

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

REGINA CÉLIA ROCHA PERES

CIRURGIÃ - DENTISTA

CARIOGENICIDADE DE DIFERENTES TIPOS DE LEITE:

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM FERRO

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre no programa de Pós-Graduação em Odontologia - Área de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica.

PIRACICABA - SP

2000

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

REGINA CÉLIA ROCHA PERES

CIRURGIÃ - DENTISTA

**CARIOGENICIDADE DE DIFERENTES TIPOS DE
LEITE: EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM FERRO**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre no programa de Pós-Graduação em Odontologia - Área de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen

Banca examinadora: Prof. Dra. Regina M. P. Rontani

Prof. Dra. Célia Regina M. D. Rodrigues

Este exemplar foi devidamente corrigido,
de acordo com a Resolução CCPG-036/83

CPG, 04/10/2000

Pedro Luiz Rosalen
Assinatura do Orientador

PIRACICABA - SP
2000

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE



UNIDADE 36
 L.º CHAMADA:
UNICAMP
P415c
 / Ex
 TOMBO BC/ 43165
 PROC. 06-278/00
 C ☐ D ☒
 PREÇO R\$ 11,00
 DATA 07/12/00
 N.º CPD _____



CM-00147245-1

Ficha Catalográfica

P415c Peres, Regina Célia Rocha.
 Cariogenicidade de diferentes tipos de leite: efeito da
 suplementação com ferro. / Regina Célia Rocha Peres. – Piracicaba
 SP : [s.n.], 2000.
 166p. : il.

Orientador : Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen.
 Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas,
 Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Cárie dental. 2. Leite. 3. Ferro. 4. Rato. I. Rosalen, Pedro
 Luiz. 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 Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de MESTRADO, em sessão pública realizada em 19 de Julho de 2000, considerou a candidata REGINA CÉLIA ROCHA PERES aprovada.

1. Prof. Dr. PEDRO LUIZ ROSALEN

2. Profa. Dra. CELIA REGINA MARTINS DELGADO RODRIGUES

3. Profa. Dra. REGINA MARIA PUPPIN RONTANI

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

*"Abrir o peito à força numa procura...
Fugir às armadilhas da mata escura...
Longe se vai, sonhando demais, mas, longe se chega sim,
Vou descobrir o que me faz sentir
Eu caçador de mim."*

Milton Nascimento

DEDICO ESTE TRABALHO,

À minha pequenina filha, **Júlia**, por ser a pessoa
mais preciosa que Deus pôs na minha vida.

Ao meu querido **Sérgio**, pelo amor,
apoio e incentivo.

Aos meus adoráveis pais, **Gilsa** e **Cícero**, por me ensinarem os
valores indispensáveis da vida: dignidade e perseverança.

Aos meus maravilhosos *irmãos*,
Ricardo (*in memorian*) e **Luciano**, que
são simplesmente a melhor expressão desta palavra.

Aos meus adoráveis avós maternos e avó paterna (*in memorian*),
e ao meu avô paterno **Manuel João da Rocha**

Com todo o respeito e carinho.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A **DEUS**, por ser a mais bela expressão da
força suprema que alivia nossas inquietações.

Ao Prof. Dr. **Pedro Luiz Rosalen**, minha mais profunda
e sincera gratidão pelos ensinamentos, apoio e
incentivo, essenciais à conclusão deste trabalho.

À **Luciane Cristina Coppi**, pela amizade
que nasceu durante o desenvolvimento
deste árduo trabalho apesar dos
imprevistos e dificuldades.

À **Eliane Franco e Simone Duarte**, pelo
auxílio indispensável durante os procedimentos do nosso
trabalho.

AGRADECIMENTOS

A todos os Professores do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, especialmente ao Prof. Dr. **Francisco Carlos Groppo** e à Profa. Dra. **Maria Cristina Volpato** pela ajuda dispensada nos períodos experimentais.

A todos os professores da Disciplina de Odontopediatria da FOP/UNICAMP, em especial à Profa. Dra. **Cecília Gatti**, pelo dedicado apoio.

À Srta. **Maria Elisa dos Santos**, secretária da Área de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica, pelo auxílio e disponibilidade.

Ao(s) Sr(s). **José Carlos Gregório, Waldomiro Vieira Filho, Wanderlei Francisco Vieira e Sérgio Amaral Campos** pela realização de procedimentos indispensáveis para a realização deste trabalho.

