-oral a fim de minimizar qualquer desconforto.

Garantia de esclarecimento

Você tem garantia de que receberá resposta ou esclarecimento de qualquer dúvida quanto aos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados à pesquisa. Também os pesquisadores supracitados assumem o compromisso de proporcionar informação atualizada obtida durante o estudo,

ainda que esta possa afetar a vontade do indivíduo em continuar participando. Qualquer dúvida ou problema com o dispositivo intra-oral, por favor, comunicarmos com a maior brevidade possível.

Tel: 3412-5303 (Laboratório de Bioquímica)

3412-5393 (Sala dos alunos da pós-graduação – Cariologia)

3412-5302 (prof. Jaime)

3434-4215 e 9706-7300 (Giovana)

3432-7197 (Adriana)

Formas de ressarcimento

Vocês serão ressarcidos de eventuais despesas com o transporte-alimentação para a retirada das amostras contidas nos dispositivos.

Formas de indenização

Não há danos previsíveis decorrentes desta pesquisa.

Garantia de sigilo

Os pesquisadores asseguram a sua privacidade quanto aos dados confidenciais envolvidos na pesquisa.

Liberdade para se recusar em participar da pesquisa

A decisão de fazer parte desta pesquisa é voluntária. Você pode escolher se quer ou não participar, assim como poderá desistir de participar a qualquer momento.

SUA ASSINATURA INDICA QUE VOCÊ DECIDIU PARTICIPAR DA PESQUISA COMO VOLUNTÁRIO E QUE LEU E ENTENDEU TODAS AS INFORMAÇÕES ACIMA EXPLICADAS.

Nome do voluntário

Assinatura do voluntário

Nome do Representante Legal

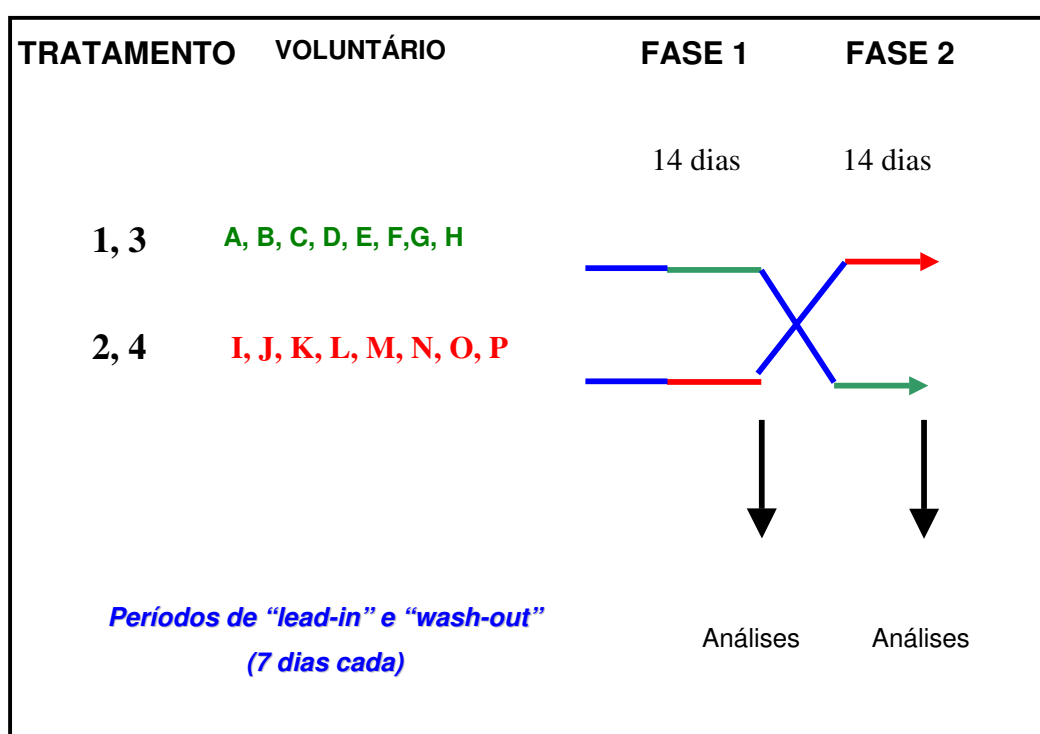
Assinatura do Representante Legal

Documento: _____

ATENÇÃO: A SUA PARTICIPAÇÃO EM QUALQUER TIPO DE PESQUISA É VOLUNTÁRIA. EM CASO DE DÚVIDA QUANTO AOS SEUS DIREITOS ESCREVA PARA O COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA FOP-UNICAMP.

Endereço: Av Limeira, 901 CEP – FOP, CEP 13.414-903 Piracicaba, SP

Fluxograma dos tratamentos em relação aos voluntários



**Sacarose contendo FeSO_4 co-cristalizado
(nesta foto, 702 mg Fe/kg)**



Dispositivo intra-oral palatino



Análise da acidogenicidade do biofilme



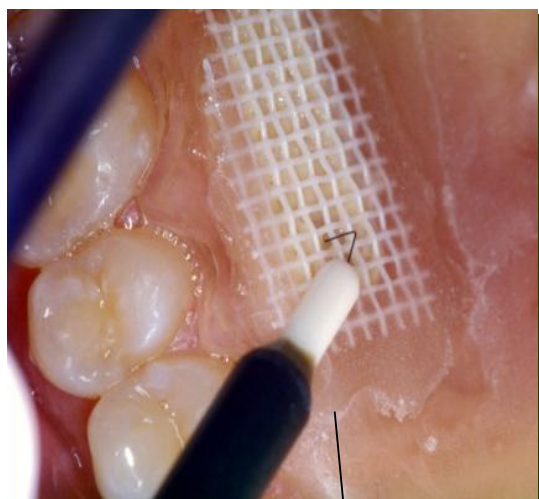
Peagômetro

anotador



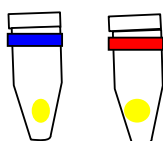
Eletrodo de referência

Dedo do voluntário em KCl juntamente com eletrodo de referência



Microeletrodo de contato com ponta ultrafina (0,1mm)

