

CLOTILDES FERNANDES PETERS

Cirurgiã-Dentista



1150052283



FOP

T/UNICAMP P442f

A FIXAÇÃO DE FLÚOR DE LAMBARIS (*Astyanax-imaculatus* e *fasciatus*). SEU EFEITO SOBRE A SOLUBILIDADE, EM ÁCIDO, DO ESMALTE DENTAL DE RATOS BRANCOS (*Rattus norvegicus*, var. *albinus*, Rodentia, Mammalia)

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do grau de Doutor em Ciências (Odontopediatria).

t167

PIRACICABA

1969

À minha mãe

e

espôso

Aos nossos orientadores,

Profª Dra. MARIA APPARECIDA POURCHET
CAMPOS, pela sábia orientação e consu
tante apoio que nos dispensou e,

Prof. Dr. SÉRGIO MIGUEL ZUCAS, pela
dedicação paciente e confiança ami-
ga com que nos distinguiu,

A nossa gratidão.

AGRADECIMENTOS

Um trabalho de pesquisa, particularmente a elaboração de uma tese, não pode prescindir da colaboração - direta ou indireta de toda uma equipe especializada nos mais variados setores da atividade técnico-científica.

Este trabalho não fugiu à regra. Na sua concretização, contamos com o auxílio mais direto das seguintes pessoas:

Prof. Dr. PLÍNIO ALVES DE MORAES, nosso digno Diretor, pelo apoio que tem dado aos trabalhos de pesquisa nesta Casa de Ensino;

Prof. Dr. RENÉ GUERRINI, Regente da Cadeira de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, por haver possibilitado o nosso trabalho junto à Cadeira de Bromatologia da Faculdade de Farmácia e Bioquímica da U.S.P., bem como, pela preciosa colaboração e dedicação constantes;

Prof. Dr. MANOEL CARLOS MULLER DE ARAUJO, Regente da Cadeira de Ortodontia da Faculdade de Odontologia - de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, pelas oportunidades que nos proporcionou e valiosas sugestões;

Prof. Dr. MYAKI ISSÃO, Regente da Cadeira de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pelo carinho que nos dispensou e incentivos com que nos encorajou;

Aos componentes da Cadeira de Tecnologia e Conservação dos Alimentos da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", sob a regência do Prof. Dr. JORGE LEME JUNIOR;

Aos elementos da Cadeira, Drs. JOSÉ RENCI e ANTONIO CARLOS USBERTI, Instrutor - MIGUEL MORANO JUNIOR, auxiliar APARECIDA NORI GRISOLIA e aos colegas Drs. EDY FRANCESCHI PIEDADE, JOSÉ DO CARMO BATTISTUZZO e SIMONIDES CONSANI.

Aos Profs. FREDERICO ALBERTO BLAAWN e IVES ANTONIO CORAZZA, Srs. SEBASTIÃO RODRIGUES DE BARROS, MOYSÉS JOSÉ MARIA DA SILVA e ADALBERTO GORGA.

*

* *

S U M Á R I O

	P.
1 - INTRODUÇÃO	8
2 - REVISTA BIBLIOGRÁFICA	10
3 - PROPOSIÇÃO	14
4 - PLANO DE TRABALHO - MATERIAL E MÉTODOS	15
4.1 - Material	15
4.1.1 - Animais	15
4.1.2 - Rações	16
4.2 - Métodos	17
4.2.1 - Métodos experimentais	17
4.2.2 - Métodos analíticos	19
4.2.3 - Análise estatística dos resultados	20
5 - DADOS ANALÍTICOS E RESULTADOS	21
6 - COMENTÁRIOS ÀS TABELAS	35
7 - DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	47
8 - CONCLUSÃO	52
9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

*

*

*

1 - INTRODUÇÃO

O flúor é elemento químico largamente distribuído na natureza. Sua abundância, na superfície terrestre, suplanta a do enxôfre, nitrogênio, uma vez que, quantitativamente, ocupa o décimo terceiro lugar entre os elementos químicos.

A riqueza do halogênio, na crosta terrestre, não guarda paralelismo com sua ocorrência nos alimentos, uma vez que êstes se apresentam pobres em flúor, como é o caso dos cereais, frutas, legumes, leite, ovos e carnes em geral [McCLURE³³⁻³⁴(1949)(1953), ZUCAS⁶³(1961), VEERARAGHAVAN⁵³(1965) e WALDBOTT⁵⁶(1966)]. Alguns alimentos, entretanto, demonstram possuir um teor elevado de flúor. Entre êstes citamos o chá [McCLURE³³(1949), FABRE & POURCHET-CAMPOS¹¹(1950), POURCHET-CAMPOS⁴⁴⁻⁴⁵(1951)(1953)] e os peixes, quando considerados com os ossos e escamas - [McCLURE³³(1949), ZIPKIN et alii⁶²(1969)]. Êste último caso têm dado motivo a estudos e foi verificado que os ossos e escamas contribuem com a porção mais representativa no percentual do flúor dos peixes (BROWN et alii¹ 1969).

O fato de que determinados alimentos devessem ser usados como fonte de flúor foi salientado, em 1949, por McCLURE³³. Esta medida seria tomada principalmente em áreas onde a água não fôsse fluoretada. O aumento na ingestão do halogênio, a partir de alimentos, seria norma visando objetivar a utilização da natural ação anti-cariogênica do flúor.

De fato, o hábito de comer peixes, principalmente aqueles de porte pequeno, cujos ossos também são inge-

ridos, parece ter demonstrado efetividade anticariogênica. Diversos autores já mostraram a existência de baixa incidência de cárie e a presença de fluorose dental em áreas onde o teor de flúor das águas de abastecimento era baixo, mas a ingestão de peixes elevada [SOGNNAES & ARMSTRONG⁵¹(1941), KOETS²⁴(1956), ELLIOT & SMITH⁸(1960), PU & LI- LIENTHAL⁴⁷(1961)].

Como os peixes apresentam uma proteína de alto valor biológico, a F.A.O. - Food Agricultural Organization planeja impulsionar o desenvolvimento da pesca e a elaboração de farinha de peixe, como medidas que servirão para o combate à desnutrição proteica. Além do combate à má nutrição, a F.A.O. estará promovendo combate à cárie dentária, de vez que a farinha de peixe é rica em flúor.

Após diversas observações pessoais, levadas a efeito na cidade de Piracicaba, verificamos que grande faixa de população de baixo poder aquisitivo consome o lambari, nas suas refeições, sendo estes ingeridos integralmente.

Em vista deste fato e do exposto, procuramos analisar o teor de flúor do lambari. Verificamos, então, em exame preliminar, que o peixe, após ser dessecado e desengordurado, apresentou concentração do halogênio da ordem de 45 mg por quilo.

Diante desse resultado, planejamos um estudo, - que visava determinar a fixação desse flúor e seu possível efeito sobre a solubilidade, em ácido, do esmalte dental de ratos. O recurso teria inestimável alcance na formação dos dentes de crianças que viessem receber alimentação complementada com o referido material

2 - REVISTA BIBLIOGRÁFICA

Cêrca de 98% do total de flúor, presente no organismo humano, é encontrado no esqueleto, sendo o restante distribuído entre os tecidos moles; o fato decorre da capacidade dos tecidos mineralizados reterem flúor.

A fixação de flúor no esqueleto está na dependência de diversos fatores [ZIPKIN et alii⁶¹(1959), ZUCAS⁶⁴(1965)] e entre êstes podemos citar a idade, uma vez que a quantidade de flúor, armazenada por organismos em crescimento, é superior àquela retida por sêres adultos - [ZIPKIN et alii⁶⁰(1956), ZIPKIN & LEONE⁵⁸(1957)]. Parece a idade ser fator determinante de perda gradativa na capacidade de retenção do flúor [ZIPKIN & McCURE⁵⁹(1952)].

Diferentes estruturas mineralizadas apresentam diferentes concentrações de flúor, guardando porém, paralelismo relativo. [JACKSON & WEIDMANN²¹(1959) e ZIPKIN⁵⁷(1965)] estudando alguns tipos de tecidos mineralizados - verificaram que a concentração de flúor obtida nas costelas, esmalte, dentina e crista do ilíaco eram diferentes, mas que essa concentração estava na dependência da quantidade de flúor ingerida e, também, na idade do indivíduo, - fato êste já citado.