A todas as colegas da Farmacologia **Aline, Flávia, Juliana, Ynara, Roberta, Rosana, Ana Paula** por partilharem comigo as dificuldades e conquistas obtidas durante a realização deste trabalho.

À amiga **Edlange Lopes de Souza** pela longa amizade, compartilhando comigo alegrias e tristezas.

À amiga **Eneida Barros S. de Araújo**, pelas inúmeras vezes que estendeu sua mão amiga num apoio irrestrito.

Às bibliotecárias **Heloísa Maria Ceccotti** e **Marilene Girello** e à professora de estatística Dra. **Gláucia M. B. Ambrosano**, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

A todos, que direta ou indiretamente participaram da elaboração deste trabalho.

Este estudo foi subvencionado pela **Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** - processo nº. **98/04779-0**.

SUMÁRIO

	<i>página</i>
LISTAS	8
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	8
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	11
RESUMO	14
ABSTRACT	16
1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1. Microrganismos	22
2.2. Dieta e placa dental	26
2.2.1. Leite Bovino	28
2.2.2. Leite Humano	31
2.2.3. Leite Formulado	34
2.3. Ferro e Cárie Dental	37
2.3.1. Mecanismo de Ação do Ferro	40
3. PROPOSIÇÃO	44
4. MATERIAL E MÉTODO	45
4.1. Procedimentos Cirúrgicos	47
4.2. Experimento I	50
4.2. Experimento II	50
4.4. Preparo dos Leites	54
4.5. Análise Microbiológica	54
4.6. Determinação do índice de cárie	57
4.7. Análise Estatística	60
4.8. Determinação do perfil de Açúcares Presentes nos Leites	61
4.9. Determinação de Ferro Presente nos Leites	61
4.10. Determinação de Flúor Iônico Presente nos Leites e Soluções	62
4.11. Determinação do Índice de Cariogenicidade Relativa dos Leites	62
5. RESULTADOS	64
5.1. Experimento I	64
5.2. Experimento II	71
6. DISCUSSÃO	82
7. CONCLUSÃO	98
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100
9. ANEXOS	126

LISTAS

Lista das ilustrações

	página
Figura 01 Obtenção de esfregaço bucal, para verificação da infecção com <i>S. sobrinus</i> .	47
Figura 02 Ligação do ducto da parótida.	48
Figura 03 Remoção das glândulas sublinguais e submandibulares.	49
Figura 04 Entubação gástrica para administração de dieta líquida NCP#2.	52
Figura 05 Registro do consumo diário de líquidos.	53
Figura 06 Pesagem semanal dos animais.	53
Figura 07 Remoção da hemimandíbula esquerda	55
Figura 08 Suspensão da hemimandíbula em NaCl a 0,9%.	56
Figura 09 Sonicação das amostras.	56
Figura 10 Inoculação da suspensão em meio de cultura, utilizando máquina <i>Spiral Plater</i> .	57
Figura 11 Dissecção das mandíbulas e maxilas para o índice de cárie.	58

Figura 12	Maxilas e mandíbulas coradas com murexida 0,024%.	60
Gráfico 01	Média do ganho de peso (g) das ratas dessalivadas, após 21 dias experimentais. (Experimento I)	65
Gráfico 02	Média da quantidade de líquidos (mL) consumidos diariamente pelas ratas. (Experimento I)	66
Gráfico 03	Média da porcentagem de <i>S. sobrinus</i> recuperada da cavidade bucal de ratas que receberam diferentes tipos de leites. (Experimento I)	67
Gráfico 04	Média do ganho de peso (g) das ratas dessalivadas, após 21 dias experimentais. (Experimento II).	72
Gráfico 05	Média da quantidade de líquidos (mL) consumidos diariamente pelas ratas. (Experimento II).	73
Gráfico 06	Média da porcentagem de <i>S. sobrinus</i> recuperada da cavidade bucal de ratas que receberam diferentes tipos de leites. (Experimento II)	75
Tabela 01	Média (erro padrão) do ganho de peso (g) das ratas dessalivadas, após 21 dias experimentais. (Experimento I)	64
Tabela 02	Média (erro padrão) da quantidade de líquidos (mL) consumidos diariamente pelas ratas. (Experimento I)	65
Tabela 03	Média (Posto Médio)* da microbiota total, <i>S. sobrinus</i> e porcentagem de <i>S. sobrinus</i> recuperados. (Experimento I)	67
Tabela 04	Média (Posto Médio) do índice de cárie* do total de superfície lisa e severidade em ratas dessalivadas. (Experimento I)	68
Tabela 05	Média (Posto Médio) do índice de cárie* do total de sulco e severidade em ratas dessalivadas. (Experimento I)	70
Tabela 06	Média (erro padrão) do ganho de peso (g) das ratas dessalivadas, após 21 dias experimentais. (Experimento II)	72