Fluxograma da análise microbiológica da placa dental



1 mg de placa dental/ mL de solução de NaCl 0,9%



Sonicação e diluição



Semeado em meio Rogosa, MSA, MSB

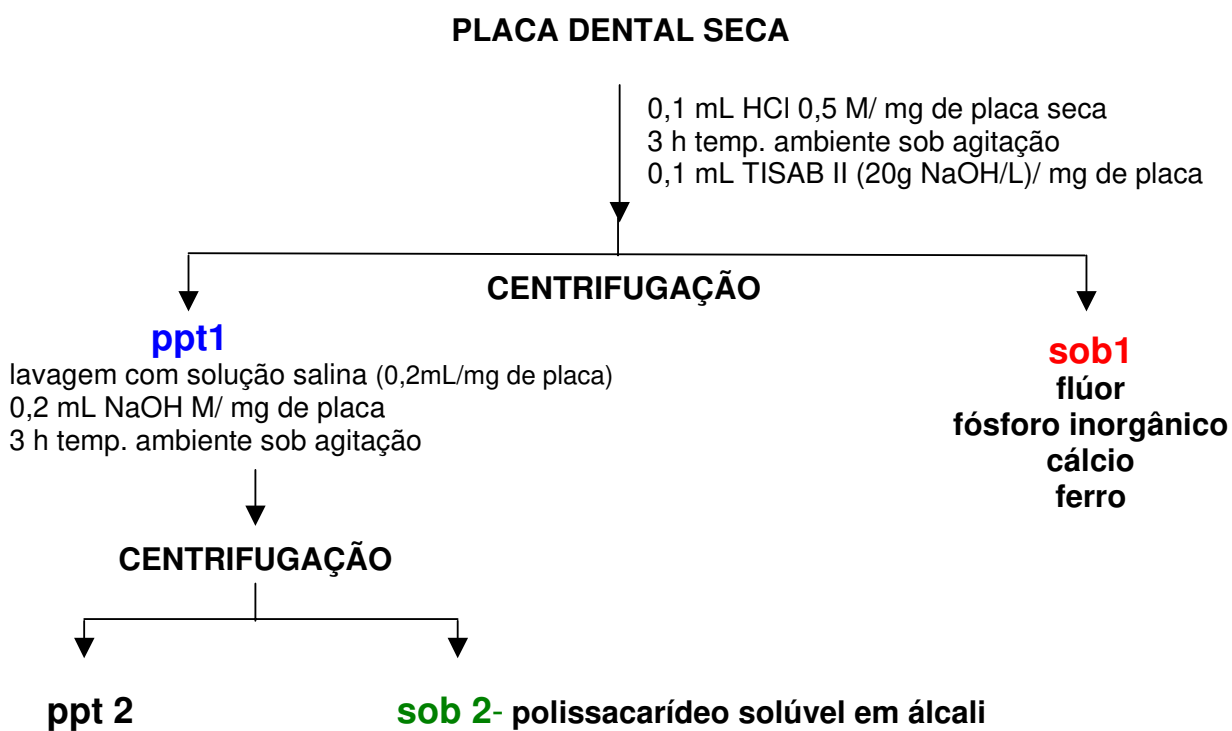


Spiral Plater

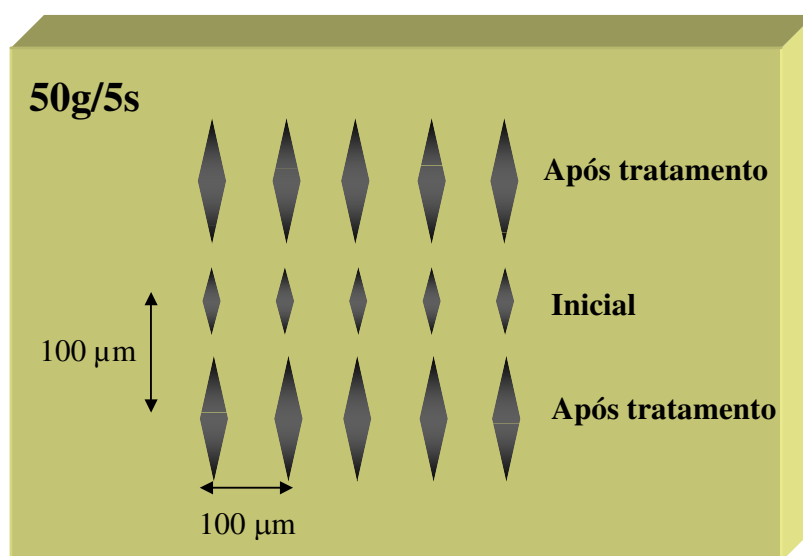
→ Incubação
em estufa a
10% CO₂ a
37°C por 48
horas →

-Identificação

-Contagem

Fluxograma da análise bioquímica da placa dental

Microdurezas de superfície: inicial e final



$$\% \text{ PDS} = \frac{\text{Dureza inicial} - \text{Dureza após o tratamento} \times 100}{\text{Dureza inicial}}$$

Microdureza do esmalte seccionado longitudinalmente