Vários trabalhos demonstram que o flúor administrado sob a forma de sal inorgânico, como o fluoreto de sódio, é aproveitado em quantidades mais elevadas do que aquêle flúor proveniente de farinhas de ossos, farinhas de peixes ou outros alimentos [EVANS & PHILLIPS⁹(1939), - LEE & NILSON²⁹(1939), LAWRENZ & MITCHELL²⁸(1941), McCURE et alii³⁵(1945), JACKSON et alii²⁰(1950), POURCHET- CAM-

POS⁴⁵(1953), MUHLER & STOOKEY⁴⁰(1960), HADJIMARKOS¹⁶ -
(1964), LAJOLO et alii²⁶(1969), ZIPKIN et alii⁶²(1969)]. -
Com relação ao efeito cariostático do flúor proveniente -
de alimentos comparado com o efeito do flúor adicionado -
sob a forma de sais, também encontramos na literatura pes-
quisas demonstrando que o flúor, tanto na forma inorgâni-
ca como a partir de alimentos, apresenta ação cariostáti-
ca [BUTTNER & MUHLER⁵(1958), OPUSZYŃSKA⁴²(1966), CHAYET
et alii⁶(1966), NIZEL et alii⁴¹(1969) e STEPHAN⁵²(1969)].
Foi constatada ainda a presença de esmalte manchado - an-
omalia atribuída à excessiva dose de flúor contido natural-
mente nos alimentos - em casos em que as águas das locali-
dades estudadas não apresentavam teor elevado do halogê-
nio em questão [SOGNNAES & ARMSTRONG⁵¹(1941), KOETS²⁴ -
(1956), ELLIOT & SMITH⁸(1960) e PU & LILIENTHAL⁴⁷(1961)].

A medida de ação cariostática do flúor pela re-
dução da solubilidade em ácido, do esmalte dental, foi
feita por diversos pesquisadores. McCANN & BULLOCK³² -
(1957), estudando o efeito da administração de 100 ppm de
flúor na água de beber, verificaram que o halogênio era
incorporado aos tecidos mineralizados do rato e que tais
tecidos apresentavam menor solubilidade em ácidos do que
aqueles do grupo controle.

SINGER et alii⁴⁹(1965), analisaram a solubili-
dade dos tecidos mineralizados com alto teor de flúor e veri-
ficaram menor quantidade de cálcio dissolvido em soluções
tampão de ácidos fracos do que à dos mesmos tecidos, com
baixo teor de flúor.

Num estudo da solubilidade dos dentes permanen-
tes de duas comunidades da Nova Zelândia (Napier e Has-

tings), HEALY & LUDWIG¹⁷(1966) constataram menor solubilidade em ácido nos dentes dos naturais de Hastings (20% de redução) onde a água de abastecimento público era fluore-tada. Este estudo confirma os achados de FINN & DeMARCO¹²(1966), que encontraram redução de 4% na solubilidade de dentes decíduos de crianças que viviam em região cuja á-gua continha 1 ppm de flúor.

Tratamento de dentes com soluções tópicas fluo-retadas, "in vivo" e "in vitro", tanto de humanos como de animais de laboratório, acusam uma redução da solubilidade, do esmalte, em ácidos |BUTTNER & MUHLER³ (1957), - MUHLEMAN & WOLGENSINGER³⁸ (1959), MARTHALER & ZILIO³¹ - (1960), HOLMES & MIDDLETON¹⁸(1962), EIGEN et alii⁷(1963), SHANNON & GIBSON⁴⁸(1963), KING et alii²³(1965), MORLEY & HOLMES³⁷(1965), von der FEHR & STEINNES¹⁰(1966) e PASE⁴³(1967)|.

MUHLER et alii³⁹(1954) e BROWN & WALLACE²(1965) verificaram que o efeito dos fluoretos sôbre a solubilidade de do esmalte em ácido parece ser paralelo a seu efeito redutor da incidência de cárie dentária no rato.

Embora êstes resultados pareçam favorecer a teo-ria da solubilidade, JENKINS²²(1963), sômente encontrou diferenças estatisticamente significantes nos dentes da população de uma cidade cuja água continha 2 ppm de flúor.

Em estudo da relação da solubilidade do esmalte com a incidência de cárie dentária em duas comunidades, - uma com CPD - 2,15 e a outra com CPD - 1,16, KRASKE & ZAH-RAM²⁵(1965) não encontraram resultados estatisticamente - significantes, assim como GREEN & HARTLES¹⁵(1968) verifi-caram que a aplicação tópica de soluções fluoretadas em dentes de ratos reduz a incidência de cárie, porém não a solubilidade do esmalte em ácidos.

BRUDEVOLD & McCANN³(1968) estudando a solubilidade do pó de esmalte obtido de regiões com várias concentrações de flúor na água, verificaram completa dissolução do esmalte quando colocado em tampão acetato pH 4,2 - 4,3 não encontrando correlação entre o conteúdo de flúor do esmalte e a sua quantidade dissolvida. Este autor acredita que o mecanismo pelo qual o flúor reduz a cárie não é o da redução da solubilidade em ácidos.

*

*

*

3 - PROPOSIÇÃO

Pelo que expusemos e de não têmos encontrado - na literatura, nenhuma referência ao estudo do lambari - (Astyanax imaculatus e fasciatus) como fonte de flúor, propusemo-nos a:

- 3.1 - Verificar a fixação do flúor de lambaris na carcaça e estruturas mineralizadas, seccionadas, de ratos.
- 3.2 - Comparar êstes resultados com a fixação do flúor adicionado à ração, como fluoreto de sódio.
- 3.3 - Estudar o efeito do flúor fornecido pelo lambari, com o daquele fornecido pelo fluoreto de sódio, sôbre a solubilidade - em ácidos, do esmalte dental de molares de ratos.

*

*

*

4 - PLANO DE TRABALHO - MATERIAL - MÉTODOS

Nosso trabalho consistiu na observação da:

- a) fixação do flúor, de diferentes origens, na carcaça dos animais;
- b) fixação do halogênio em certas estruturas mineralizadas, selecionadas;
- c) correlação entre a fixação do flúor no esmalte dental e a solubilidade em ácido.

4.1 - M A T E R I A L

4.1.1 - Animais

Utilizamos em nossa experiência, 41 ratos machos albinos (Rattus norvegicus var. Albinus, Rodentia, - Mammalia), da linhagem WISTAR, provenientes do Biotério - da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, sendo a pesquisa iniciada logo após o desmame, quando os ratos contavam 24-27 dias de idade. Os animais foram colocados em gaiolas individuais, as quais permitiam o controle do consumo de ração, feito cada 48 horas. Semanalmente pesávamos os ratos.

Os animais foram distribuídos em diferentes grupos:

Grupo 0 - animais que foram sacrificados no início da experiência.

Grupo I - animais que receberam a ração controle.

GRUPO II - animais que receberam a ração contrô
le, adicionada de fluoreto de sódio.

Grupo III - animais que receberam a ração expe-
rimental.

4.1.2 - Rações

Com exceção dos animais do grupo 0, os demais re-
ceberam as rações por 28 dias. Preparamos três tipos de ra-
ção:

a) <u>Ração contrô</u> le:	Amido	38,73%
	Caseína	34,13%
	Sacarose	10,00%
	Óleo de soja	8,00%
	Fibra	3,00%
	Mistura salina	(*) 5,14%
	Mistura vitamínica ..	(**) 1,00%

(*) Fosfato Tricalcico	77,500%
Sulfato de cobre	0,017%
Citrato férrico	0,332%
Sulfato de magnésio	5,000%
Sulfato de manganês	0,417%
Cloreto de Potássio	10,000%
Iodeto de Potássio	0,017%
Cloreto de sódio	6,500%
Carbonato de zinco	0,217%

(**) Cloreto de Tiamina	0,500g
Riboflavina	0,500g
Pantotenato de Cálcio	2,000g
Vitamina B ₁₂	0,003g
Vitamina B ₆	0,500g
Bitartarato de Colina	200,000g
Vitamina A	500,000UI
Vitamina D	50,000UI
Vitamina E	5,000g
Vitamina K	2,000g
PABA	10,000g
Niacina	5,000g
Biotina	0,030g
Ácido Fólico	0,200g
Ácido Ascórbico	100,000g
Inositol	100,000g
Sacarose q.s.p	1 Kg

b) Ração controle com flúor

De composição semelhante à anterior, porém, enriquecida com 18 ppm de flúor, na forma de fluoreto de sódio.

c) Ração experimental

Para o preparo da ração experimental, utilizamos lambaris (*Astyanax imaculatus* e *fasciatus*), como fonte de proteína, em substituição à caseína das rações controle e controle com fluoreto de sódio. O peixe foi previamente eviscerado, dessecado em estufa regulada a 105°C, desengordurado com éter etílico em extrator de SOXHLET, novamente dessecado e posteriormente triturado.