Tabela 07	Média (erro padrão) da quantidade de líquidos (mL) consumidos diariamente pelas ratas. (Experimento II)	73
Tabela 08	Média (Posto Médio)* da microbiota total, <i>S. sobrinus</i> e porcentagem de <i>S. sobrinus</i> recuperados. (Experimento II)	74
Tabela 09	Média (Posto Médio) do índice de cárie* do total de superfície lisa e severidade em ratas dessalivadas. (Experimento II)	76
Tabela 10	Média (Posto médio) do índice de cárie* do total de sulco e severidade em ratas dessalivadas. (Experimento II)	77
Tabela 11	Açúcares (%) e Fe presentes nos leites avaliados.	79
Tabela 12	Flúor iônico (ppm) presente nos leites avaliados.	80
Tabela 13	Índice de cariogenicidade relativa dos leites.	81

Lista de abreviaturas e siglas

=	igual
<	menor
±	mais ou menos
&	e
%	por cento
°C	graus Celsius
λ	lâmbda
ADE	água destilada deionizada esterilizada
CEEA	Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEMIB	Biotério Central da Unicamp
CENA	Centro de Energia Nuclear da Agricultura da USP
Chem.	Chemistry (Química)
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
Co.	Corporation (Corporação)
Com.	Comércio
CO₂	dióxido de carbono
CR	cariogenicidade relativa
Dm	lesão moderada da dentina
Ds	lesão leve da dentina
<i>et al.</i>	e outros (abreviatura de <i>et alii</i>)
F	flúor
FDP	frutose 1,6-fosfato
Fe⁺⁺	Íon ferroso
FeSO₄	sulfato ferroso
FIG.	figura
FTF	frutossiltransferase
g	grama

GRAF.	gráfico
GTF	enzima glucosiltransferase
GTF-I	enzima glucosiltransferase produzida por <i>S. mutans</i> e <i>S. sobrinus</i>
GTF-SI	enzima glucosiltransferase produzida por <i>S. mutans</i>
h	horas
IB	Instituto de Biologia
Ind.	Indústria
Kg	Quilograma
Lab.	Laboratório
LDH	lactato desidrogenase
LMW	Low Molecular Weight (baixo peso molecular)
Ltda.	limitada
M	molar
mg	miligrama
mL	mililitro
mM	milimolar
Mg⁺⁺	magnésio
MSA	Ágar Mitis Salivarius
MSB	ágar Mitis Salivarius com bacitracina
MSS	Ágar Mitis Salivarius mais estreptomicina
NaCl	cloreto de sódio
NCP	nutrição essencial líquida
nm	nanômetro
nº	número
OMS	Organização Mundial da Saúde
PFL	piruvato formato-liase
pH	potencial hidrogeniônico

PIC	polissacarídeos intracelulares
PEC	polissacarídeos extracelulares
ppm	partes por milhão
<i>S. mutans</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
<i>S. sobrinus</i>	<i>Streptococcus sobrinus</i>
Sac	sacarose
seg	segundos
SP	São Paulo
spf	specific pathogen free (livre de patógenos específicos)
sup.	superfície
T	total
TAB.	tabela
u.f.c.	unidades formadoras de colônias
W	watts
WHO	World Health Organization (Organização Mundial da Saúde)