O cálcio e o fósforo da mistura salina na ração experimental, foram balanceados de acordo com o teor desses elementos no peixe, de tal maneira que a ração experimental tivesse também o mesmo teor de cinza que as rações controles. Isto foi necessário, uma vez que o lambari seco e desengordurado, apresentava teor elevado de resíduo mineral fixo (cinza 20,80%).

Todas as rações, portanto, tiveram o mesmo teor de cálcio, de fósforo e de nitrogênio e as rações controle com fluoreto de sódio e a experimental foram iso-fluoretadas.

4.2 - MÉTODOS

4.2.1 - Métodos experimentais

4.2.1.1 - Fixação do flúor pela carcaça dos animais

Para este ensaio utilizamos 15 animais, pesando cerca de 35,0g. Os animais eram sacrificados, após 28 dias de experiência, pesados, dessecados em estufa regulada a 105°C, desengordurados com éter etílico em Extrator de SOXHLET, e pulverizados. No pó procedemos à análise do flúor como está referido em 4.2.2.1.

4.2.1.2 - Fixação do flúor por estruturas mineralizadas, selecionadas, de ratos

Nesta experiência utilizamos 18 animais, pesando, em média 42,0g. Ao término do período experimental de 28 dias, os animais dos grupos I, II e III, desta experiência, foram sacrificados e pesados. Retiramos as cabeças e as patas trazeiras de cada animal, as quais foram levadas à autoclave regulada a uma atmosfera durante meia hora.

Devidamente descarnadas e limpas, separamos as seguintes estruturas:- tíbias, mandíbulas, incisivos e molares. Os ossos e os incisivos de cada animal foram separadamente pesados e dessecados.

Após a secagem, os molares correspondentes de cada hemi-arco foram pesados conjuntamente e incluídos em roletes de cêra rosa, ficando apenas a porção coronária - exposta, tomando-se o cuidado de deixá-los distanciados - entre si, para que as faces proximais ficassem inteiramen

te livres para o posterior ataque do ácido.

4.2.2 - Métodos analíticos

4.2.2.1 - Determinação do flúor

Procedemos à análise do flúor no material seco e desengordurado.

Para o isolamento deste halogênio, empregamos o método de ZUCAS & LAJOLO⁶⁵(1968).

A determinação quantitativa foi feita pelo método de MEGREGIAN³⁶(1954), modificado por ZUCAS & LAJOLO⁶⁵(1968).

4.2.2.2 - Determinação da solubilidade em ácido

Determinamos a solubilidade em ácido empregando o método de WAGNER & WEIL⁵⁵(1966). Estes autores mandam separar as hemi-mandíbulas, isolar a parte óssea, deixando apenas os dentes expostos, os quais são imersos em solução de ácido láctico a 25 mM, durante 30 minutos.

O nosso método consistiu basicamente no mesmo empregado por WAGNER & WEIL⁵⁵(1966) porém, incluímos os molares em roletes de cêra e, usamos além da solução a 25 mM de ácido láctico, uma solução 0,25 mM do mesmo ácido.

4.2.2.3 - Determinação do fósforo

O fósforo dissolvido pela solução ácida foi determinado pelo método de FISKE & SUBBAROW¹³(1925).

4.2.3 - Análise estatística dos resultados

4.2.3.1 - Erro padrão

Foi determinado segundo MANTEL³⁰(1951).

4.2.3.2 - Teste de STUDENT & FISHER

A significância das diferenças entre as médias aritméticas dos resultados obtidos, foi determinada a partir do teste "t" de STUDENT & FISHER, cuja fórmula é a seguinte:

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\frac{\sum (\bar{X}_1 - \bar{X}_n)^2}{(N_1 - 2)} + \frac{\sum (\bar{X}_2 - \bar{X}_n)^2}{(N_2 - 2)} \cdot \frac{1}{N_1} + \frac{1}{N_2}}}$$

onde:

$\bar{X}$ = média aritmética dos grupos experimentais.

$\bar{X}_n$ = resultados individuais obtidos nos diferentes grupos experimentais para uma determinada análise.

N = número de amostras em cada grupo experimental

$\sum$ = Somatória dos resultados analíticos.

*

* *

5 - DADOS ANALÍTICOS E RESULTADOS

Os dados analíticos e os resultados do presente trabalho acham-se apresentados nas tabelas de 1 a 11 e nos gráficos I e II.

As significâncias das diferenças, entre as médias aritméticas dos resultados obtidos nos diversos grupos experimentais, foram testadas ao nível de 5%.

TABELA 1 - PÊSO DA CARCAÇA INTEGRAL, SECA E DESENGORDURADA (em mg),
BEM COMO AS CONCENTRAÇÕES DE FLÚOR DA CARCAÇA E ESTRUTU-
RAS MINERALIZADAS (em ppm)

GRUPOS	Nº DE ANIMAIS	P Ê S O		CONCENTRAÇÃO DE FLÚOR			
		INICIAL (g)	CARCAÇA SECA E DESENGORDURADA (g)	CARCAÇA	MANDÍBULA	TÍBIA	INCISIVOS
0	8	39,7 ± 0,25	9,4 ± 0,86	1,54 ± 0,08	10,06	7,78	7,59

TABELA 2 - GANHO MÉDIO DE PÊSO, CONSUMO MÉDIO DE RAÇÃO E FLÚOR
DOS DIFERENTES GRUPOS EXPERIMENTAIS

G R U P O S	Nº DE ANIMAIS	PÊSO DOS RATOS			CONSUMO	
		INICIAL (g)	FINAL (g)	GANHO (g)	RAÇÃO (g)	FLÚOR (mg)
I (Contrôle)	5	34,3 ± 1,70	168,3 ± 6,90	134,1 ± 5,70	279,8 ± 7,60	0,699 ± 0,019
II (Contrôle) NaF	5	34,7 ± 0,80	160,2 ± 7,10	125,5 ± 7,20	273,3 ± 10,10	5,651 ± 0,207
III (Experimental)	5	35,5 ± 2,40	162,3 ± 6,50	126,6 ± 0,91	311,6 ± 1,02	6,169 ± 0,202

GRÁFICO I

CURVAS DO CRESCIMENTO MÉDIO DOS ANIMAIS
E DO CONSUMO MÉDIO DE RAÇÃO ATÉ A FASE
FINAL DA PRIMEIRA EXPERIÊNCIA

Pêso (g)

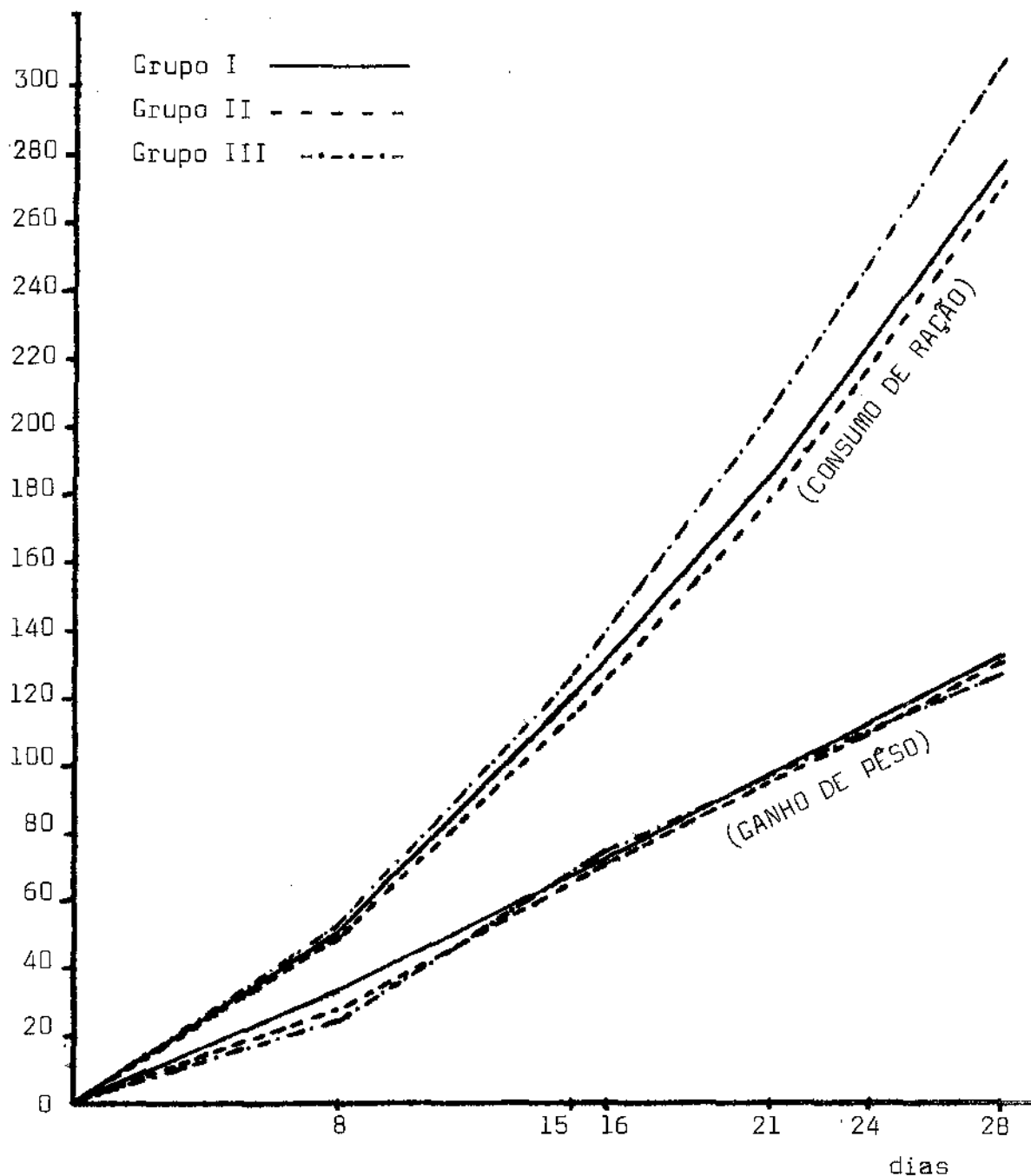


TABELA 3 - ANÁLISE DA CARCAÇA

GRUPOS	Nº DE ANIMAIS	PÊSO (g)	SÊCA E DE-SENGORDURA-DA (g)	% DE ÁGUA	% DE LÍPIDES	% DE MATERIAL SÊCO E DESENGORDURADO
I (Contrôle)	5	169,62 ± 6,71	39,30 ± 1,22	64,10 ± 0,88	12,65 ± 0,58	23,19 ± 0,19
II (Contrôle) NaF	5	160,33 ± 7,03	38,68 ± 1,83	63,4 ± 1,28	12,45 ± 1,30	24,12 ± 0,194
III (Experimental)	5	162,70 ± 6,49	38,52 ± 1,58	64,7 ± 0,58	11,51 ± 0,98	23,72 ± 0,408

TABELA 4 - CONCENTRAÇÃO DE FLÚOR (ppm), FLÚOR INICIAL (mg) FLÚOR TOTAL (mg). AUMENTO EM FLÚOR (mg) E PERCENTAGEM FIXADA DO FLÚOR INGERIDO

GRUPOS	Nº DE ANIMAIS	FLÚOR (mg)	* INICIAL (mg)	TOTAL (mg)	AUMENTO (mg)	% FIXADA DO INGERIDO
I (Contrôle)	5	2,80 ± 0,196	0,012 ± 0,0006	0,109 ± 0,006	0,098 ± 0,006	13,99 ± 0,984
II (Contrôle) NaF	5	35,56 ± 1,315	0,012 ± 0,0004	1,391 ± 0,052	1,378 ± 0,053	24,38 ± 0,296
III (Experimental)	5	10,12 ± 0,558	0,012 ± 0,0008	0,391 ± 0,038	0,378 ± 0,031	6,14 ± 0,556

(*) Dados obtidos com o lote 0 de animais

TABELA 5 - GANHO MÉDIO DE PÊSO, CONSUMO MÉDIO DE RAÇÃO E FLÚOR TOTAL INGERIDO*

GRUPOS	Nº DE ANIMAIS	PÊSO DOS RATOS			CONSUMO	
		INICIAL (g)	FINAL (g)	GANHO (g)	RAÇÃO (g)	FLÚOR (*) (mg)
I (Contrôle)	6	43,7 ± 1,25	158,4 ± 13,08	114,83 ± 13,08	266,8 ± 17,66	0,667 ± 0,030
II (Contrôle) NaF	6	47,7 ± 1,56	206,5 ± 3,25	158,75 ± 3,58	330,1 ± 6,91	6,768 ± 0,142
III (Experimental)	6	44,3 ± 1,00	192,1 ± 5,75	134,41 ± 13,41	345,6 ± 4,50	6,845 ± 0,089

(*) De acôrdo com as diferentes concentrações de flúor na ração

GRÁFICO II
CURVAS DO CRESCIMENTO MÉDIO DOS ANIMAIS E DO CONSUMO
MÉDIO DE RAÇÃO ATÉ A FASE FINAL DA SEGUNDA EXPERIÊN-
CIA

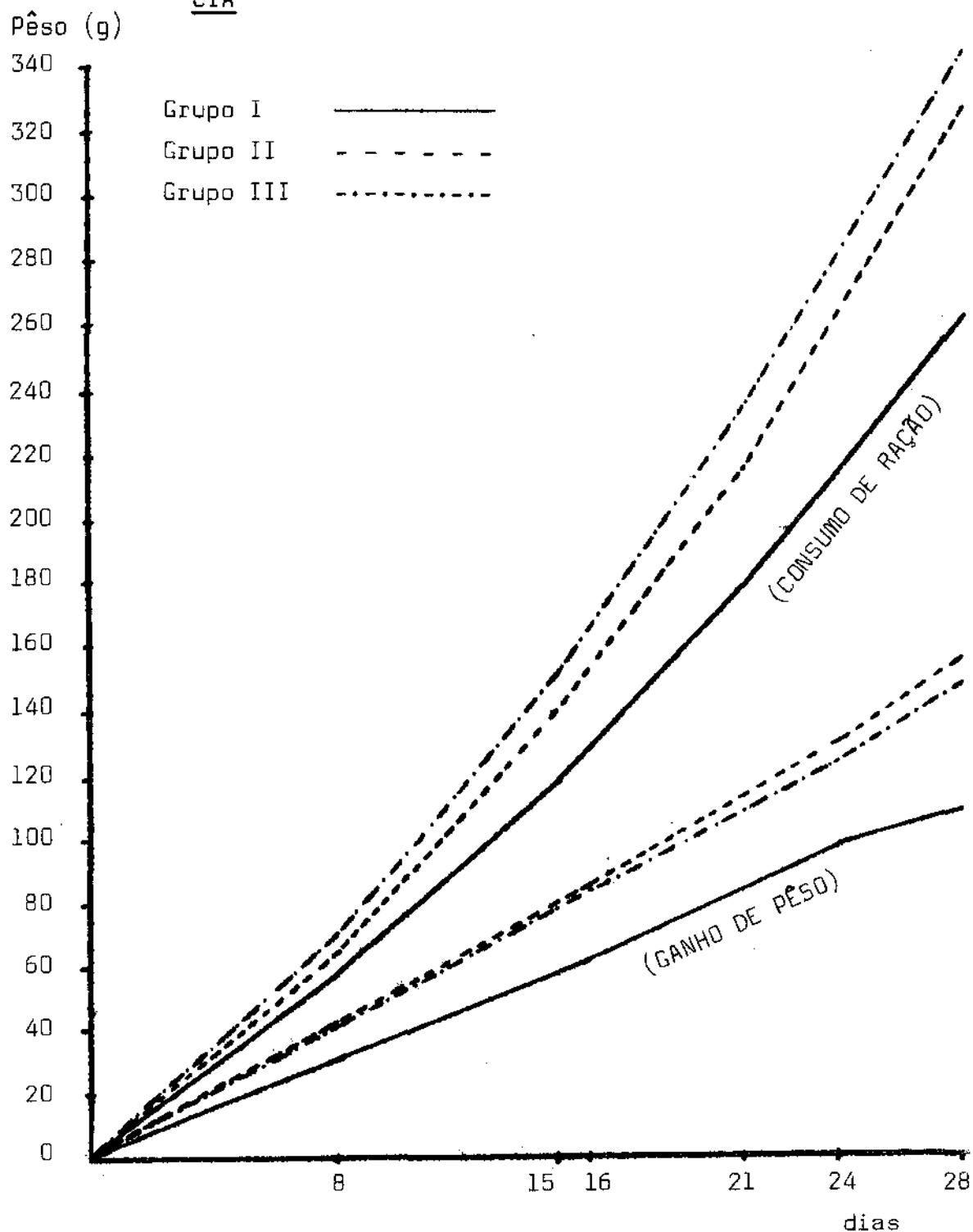


TABELA 6 - PÊSO SECO E DESENGORDURADO DE DIFERENTES ESTRUTURAS
MINERALIZADAS (em mg)