RESUMO

Os objetivos deste trabalho foram avaliar a cariogenicidade de diferentes tipos de leite e o efeito cariostático do ferro, quando suplementado em uma fórmula infantil. O trabalho foi dividido em dois experimentos, utilizando um modelo animal de cárie sujeito a um alto desafio cariogênico. Nos dois experimentos foram utilizadas ratas Wistar spf (*specific pathogen free*) infectadas com *Streptococcus sobrinus* e posteriormente dessalivadas. No experimento I, sessenta ratas foram divididas aleatoriamente em 6 grupos e colocadas em gaiolas suspensas individuais, onde receberam *ad libitum*: (1) água destilada e esterilizada (ADE) com 5% de sacarose; (2) leite bovino (Tipo A); (3) Leite Nan II[®] reconstituído com ADE; (4) Leite Nestogeno II[®] reconstituído com ADE; (5) Leite Ninho[®] coadjuvante de crescimento reconstituído com ADE; e (6) ADE. No experimento II, cinquenta ratas foram distribuídas em 5 grupos recebendo *ad libitum*: (1) ADE com 5% de sacarose; (2) leite humano; (3) Leite Ninho[®] coadjuvante de crescimento reconstituído com ADE; (4) Leite Ninho[®] coadjuvante de crescimento reconstituído com ADE suplementado com 88 ppm de ferro (FeSO₄); e (5) ADE. Ao final de 21 dias experimentais os animais foram sacrificados e avaliados quanto à microbiota oral recuperada e o índice de cárie pelo método de Keyes modificado por Larson (1981). Foi determinado o perfil de açúcares dos leites pelo método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), a concentração de Fe por absorção atômica e a concentração de flúor pelo método de microdifusão de Taves. Os resultados foram tratados estatisticamente através dos testes de Shapiro-Wilk e Kruskal-Wallis. No experimento I, o leite bovino se apresentou como o menos cariogênico entre os leites, enquanto o Ninho[®] o mais cariogênico. Quanto à porcentagem de *S. sobrinus* recuperada da cavidade bucal, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos,

exceto para o grupo ADE. No experimento II, o leite humano apresentou o menor potencial cariogênico, seguido do leite suplementado com ferro. Além disso, os resultados do experimento II mostraram que o ferro, quando adicionado a um leite formulado, foi capaz de reduzir o potencial cariogênico em 50,5% (superfície lisa), reduzindo também o número e a porcentagem de *S. sobrinus* recuperados da cavidade oral. Assim, utilizando o modelo de rato dessalivado, pôde-se concluir que os leites humano e bovino não apresentaram cariogenicidade significativa, diferentemente das fórmulas infantis, as quais apresentaram significativa potencial cariogênico, a exceção daquela enriquecida com ferro, cuja cariogenicidade foi reduzida. Este último dado sugere que a suplementação do leite com ferro pode ser um método preventivo nos dois maiores problemas de saúde pública como cárie e anemia ferropriva.

PALAVRAS-CHAVE: Cárie, leite, ferro, rata

ABSTRACT

The aims of this study were to evaluate the cariogenicity of different types of milk and the cariostatic effect of iron, when supplemented to an infant formula. The research was divided into two experiments using an animal model subjected to a high cariogenic challenge. In the both experiments female rats Wistar spf (specific pathogen free) were used. The animals were infected with *Streptococcus sobrinus* 6715 and dessalivated. In experiment I, sixty Wistar rats were randomly divided into 6 groups and placed in individual suspended cages, where they received *ad libitum*: (1) sterilized distilled water (SDW) with 5% sucrose; (2) cow milk; (3) Nan II® reconstituted with SDW; (4) Nestogeno II® reconstituted with SDW; (5) Ninho® growth supporting reconstituted with SDW; and (6) SDW. In experiment II, fifty were divided into 5 groups receiving *ad libitum*: (1) SDW with 5% sucrose; (2) human milk; (3) Ninho® growth supporting reconstituted with SDW; (4) Ninho® growth supporting reconstituted with SDW with 88 ppm of iron (FeSO₄); and (5) SDW. In the end of 21-experimental days, the animals were killed and evaluated according to recovered oral microbiota and caries score by using Keyes (1958) modified by Larson (1981). The analysis of the carbohydrates in the milks was performed by the use of High Efficiency Liquid Chromatography (HELC), the concentration of Fe was assessed by atomic absorption and concentration of F was analyzed using microdiffusion Taves' method. The results were statistically assessed through Shapiro-Wilk and Kruskal-Wallis. The results of experiment I showed that cow milk was the least cariogenic of all milks, whereas Ninho® presented the highest caries score. The percentage of *S. sobrinus* recovered from the oral cavity, there was no significant differences significant among the groups, except for the SDW group. In experiment II, human milk presented the lowest cariogenic potential, followed by iron-supplemented milk. In addition, the results of experiment II showed that iron when added to

ABSTRACT

formulated-milk was capable of reducing the cariogenic potential in 50,5% (smooth surface) as well as reducing the number and the percentage of *S. sobrinus* recovered from the oral cavity. Thus, the use of dessalivated rat model has shown that human and cow milks did not show a significant cariogenic potential, while infant formulas showed a significant cariogenic potential. Therefore, it is concluded that iron supplemented milk can be used in the prevention of two important problems in public health, caries and iron deficiency anemia.

KEYWORDS: Caries, milk, iron, rat

1. INTRODUÇÃO

O leite e seus derivados, importantes fontes de nutrientes, são consumidos em larga escala pela população mundial. Os efeitos desses compostos sobre os tecidos bucais têm sido avaliados há algumas décadas (SHAW *et al.*, 1959; MOR & MCDUGALL, 1977; REYNOLDS & JOHNSON, 1981; BOWEN & PEARSON, 1993; BOWEN *et al.*, 1997; ERICKSON *et al.*, 1998).

Vários estudos têm sido desenvolvidos no intuito de relacionar o consumo de leite bovino, materno e em fórmulas infantis com o aparecimento da cárie dental. A suplementação do leite bovino à dieta cariogênica parece inibir o desenvolvimento da cárie dental. Esse efeito provavelmente se deve à presença de substâncias com potencial cariostático como caseína, lipídios e enzimas antibacterianas (WEISS & BIBBY, 1966; JENKINS & FERGUSON, 1966; KOSIKOWSKI, 1970; VIANNA, 1971; REYNOLDS *et al.*, 1982; REYNOLDS & WONG, 1983; DEVER *et al.*, 1987; REYNOLDS, 1987; BOWEN *et al.*, 1991; BOWEN & PERSON, 1993). Com relação ao leite humano, apesar de alguns estudos defenderem a sua não cariogenicidade, à semelhança do leite bovino, ele tem sido relatado como responsável pelo aparecimento de cárie rampante, similar à cárie de mamadeira (KOTLOW, 1977; HACKETT *et al.*, 1984; ALALUUSUA, 1996a). Por outro lado, a utilização de leites formulados como suplementação nutricional de bebês e

crianças tem aumentado nos últimos anos, e o potencial cariogênico de algumas fórmulas tem sido evidenciado em estudos recentes (SHEIKH & ERICKSON, 1996; BOWEN *et al.*, 1997; ERICKSON *et al.*, 1998). No entanto, orientações de prevenção à cárie dental têm sido negligenciadas com relação ao consumo desse tipo de leite.

O leite pode ser utilizado como veículo para o ferro¹ e outros elementos essenciais para a dieta. A universalidade e importância nutricional desse alimento tem tornado a suplementação do leite com ferro um meio de prevenção racional e uma alternativa valiosa não só para a prevenção da anemia ferropriva como também da cárie dental, uma vez que esse metal apresenta propriedades cariostáticas (EMILSON & KRASSE, 1972; OPPERMANN & RÖLLA, 1980; BOWEN & PEARSON, 1992; ROSALEN *et al.*, 1996, MIGUEL *et al.* 1997 a, 1997b, 1997c).

Dessa forma, este trabalho se propôs a avaliar a cariogenicidade de diferentes tipos de leites e o efeito da suplementação com ferro, utilizando um modelo animal de cárie sujeito a um alto desafio cariogênico.

¹ Ferro - termo genérico para definir as formas iônicas (ferroso ou férrico) ionizável e não ionizável do elemento químico ferro.

2. REVISÃO DA LITERATURA

A cárie é uma doença infecto-contagiosa de caráter multifatorial, que resulta em uma perda localizada de minerais nos dentes afetados, causada por ácidos orgânicos provenientes da fermentação microbiana dos carboidratos da dieta (KEYES, 1960, 1962; LOESCHE, 1982). Para o controle e eliminação dessa doença, o tratamento sintomático restaurador é ineficaz e apresenta um custo extremamente elevado, sendo inviável sua aplicação em programas de saúde pública (AXELSSON & LINDHE, 1981; LOESCHE, 1986). Em algumas faixas da população ocidental, tem sido notado um declínio da incidência de cárie dental, porém, em alguns grupos, a cárie continua sendo um problema de saúde pública. MILNES, em 1996, relatou em uma revisão de literatura a existência de diversos trabalhos sobre prevalência e epidemiologia de cárie de mamadeira. Nesse trabalho, o autor relata que, em países desenvolvidos, a prevalência varia de 1 a 12%. Entretanto, em países em desenvolvimento e em populações de baixa renda de países desenvolvidos a prevalência da cárie pode atingir índice acima de 70% em crianças da pré-escola, ressaltando a marcante necessidade da instituição de medidas preventivas com o objetivo de controlar os fatores etiológicos da cárie de mamadeira (DEMERS *et al.*, 1990; BAEHNI & GUGGENHEIM, 1996).