GRUPOS	Nº DE ANIMAIS	MANDÍBULA	TÍBIA	INCISIVO
I (Contrôle)	6	235,08 ± 15,34	380,51 ± 26,06	166,45 ± 4,14
II (Contrôle) NaF	6	300,79 ± 3,77	464,49 ± 11,75	180,74 ± 3,01
III (Experimental)	6	296,06 ± 7,80	443,91 ± 6,39	172,26 ± 3,96

TABELA 7 - CONCENTRAÇÃO DE FLÚOR NAS DIFERENTES ESTRUTURAS
MINERALIZADAS (em ppm)

GRUPOS	Nº DE ANIMAIS	MANDÍBULA	TÍBIA	INCISIVO
I (Contrôle)	6	24,03 ± 1,28	30,38 ± 2,80	14,01 ± 1,41
II (Contrôle) NaF	6	193,83 ± 5,33	186,79 ± 8,15	116,03 ± 4,28
III (Experimental)	6	69,57 ± 1,32	71,06 ± 6,19	34,99 ± 3,97

TABELA 8 - FLÚOR TOTAL (mg) NAS DIFERENTES ESTRUTURAS MINERALIZADAS

GRUPOS	Nº DE ANIMAIS	MANDÍBULA	TÍBIA	INCISIVO
I (Contrôle)	6	0,00561 ± 0,00033	0,01145 ± 0,00119	0,00231 ± 0,00021
II (Contrôle) NaF	6	0,05793 ± 0,00196	0,08652 ± 0,00237	0,02099 ± 0,00187
III (Experimental)	6	0,01874 ± 0,00106	0,03149 ± 0,00248	0,00599 ± 0,00037

TABELA 9 - FIXAÇÃO DO FLÚOR INGERIDO PELOS RATOS DOS DIFERENTES GRUPOS EXPERIMENTAIS
PELAS DIFERENTES ESTRUTURAS MINERALIZADAS, RESULTADOS PERCENTUAIS

GRUPOS	Nº DE ANIMAIS	MANDÍBULA	TÍBIA	INCISIVO
I (Contrôle)	6	0,849 ± 0,057	1,724 ± 0,138	0,335 ± 0,044
II (Contrôle) NaF	6	0,857 ± 0,035	1,283 ± 0,061	0,309 ± 0,023
III (Experimental)	6	0,273 ± 0,013	0,461 ± 0,042	0,087 ± 0,009

TABELA 10 - QUANTIDADE DE FÓSFORO DO ESMALTE DE MOLARES DISSOLVIDO PELO ÁCIDO
LÁCTICO 25 mM

GRUPOS	Nº DE ANIMAIS	HEMI - ARCO	PÊSO (mg)	FÓSFORO TOTAL DISSOLVIDO (mcg)	% DE DISSOLUÇÃO
I (Contrôle)	6	S.D.*	26,43 ± 1,200	68,93 ± 3,281	0,261 ± 0,012
		I.D.**	27,45 ± 0,970	74,38 ± 4,393	0,271 ± 0,012
II (Contrôle) NaF	6	S.D.	28,32 ± 0,245	76,00 ± 3,280	0,268 ± 0,013
		I.D.	29,56 ± 0,263	75,76 ± 3,030	0,259 ± 0,009
III (Experimental)	6	S.D.	26,31 ± 0,285	79,79 ± 7,525	0,303 ± 0,008
		I.D.	28,16 ± 0,291	81,81 ± 1,010	0,290 ± 0,005

(*) S.D. - Superior Direito

(**) I.D. - Inferior Direito

TABELA 11 - QUANTIDADE DE FÓSFORO DO ESMALTE DE MOLARES DISSOLVIDOS PELO ÁCIDO
LÁCTICO 0,25 mM

GRUPOS	Nº DE ANIMAIS	HEMI - ARCO	PESO (mg)	FÓSFORO TOTAL DISSOLVIDO (mcg)	% DE DISSOLUÇÃO
I (Contrôle)	6	S.E.*	26,61 ± 0,210	1,87 ± 0,450	0,00691 ± 0,00015
		I.E.**	27,37 ± 0,950	1,92 ± 0,215	0,00698 ± 0,00014
II (Contrôle) NaF	6	S.E.	28,68 ± 0,205	2,43 ± 0,235	0,00848 ± 0,0008
		I.E.	28,67 28,67 ± 0,201	2,18 ± 0,390	0,00731 ± 0,00013
III (Experimental)	6	S.E.	26,44 ± 0,286	2,32 ± 0,163	0,00881 ± 0,0006
		I.E.	28,46 ± 2,480	1,74 ± 0,216	0,00613 ± 0,0007

(*) - Superior Esquerdo

(**) - Inferior Esquerdo

6 - COMENTÁRIOS ÀS TABELAS

6.1 - Análise dos animais do grupo O

Na tabela 1 apresentamos os resultados obtidos com os animais do grupo que foi sacrificado e analisado - ao início da experiência.

A finalidade destes resultados se deve ao fato - de que devemos conhecer o teor de flúor com o qual os animais iniciaram a experiência. Este resultado, deduzido da quêle obtido no final da experiência nos fornecerá a* quantidade de flúor armazenada pelo animal durante o período experimental.

6.2 - Primeira Experiência - feita com vistas ao exame da carcaça

6.2.1 - Crescimento dos animais, quantidade de ração e flúor ingerido

Na tabela 2 acham-se os valores médios referentes ao controle de pêso dos animais, durante o período experimental, assim como os dados sôbre o consumo médio de ração e flúor.

O gráfico I apresenta também os resultados expostos na tabela 1, com excessão ao que diz respeito ao consumo de flúor.

Pela análise estatística dos resultados médios obtidos entre os diferentes grupos experimentais, verificamos que o pêso inicial dos animais, assim como o pêso

final e o ganho de peso, não apresentaram diferenças estatisticamente significantes.

Quanto ao consumo de ração, verificamos que os grupos I e II não apresentaram diferenças estatisticamente significantes, sendo, porém, significantes as diferenças entre os grupos I e III, II e III ($P < 0,05$).

Os resultados médios obtidos relativos ao consumo de flúor mostraram diferenças significantes quando comparados aos grupos I e II, I e III ($P < 0,01$). A diferença obtida entre os grupos II e III não foi significativa ($P > 0,5$).

6.2.2 - Análise da Carcaça

A tabela 3 apresenta os resultados médios referentes ao pêso das carcaças dos animais, os pêsos das mesmas, sêcas e desengorduradas, o teor percentual de água, lípidos e resíduo sêco e desengordurado.

A análise estatística dos resultados obtidos - com nossa experiência, mostra que não existe nenhuma diferença estatisticamente significativa, quando comparamos entre si os grupos I e II, I e III e II e III.

6.2.3 - Fixação do flúor pela carcaça

Na tabela 4 estão expostos os resultados relativos à fixação do flúor na carcaça dos animais: o flúor inicial, o flúor total, o aumento no teor de flúor, assim como o percentual de fixação pela carcaça do flúor ingerido.

A análise estatística da tabela 4 mostra a existência de uma diferença significativa ($P \leq 0,01$) com relação à concentração de flúor na carcaça, quando comparamos os diversos grupos experimentais entre si.

Com relação ao flúor inicial dos animais, a análise estatística não demonstrou diferenças significativas.

O teor médio de flúor total dos animais dos diferentes grupos experimentais, mostra diferenças, estatisticamente significantes, em todos os grupos; isto também pode ser dito com relação ao aumento de flúor e sua fixação percentual.

6.3 - Segunda Experiência - realizada para estudo da fixação do flúor, por estruturas mineralizadas e de consequência dessa fixação.

6.3.1 - Crescimento dos animais, quantidade de ração e flúor ingerido

Na tabela 5 estão expostos os valores médios referentes ao pêso dos animais durante o período experimental, assim como os dados sobre o consumo médio de ração.

O gráfico II apresenta os resultados expostos - na tabela 5, no que tange ao crescimento dos animais e ao consumo de ração.

A análise estatística da tabela 5 demonstrou - não existir diferença significativa quanto ao pêso inicial dos animais dos grupos I e II ($P \geq 0,05$); I e III ($P \geq 0,05$); II e III ($P \geq 0,05$); todavia o pêso final dos ratos dos diferentes grupos experimentais, foi estatisticamente diferente ($P < 0,01$).

Relativamente ao ganho de pêso, notamos uma diferença estatisticamente significativa quando comparamos os grupos I e II ($P < 0,01$), fato não existente para os grupos I e III ($P \geq 0,2$) II e III ($P \geq 0,05$).