Com o advento e a crescente utilização do flúor, assim como a implantação dos programas preventivos de saúde bucal, houve uma mudança no perfil epidemiológico em que se observou uma diminuição crescente da incidência da cárie dentária em alguns países industrializados e desenvolvidos (MOREIRA *et al.*, 1983; MARTHALER, 1990; VEHKALAHTI *et al.*, 1991; ZADIK *et al.*, 1992). No Brasil, devido às ações preventivas de saúde bucal e aos programas de esclarecimento, foi observada uma queda de 52% no índice de CPOD, aos 12 anos de idade, no período entre 1986 e 1996 (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1996). Embora esse número não se encontre entre os maiores do mundo, ainda há muito a se propor para a prevenção da cárie no Brasil com o objetivo de reduzir a incidência e prevalência da cárie, como forma de proteção principalmente a indivíduos expostos a fatores de risco.

Nesse sentido, crianças que recebem a alimentação adicionada de sacarose, através de mamadeiras, principalmente durante o período noturno, constituem um dos grupos de alto risco à cárie (WALTER *et al.*, 1987; MORITA *et al.*, 1993; MATTOS-GRANER *et al.*, 1996, 1998). Em Londrina, PR, MORITA *et al.* (1993) observaram que cerca de 10% das crianças com 12 meses de idade apresentaram cárie, sendo que essa porcentagem aumentou para 50% entre as crianças com 36 meses de idade. Em creches do município de Piracicaba – SP, observou-se que apenas 6% de 322 crianças de 6 a 36 meses de idade foram responsáveis por 46% de todas as lesões de cárie diagnosticadas (MATTOS-

GRANER *et al.*, 1996). Esses estudos e outros (FREIRE *et al.*, 1996; TOMITA *et al.*, 1996; BARRETO, 1998) enfatizam a necessidade de identificação de crianças de alto risco de cárie dental nessa faixa etária. Essas crianças apresentam uma incidência muito alta de cárie denominada cárie de mamadeira, que se constitui num problema de saúde pública, devido à dificuldade de aplicação de medidas preventivas (MACIEL *et al.*, 1993; MILNES, 1996). Segundo GUEDES-PINTO (1995), ARAÚJO *et al.* (1998), o potencial cariogênico do açúcar é aumentado pela diminuição do fluxo salivar e dos movimentos musculares durante o período noturno, levando a um conseqüente aumento da microbiota bacteriana, de sua metabolização e produção de ácidos orgânicos, favorecendo a desmineralização sem a influência físico-química da saliva. A cárie de mamadeira parece estar fortemente associada à infecção por estreptococos mutans sobre as superfícies dos dentes. Diversos autores relataram que 60% da população microbiana da placa dental pode ser composta de *Streptococcus mutans* e que a sacarose presente na dieta favorece o crescimento de colônias de *S. mutans*, aumentando a susceptibilidade do indivíduo à formação da cárie (VAN HOUTE *et al.*, 1982; BERKOWITZ *et al.*, 1984; CAUFIELD *et al.*, 1993; BOWEN, 1998; MATTOS-GRANER *et al.*, 1998).

2.1. Microrganismos

S. mutans são os principais microrganismos envolvidos na etiologia da cárie dental, reunindo características suficientes para torná-los capazes de colonizar, se acumular nos dentes e induzir cárie dental, de acordo com vários pesquisadores (LOESCHE, 1986; TANZER, 1992; CAUFIELD, 1997). Muitos estudos clínicos não identificaram quais estreptococos do grupo *mutans* estavam associados com a etiologia da cárie, porém em estudos epidemiológicos os *S. mutans* representam 74% a 100% dos microrganismos em diversas populações (LOESCHE, 1986). Os *S. mutans* são os primeiros estreptococos do grupo *mutans* a colonizarem a cavidade bucal de crianças após erupção dos dentes. Em 1983, ALALUUSUA & RENKONEN observaram, em um estudo, que apenas os *S. mutans* foram isolados de crianças com cárie-ativa, e em 1996b, ALALUUSUA *et al.*, ao avaliarem a diversidade genética de *S. mutans* em crianças livres de cárie e crianças com cárie de mamadeira, observaram que aquelas com maior atividade de cárie apresentaram maior diversidade de clones de *S. mutans*. *Streptococcus sobrinus* é o segundo mais comum microrganismo do grupo *mutans* isolado e, da mesma forma que os *S. mutans*, tem sido extensivamente estudado em modelos de animais roedores porque a relação entre dieta contendo sacarose, formação de placa e cárie dental pode ser associada com a presença ou ausência de várias glucosiltransferases (GTFs) e seus produtos glucanos (RÖLLA *et al.*, 1983; GIBBONS *et al.*, 1986; LOESCHE, 1986).