Analisando os resultados obtidos para o consumo de ração verificamos que houve diferenças pronunciadas entre os grupos I e II ($P < 0,01$) e I e III ($P < 0,01$), porém, entre os grupos II e III a diferença não foi esta-

tisticamente significativa ($P \leq 0,05$).

Resultados semelhantes foram obtidos quando analisamos, estatisticamente, as diferenças médias obtidas do flúor ingerido.

6.3.2 - Pêso de diferentes estruturas mineralizadas, secas e desengorduradas

Na tabela 6, são apresentados os resultados médios de pêso da mandíbula, tíbia e incisivos de ratos dos diferentes grupos experimentais, sêcos e desengordurados.

A análise estatística da tabela 6 demonstrou haver uma diferença significativa ($P < 0,01$) com relação ao pêso da mandíbula quando comparamos os grupos I e II, ~~I~~ I e III; quando, porém, comparamos os grupos II e III a diferença não foi significativa ($P > 0,1$).

As diferenças obtidas com a tíbia demonstraram-se significantes quando comparamos os grupos I e II - ($P < 0,01$) e I e III ($P < 0,02$) e não foram signifi-cantes quando comparamos os grupos II e III ($P > 0,05$).

Para os incisivos, a única diferença estatísticamente constatada foi aquela existente entre os grupos I e II ($P < 0,02$).

6.3.3 - Concentração de flúor nas estruturas mineralizadas

Na tabela 7, encontram-se os resultados referentes à concentração de flúor (ppm) em diferentes estruturas mineralizadas, a saber: mandíbulas, tíbias e incisivos dos animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais.

A análise estatística da tabela 7 demonstrou - que as diferenças obtidas entre os diversos grupos experimentais (I e II, I e III, II e III) são significantes - ($P < 0,01$) tanto para a mandíbula como para a tíbia e incisivos.

6.3.4 - Flúor total nas diferentes estruturas mineralizadas, selecionadas, de ratos dos vários grupos

Na tabela 8 estão expostos os resultados médios obtidos para o flúor total das diferentes estruturas mineralizadas, dos ratos dos diferentes grupos experimentais.

A análise estatística da tabela 8 demonstrou - que são significativas ($P < 0,01$) as diferenças obtidas ao compararmos as mesmas estruturas mineralizadas dos animais dos vários grupos.

6.3.5 - Fixação de flúor por diferentes estruturas mineralizadas

Na tabela 9 acham-se os resultados médios percentuais de fixação do flúor, por diferentes estruturas mineralizadas. A fixação mantém relação com o teor de ingestão do elemento.

A análise da tabela 9 demonstrou existir uma diferença significativa para o caso da tíbia, quando as comparamos em todos os grupos experimentais; para a Mandíbula e incisivos, não foi observada uma diferença significativa quando os comparamos entre si, nos grupos I e II; nos outros grupos (I e III) e (II e III) a diferença foi significativa ($P < 0,01$).

6.3.6 - Solubilidade em ácido láctico 25 mM do fósforo do esmalte de molares

Na tabela 10 acham-se os resultados relativos - aos molares dos hemi-arcos superior direito (S.D.) e inferior direito (I.D.) no que tange a:

- 1 - Pêso dos molares dos hemi-arcos;
- 2 - Quantidade total de fósforo dissolvido por uma solução 25 mM de ácido láctico;
- 3 - Teor percentual de fósforo dissolvido pela solução de ácido láctico 25 mM.

A análise estatística dos resultados obtidos - com essa experiência, demonstrou existir uma diferença - significativa entre o teor percentual de fósforo dissolvido nos grupos I e III ($P < 0,02$) e II e III ($P < 0,05$) para o hemi-arco superior direito.

No caso do hemi-arco inferior direito, a diferença foi estatisticamente significativa somente no caso dos grupos II e III ($P < 0,02$).

Resultados estatisticamente semelhantes foram obtidos para o total de fósforo dissolvido.

6.3.7 - Solubilidade em ácido láctico 0,25 mM do
fósforo do esmalte de molares

Na tabela 11 acham-se os resultados relativos - aos molares dos hemi-arcos superior esquerdo (S.E.) e inferior esquerdo (I.E.) no que tange a:

- 1 - Pêso dos molares dos hemi-arcos;
- 2 - Quantidade total de fósforo dissolvido por uma solução 0,25 mM de ácido láctico;
- 3 - Teor percentual de fósforo dissolvido pela solução de ácido láctico 0,25 mM.

Pela análise estatística dos resultados médios obtidos, verificamos que não houve diferenças significativas quando comparamos os diversos grupos experimentais entre si, para o teor percentual de fósforo dissolvido.

Resultado estatisticamente semelhante foi obtido no que se refere ao total de fósforo dissolvido.

*

*

*

7 - DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

A análise dos resultados obtidos no presente trabalho demonstra que o flúor, tanto fornecido pelo lambari, como aquêle fornecido pelo fluoreto de sódio, fixa-se na carcaça dos animais de experimentação por nós usados, assim como em algumas estruturas mineralizadas, uma vez que, tanto o grupo de animais que recebeu ração adicionada de fluoreto de sódio, como aquêle cuja ração continha o flúor fornecido pelo lambari (sêco e desengordurado), apresentaram resultados significativamente superiores aos do grupo de ratos que recebeu apenas o flúor natural da ração,

Já foi anteriormente demonstrado por [LEE & NILSON²⁹(1939), JACKSON et alii²⁰(1950), POURCHET-CAMPOS⁴⁵(1953), MUHLER & STOOKEY⁴⁰(1960), ZIPKIN et alii⁶²(1969)], que os animais de experiência fixam em maior proporção o flúor proveniente de compostos puros que o originário de alimentos, tais como chá, ostras, leite, peixes ou, mesmo, farinha de osso.

O flúor total, encontrado em certas estruturas mineralizadas do organismo animal, parece depender do crescimento do mesmo. Já anteriormente, foi demonstrado que animais tireoidectomizados ZUCAS⁶⁴(1965) ou com hipofunção tireoidiana, induzido pela ingestão de tiouracil na dieta ZUCAS et alii⁶⁷(1969), ou hipofisectomizado ZUCAS et alii⁶⁶(1969), apresentavam no fêmur teor de halogênio superior àquele encontrado em animais contrôles. ZIPKIN et alii⁶¹(1959) demonstraram fato semelhante com re-

lação a ratos submetidos à uma dieta raquitogênica. Os resultados obtidos por estes autores demonstram que o total de flúor retido pelos animais raquíticos é inferior aos resultados dos animais controle, e que o crescimento dos animais é fator importante na fixação do flúor.

Em nossa experiência este fato não pode ser perfeitamente evidenciado. Efetivamente os nossos animais apresentaram crescimento normal na primeira experiência.- Na segunda, embora outras diferenças tenham sido observadas no ganho de peso dos animais, não se apresentou suficiente para comprovar os resultados quer de ZUCAS⁶⁴(1965) quer de ZIPKIN et alii⁶¹(1959).

Também, pudemos verificar, que as concentrações de flúor, assim como o teor de flúor total e o teor percentual fixado são diferentes quando comparadas a tíbia com a mandíbula, ou estas com os incisivos. No primeiro caso a concentração de flúor parece depender do tipo de mineralização, enquanto nos outros, além do tipo de mineralização, também parece depender do crescimento.

Em trabalho realizado recentemente, ZIPKIN et alii⁶²(1969) verificaram que o aproveitamento biológico do flúor de concentrados proteicos de peixe é de apenas cerca de 1/4 quando considerada quer a carcaça quer certas estruturas mineralizadas, usando-se como padrão o flúor de fluoreto de sódio.

Já anteriormente LEE & NILSON²⁹(1939) afirmavam que o flúor fornecido por peixes era fixado em quantidade inferior àquele fornecido por compostos inorgânicos de flúor adicionados em rações.

Os resultados obtidos em nosso trabalho confirmam os de ZIPKIN et alii⁶²(1969) bem como os de LEE & NIL

da ração contrôlê (2,5 ppm) é proveniente do fosfato de cálcio, estando sob forma semelhante à da apatita. Esta hipótese está correta se compararmos os grupos I e III, verificando um aproveitamento superior do flúor ingerido para o caso do grupo I.

Parece que o organismo tende a eliminar mais rapidamente o excesso de flúor ingerido, portanto permitindo uma menor retenção pelo organismo, McClure et alii³⁵ (1945), mais especificamente pelos tecidos mineralizados, uma vez que, já sabemos que os tecidos moles, de um modo geral, não acumulam flúor SMITH et alii⁵⁰ (1960).

Como já referimos anteriormente, os tecidos mineralizados apresentam um paralelismo na fixação de flúor [JACKSON & WEIDMANN²¹ (1959), ZIPKIN⁵⁷ (1965)]. Também, já foi demonstrado, que o teor de flúor dos incisivos de ratos, é semelhante àquele encontrado em molares dos mesmos animais e que o flúor fixado no esmalte dental diminui a incidência de cárie, assim como, alguns autores admitem relação entre diminuição de incidência de cárie dentária com a diminuição da solubilidade em ácido, do mesmo esmalte [MUHLER et alii³⁹ (1954), BROWN & WALLACE² (1965)]. Se admitíssemos como correto o paralelismo entre os teores de flúor de incisivos e molares de ratos, assim como, que o flúor diminui a solubilidade em ácido do esmalte dental, seria lícito admitir que o grupo que recebeu sobrecarga de flúor na ração, assim como aquele grupo que recebeu o flúor proveniente do lambari, tivesse quantidade menor de fósforo dissolvido em uma solução ácida; tal fato porém, não foi verificado por nós em nenhuma das concentrações de ácido usadas para esse teste.

8 - CONCLUSÃO

1 - O flúor fornecido pelo lambari fixa-se tanto na carcaça como na tíbia, mandíbula e incisivos de ratos.

2 - A fixação do flúor fornecido pelo lambari é inferior àquela do halogênio fornecido sob a forma de fluoreto de sódio, nas mesmas proporções.

3 - O flúor fornecido pelo lambari não alterou significativamente a solubilidade, em ácido, do esmalte - de molares de ratos, quando comparada com os resultados - do flúor, fornecido sob a forma de fluoreto de sódio na ração.

*

*

*

9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS (*)

- 1 - BROWN, N. , ZUCAS, S.M. & ZIPKIN, I. - Comunicação - pessoal.
- 2 - BROWN, W.E. & WALLACE, B.M. - Phase rule considerations and the solubility of tooth enamel. Ann. N.Y.Acad.Sci., New York, 131 (2):690-693, sep., 1965.
- 3 - BRUDEVOLD, F. & McCANN, H.G. - Enamel solubility - tests and their significance in regard to dental caries. In: Agents used in prevention of oral disease: Ann.N.Y.Acad.Sci., New York, 153 (1): 20-51, dec., 1968.
- 4 - BUTTNER, W. & MUHLER, J.C. - A method for the determination of enamel solubility in intact rat molars using highly concentrated fluoride solutions. J.dent.Res., Chicago, 36 (6): 897-903, - dec., 1957.
- 5 - BUTTNER, W. & MUHLER, J.C. - The effect of a diet composed of barley and fish meal on dental caries in rats. J.dent.Res., Chicago, 37 (3):419-421, jun., 1958.
- 6 - CHAYET, C., MAILIS, G., VERDUGO, H., WIESNER, C. & DONOSO, G. - Efecto de la harina de pescado de consumo humano (Unicef-Chile-Quintero) sobre la caries experimental en la rata blanca. Nut. Bromatol.Toxicol., Santiago, 5 (1): 20-24, 1966.

(*) Segundo o P.N.B.-66 da Associação Brasileira de Normas Técnicas. Abreviaturas dos títulos e periódicos - segundo o World List of Scientific Periodical 4 rd. - ed., London, Butterworths, 1963.

- 7 - EIGEN, E., VOLPE, A.R., LAPEYROLERIE, F.M., WEISS, S.
& KING, W.J. - An in vivo technique for determining the effect of agents on enamel solubility in human subjects. Arch.oral Biol., Oxford, 8 (3): 459-460, may/jun., 1963.
- 8 - ELLIOT, C.G. & SMITH, M.D. - Dietary fluoride related to fluoride content of teeth. J.dent.Res., - Chicago, 39 (1): 93-98, jan/feb., 1960.
- 9 - EVANS, R.J. & PHILLIPS, P.H. - A new low fluoridediet and its effect upon the rat. J.Nutr., Philadelphia, 18 (4): 353-360, oct., 1939.
- 10 - von der FEHR, F.R. & STEINNES, E. - A method employing activation analysis for the study of human enamel solubility rates in vivo and in vitro. - Arch.oral Biol., Oxford, 11(12): 1393-1403, dec. 1966.
- 11 - FABRE, R. & POURCHET CAMPOS, M.A. - Contribution à l'étude de la repartition du fluor dans le monde végétal - I. Feuilles de Thé. Annls. pharm.-fr., Bruxelles, 8 (5): 391-397, mai., 1950.
- 12 - FINN, S.B. & DeMARCO, C. - The effect of artificial water fluoridation on the solubility of tooth enamel. J.dent.Res., Chicago, 35 (2): 185 -188, apr., 1956.
- 13 - FISKE, C.H. & SUBBAROW, Y. - The colorimetric determination of phosphorus. J.biol.Chem., Baltimore, 66 (2): 375-400, dec., 1925.
- 14 - GRAY, J.A. - Acid dissolution rate of sound and white spot enamel treated with tin (II) and fluoride compounds. J.dent.Res., Chicago, 44 (3): 499-501, may/jun., 1965.
- 15 - GREEN, R.M. & HARTLES, R.L. - A study of the effects of the topical applications of solutions and dentifrices containing fluorides on the incidence of caries and the surface solubility of the molar teeth of albino rat. Arch. oral Biol., - Oxford, 13 (1): 115-124, jan., 1968.

- 16 - HADJIMARKOS, D.M. - Fluoride in fish fluor-effect on teeth. J.Pediat., St.Louis, 65(5):782,784, nov., 1964.
- 17 - HEALY, W.B. & LUDWIG, T.G. - Enamel solubility studies on New Zealand teeth. N.Z. dent. J., Auckland, 62 (290): 276-278, oct., 1966.
- 18 - HOLMES, A.W. & MIDDLETON, J.D. - An in vivo method for the estimation of enamel solubility. Brit. dent. J., London, 113 (11): 380-386, dec., 1962.
- 19 - ISSÃO, MYAKI - Passagem transplacentária do flúor e sua quantificação nas estruturas mineralizadas de ratos recém nascidos (Rattus norvegicus var. albinus, Rodentia, Mammalia). São Paulo, Faculdade de Odontologia da U.S.P., 1968, 48 p. [Tese de Doutorado].
- 20 - JACKSON, S.H., TISDALL, F.F., DRAKE, T.G.H. & WIGHTMAN, D. - The retention of fluorine when fed as bone and as sodium fluoride. J.Nutr., Philadelphia, 40 (4): 515-535, apr., 1950.
- 21 - JACKSON, D. & WEIDMANN, S.M. - The relationship between age and the fluorine content of human dentine and enamel: A regional survey. Brit. dent.J., London, 107 (10): 303-306, nov., 1959.
- 22 - JENKINS, G.N. - Theories on the mode of action of fluoride in reducing dental decay. J.dent.Res., Chicago, 42 (1): 444-452, jan./Feb., 1963 (Supplement).
- 23 - KING, W.J., WEISS, S., VOLPE, A.R. & EIGEN, E. - In vivo tooth surface solubility studies. Ann.N.Y. Acad.Sci., New York, 131 (2): 713-726, sept., 1965.

- 24 - KOETS, C.C. - Dentition and nutrition at Tristan da Cunha. Dent.Abstr., Chicago, 1 (2): 120-121, - feb., 1956.
- 25 - KRASKE, L.M. & ZAHARAN, M. - Relationship of enamel solubility to caries experience. J. dent.Res., Chicago, 44 (6): 1413, nov./dec., 1965.
- 26 - LAJOLO, F.M., ZUCAS, S.M. & DOMINGUES, J.B. - Concentrados proteicos de sardinha e tilápia. Alguns dados sobre o seu valor alimentício. Ciência e Cultura, Porto Alegre, 21 (2): 517, jul., 1969. (Resumo p. 43).
- 27 - LAWRENZ, M. & MITCHELL, H.H. - The effect of dietary calcium and phosphorus on the assimilation of dietary fluorine. J.Nutr., Philadelphia, 22(1): 91-101, jul., 1941.
- 28 - LAWRENZ, M. & MITCHELL, H.H. - The relative assimilation of fluorine from fluorine-bearing minerals and food (tea), and from water, and food. - J.Nutr., Philadelphia, 22 (6): 621-631, dec., 1941.
- 29 - LEE, C.F. & NILSON, H.W. - Study of the metabolism of naturally occurring fluorine in canned salmon and mackerel. U.S.Department of Commerce - Bureau of Fisheries-Washington - Investigational Report nº 44. 1939, 15 p.
- 30 - MANTEL, N. - Rapid estimation of standard errors of small samples. The American Statistical Association, Washington, oct., 1951.
- 31 - MARTHALER, T.M. & ZILIO, R. - Enamel solubility - studies in vivo: Method, error and effect of topically applied fluorides. Helv.Odent. Acta., Zurich, 4 (1): 27-32, apr., 1960.
- 32 - McCANN, H.G. & BULLOCK, F.A. - The effect of fluoride ingestion on the composition and solubility of mineralized tissues of the rat. J.dent.Res., Chicago, 36 (3): 391-398, jun., 1957.