A caracterização dos estreptococos do grupo *mutans* (*S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. cricetus*, *S. rattus*, *S. macacae*) como agentes etiológicos importantes na cárie dental ocorre devido à sua acidogenicidade, sua relação direta com desenvolvimento de cárie em humanos e animais, sua presença em todas as placas dentais associadas às superfícies cárie-ativa dos dentes, além de apresentarem a capacidade de produzir polissacarídeos extracelulares e serem acidúricos, permitindo a metabolização de substratos em meio ácido e ganhando a competição com as demais bactérias. Os primeiros fatores de virulência considerados na identificação de microrganismos específicos envolvidos na cárie dental foram a acidogenicidade e aciduricidade (LOESCHE, 1986). Entretanto, relatos não indicam nenhuma relação entre a acidogenicidade ou aciduricidade e a atividade de cárie em cepas isoladas de humanos com altos e baixos índices de cárie dental (KÖHLER *et al.*, 1995). Sabe-se que quedas rápidas e constantes do pH da placa são prejudiciais à maioria dos microrganismos da placa dental e acabam por favorecer microrganismos acidúricos como *S. mutans* (BRADSHAW & MARCH, 1998), que atingem baixo pH final, sugerindo que a cariogenicidade da placa é dependente do aumento na proporção de organismos acidogênicos e acidúricos (VAN HOUTE *et al.*, 1991; VAN HOUTE *et al.*, 1996). A acidogenicidade das diferentes espécies do grupo *mutans* parece ser variável. DE SOET *et al.* (1991) observaram que *S. sobrinus* induz quedas mais rápidas e intensas do pH quando comparado com *S. mutans*. Variações na acidogenicidade em baixo pH

podem ainda ocorrer dentro de uma mesma espécie do grupo mutans. KÖHLER *et al.* (1995) observaram grandes diferenças na produção de ácidos em meio com pH controlado de 5,5 entre cepas de *S. mutans* isoladas de humanos, sendo que algumas das cepas mais acidogênicas de *S. mutans* produziram uma quantidade de ácido cerca de 5 vezes maior do que outras da mesma espécie. Embora alguns pesquisadores tenham detectado grandes variações na acidogenicidade entre cepas *S. mutans* isoladas de diferentes indivíduos, esses autores não foram capazes de correlacionar o potencial acidogênico com o número de lesões de cárie presentes nos indivíduos colonizados por esses microrganismos (DE SOET *et al.*, 1991; KÖHLER *et al.*, 1995).

Um outro fator de virulência considerado na identificação de microrganismos específicos envolvidos na cárie dental é a capacidade de sintetizar polissacarídeos extracelulares (PECs) de alto peso molecular (TANZER, 1992). Os *S. mutans* sintetizam polissacarídeos de glicose, denominados glucanos, e polissacarídeos de frutose, denominados frutanos. *S. sobrinus*, por outro lado, sintetizam apenas os glucanos (TANZER, 1992). Os glucanos são sintetizados por enzimas extracelulares denominadas glucosiltransferase (GTF), as quais hidrolisam as moléculas de sacarose e polimerizam as moléculas de glicose liberadas. Essas enzimas podem estar ligadas à superfície das células de *S. mutans* ou livres no meio extracelular (HAJISHENGALLIS & MICHALEK, 1999).

Estudos laboratoriais sugerem que a presença de sacarose aumenta a expressão de GTF por *S. mutans* (HUDSON & CURTISS, 1990). Outros estudos descrevem variações na expressão de GTF por cepas *S. mutans* isoladas de adultos (TOMITA, *et al.*, 1996) e crianças (ALALUUSUA *et al.*, 1997). Essas variações não se correlacionam positivamente com a incidência de cárie dental. ALALUUSUA *et al.* (1997) não identificaram relação positiva entre a atividade de cárie e a quantidade de GTF produzida por cepas *S. mutans* isoladas de crianças livres de cárie e com cárie de mamadeira, a despeito das extremas variações no consumo de sacarose observadas entre os grupos.