- 33 - McCLURE, F.J. - Fluorine in foods. Publ. Hlth. Rep., Washington, 64 (34): 1061-1074, aug., 1949.
- 34 - McCLURE, F.J. - Fluorine in food and drinking water. Dental health benefits and physiologic effects. J.Am.dent.Ass., Chicago, 29 (6): 560-564, jun. 1953.
- 35 - McCLURE, F.J., MITCHELL, H.H., HAMILTON, T.S., - KINSER, C.A. - Balances of fluorine ingested - from various sources in food and water by five young men. J.industr.Hyg., Baltimore, 27 (6): 159-170, jun., 1945.
- 36 - MEGREGIAN, S. - Rapid spectrophotometric determination of fluoride with zirconium-eriochrome - cyanine R lake. Analyt.Chem., Easton, 26 (7): 1161-1166, jul., 1954.
- 37 - MORLEY, C.W. & HOLMES, A.W. - In vivo assessment of tooth enamel solubility in acid. Br.dent.J., - London, 118 (2): 71-76, jan., 1965.
- 38 - MÜHLEMANN, H.R. & WOLGENSINGER, F. - In vivo reduction of enamel solubility in children using an organic fluoride dentifrice. Helv.Odont. Acta., Zurich, 3 (2): 35-39, oct., 1959.
- 39 - MUHLER, J.C., NEBERGALL, W.H. & DAY, H.G. - Studies on stannous fluoride and other fluorides in relation to the solubility of enamel in acid and the prevention of experimental dental - caries. J.dent.Res., Chicago, 33 (1): 33-49, - feb., 1954.
- 40 - MUHLER, J.C. & STOOKEY, G.K. - Metabolic availability of fluoride from oyster shells. J.dent.Res., Chicago, 39 (4): 858, jul./aug., 1960.
- 41 - NIZEL, A.E., KING, G., HARRIS, R.S. & NAVIA, J. - The effect of feeding fish protein concentrate - (FPC) in different amounts on caries development in rats. IADR Abstract., Abstr., 97, 1969.

- 42 - OPUSZYŃSKA, T. - Badania nad rolą maczki rybnej w profilaktyce próchnicy zębów u białych szczurów Roczn.panst.Zakl.Hig., Warszawa, T. XVII, NR 3, 289-294, 1966.
- 43 - PASE, U. - Effetto del fluoro sulla mobilitazione di calcio e fosforo da denti sani "in vitro". - Odontostomat., Bologna, 9 (1): 41-44, dec./fev., 1967.
- 44 - POURCHET-CAMPOS, M.A. - Teor de Flúor em chás cultivados em São Paulo. An.Fac.Farm.Odont.Univ. S. Paulo, São Paulo, 9 (): 57-59, , 1951.
- 45 - POURCHET-CAMPOS, M.A. - Contribuição para o estudo da fixação do flúor alimentar. An.Fac.Farm. - Odont.Univ.S.Paulo, São Paulo, 11 (): 93-148, 1953.
- 46 - POURCHET-CAMPOS, M.A. - Fatores de influência provável no aproveitamento biológico do flúor natural de alimentos. An.Fac.Farm.Odont.Univ.S.Paulo, São Paulo, 12 (): 143,147, , 1954.
- 47 - PU, M.Y. & LILIENTHAL, B. - Dental caries and mottled enamel among formosan children. Arch. oral Biol., Oxford, 5 (2): 125-136, 1961.
- 48 - SHANNON, I.L. & GIBSON, W.A. - Laboratory effectiveness of a two per cent stannous fluoride prophylaxis paste. Canad.dent.Ass., Toronto, 29 (7): 457-461, jul., 1963.
- 49 - SINGER, L., DALE, M.D. & ARMSTRONG, W.D. - Effects of high fluoride intake on utilization of dietary calcium and on solubility of calcified tissues. J.dent.Res., Chicago, 44 (3): 582-586, may/jun., 1965.
- 50 - SMITH, F.A., GARDNER, D.E., LEONE, N.E. & HODGE, H.C. - The effects of the absorption of fluoride. V. The chemical determination of fluoride in human soft tissues following prolonged ingestion of fluoride at various levels. A.M.A. Arch. Ind.-Health, 21 (1): 330-332, jan./jun., 1960.

- 51 - SOGNAES, R.F. & ARMSTRONG, W.D. - A condition - suggestive of threshold dental fluorosis observed in Tristan da Cunha. II Fluorine content of the teeth. J.dent.Res., Chicago, 20 (4): 315-322, aug., 1941.
- 52 - STEPHAN, R.M. - Anticariogenic effect of fish powder Supplements in experimental diets fed to rats.- IADR Abstract., Abstr., 100, 1969.
- 53 - VEERARACHAVAN, K.C. - Enquiry on the fluorine content of food stuff etc. J.All-India dent.Ass., Bombay, 37 (5): 151-156, may, 1965.
- 54 - WAGNER, M.J. & MUHLER, J.C. - The effect of calcium and phosphorus on fluoride absorption. J.dent.-Res., Chicago, 39 (1): 49-51, jan./feb., 1960.
- 55 - WAGNER, M.J. & WEIL, T.M. - Reduction of enamel - acid solubility with electrophoretic fluorides-applications. J.dent.Res., Chicago, 45 (5):1563-sept./oct., 1966.
- 56 - WALDBOTT, G.L. - Fluoride in food. Pak. dent. Rev., - Lahore, 16 (1): 36-45, jan., 1966.
- 57 - ZIPKIN, I. - Effects and metabolism of water-borne - fluoride in man. Sympos.Swed.Nutr.Found., 3 () :96-111, 1965.
- 58 - ZIPKIN, I. & LEGNE, N.C. - Rate of urinary fluoride output in normal adults. Am.J.Pub.Hlth, Ohio, - 47 (7): 848-854, jul., 1957.
- 59 - ZIPKIN, I. & McCLURE, F.J. - Deposition of fluoride in the bones and teeth of the growing rat. J. Nutr., Philadelphia, 47 (4): 611-619, aug., - 1952.
- 60 - ZIPKIN, I., LIKINS, R.C., McCLURE, F.J. and STEERE, A.C. - Urinary fluoride levels associated with the use of fluoridated waters. Publ.Hlth. Rep., Washington, 71 (8): 767-772, aug., 1956.

- 61 - ZIPKIN, I., LINKINS, R.C. & McCLURE, F.J. - Deposition of fluoride, calcium and phosphorus in experimental low-phosphorus richets. J. Nutr., Philadelphia, 67 (1): 59-68, jan., 1959.
- 62 - ZIPKIN, I. ZUCAS, S.M. & STILLINGS, B.R. - The biological availability of the fluoride of fish protein concentrate (FPC). No prelo.
- 63 - ZUCAS, S.M. - Valor nutritivo de trinta vegetais comestíveis do Brasil. III - Flúor. An.Farm.Quim. S.Paulo, São Paulo, 12 (11/12):169-172, nov./dez., 1961.
- 64 - ZUCAS, S.M. - Influência da tireoidectomia na fixação óssea do flúor. Rev.Fac.Farm.Bioquim. S. Paulo, São Paulo, 3 (2):343-361, jul./dez., 1965.
- 65 - ZUCAS, S.M. & LAJOLO, F.M. - Frasco de difusão para o isolamento de pequenas quantidades de flúor. Rev.Fac.Farm.Bioquim.S.Paulo, São Paulo, 6 (1): 33-34, jan./jun., 1968.
- 66 - ZUCAS, S.M., LAJOLO, F.M., DOMINGUES, J.B. & ZIPKIN, I. - Influência da hipófise no aproveitamento biológico do flúor em ossos de ratos. Ciência e Cultura. Porto Alegre, 21 (2): 500, jun., 1969- (Resumo, P-7).
- 67 - ZUCAS, S.M., LAJOLO, F.M., DOMINGUES, J.B. & ZIPKIN, I. - Influência do tiouracil no aproveitamento biológico do flúor em ossos de ratos. Ciência e Cultura, Porto Alegre, 21 (2): 500-501, jun., 1969. (Resumo, P-3).