2.2. Dieta e placa dental

Hábitos alimentares inapropriados em crianças têm sido identificados como os principais fatores associados com desenvolvimento de cárie de mamadeira. A relação entre o consumo de açúcar e o desenvolvimento de cárie tem sido bem estabelecida em humanos (GUSTAFSON *et al.*, 1954; FROSTELL *et al.*, 1974; SCHEININ *et al.*, 1975). A cariogenicidade de qualquer alimento depende da composição do açúcar, do tempo que fica retido na boca e da frequência de uso (HAREL *et al.*, 1996). Inúmeros estudos são conduzidos com o objetivo de verificar o papel dos componentes da dieta no aparecimento da cárie dental. Os alimentos apresentam propriedades que podem modificar o próprio

potencial cariogênico, como retenção na cavidade bucal, textura do alimento, propriedades acidogênicas, efeito protetor dos ingredientes do alimento, efeito sobre a colonização bacteriana e quantidade e tipo da composição do carboidrato (FIRESTONE *et al.*, 1982; SGAN-COHEN *et al.*, 1988; MUNDORFF *et al.*, 1990; HAREL *et al.*, 1996). Por muitos anos, o açúcar foi o principal fator etiológico no desenvolvimento da cárie. Entretanto, outros fatores, como nutrição, número de refeições e lanches por dia, educação e motivação, uso do flúor de diversas fontes (colutório bucal, dentifrício, leite, suplementos e/ou água fluoretada), grupo sócio-econômico, etnia, higiene bucal, uso de métodos preventivos e outros adoçantes além da sacarose estão relacionados com a cárie dental (HAREL *et al.*, 1996).

O leite e seus derivados, comumente consumidos na dieta pela população, são essenciais na primeira infância, favorecendo o desenvolvimento dos aspectos nutricional, afetivo e imunológico (ARAÚJO *et al.*, 1998). No primeiro ano de vida, o leite é o alimento predominante da alimentação do bebê, quando representa 2/3 do valor calórico total de uma dieta equilibrada para um infante de até 2 anos de idade (CAMEROM & HOFVANDER, 1983; ORNELLAS & ORNELLAS, 1983). Todavia, informações sobre as propriedades cariostáticas e cariogênicas são controversas. Enquanto alguns estudos sugerem que o leite não apresenta potencial cariogênico, sendo até sugerido como substituto de saliva para pacientes com xerostomia (BOWEN *et al.*, 1991; BOWEN & PEARSON, 1993; HERÔD, 1994), outros estudos afirmam que o leite possui potencial cariogênico devido à presença

da lactose, que, quando fermentada, reduz o pH em torno de 5,0, favorecendo a desmineralização dental (ALBEY,1980; HACKETT *et al.*, 1984; RUGG-GUNN *et al.*, 1985; BIRKHED,1990). Além do mais, soluções de lactose têm sido associadas ao aumento da implantação bucal de bactéria, assim como da produção de ácido na placa dental (BIRKED *et al.*, 1981; SCHEMMEL *et al.*, 1982).

2.2.1. Leite Bovino

Entre os diversos tipos de leite, o leite bovino se destaca em produção e consumo e, por isso, merece maior atenção quanto aos efeitos na saúde da população. De forma geral, esse produto fornece proteínas (caseína, albumina), lipídeos, lactose (carboidrato fermentável), sais minerais, pequenas quantidades de vitaminas A e D, sendo uma rica fonte de vitamina B (riboflavina), cálcio (quatro vezes maior do que o leite humano) e diversos outros elementos como o ferro, flúor, iodo e enzimas, todos consideravelmente importantes para o nosso organismo (FLYNN, 1992; ARAÚJO *et al.*, 1998; PETTI *et al.*, 2000). Em relação à saúde bucal, deve ser enfatizado o potencial antibacteriano de várias substâncias encontradas no leite como a lisozima, lactoferrina, imunoglobulinas e peroxidase, que potencialmente podem afetar a microbiota bucal (KOSIKOWSKI, 1970), assim como o papel da vitamina D, caseína, cálcio e flúor no desenvolvimento e fortalecimento de ossos e dentes (WHITE, 1987). O leite bovino parece não ter

propriedades cariogênicas, visto que vários estudos experimentais mostraram que animais alimentados exclusivamente com leite não desenvolveram cárie (SHAW *et al.*, 1959; REYNOLDS & DEL RIO, 1984; BOWEN *et al.* 1991; GEDÁLIA *et al.*, 1991; KASHKER & TASKELL, 1992; CARBONEL *et al.*, 1995; BOWEN *et al.*, 1997; PETTI *et al.*, 2000). Existem também estudos, mostrando que a suplementação de leite à dieta cariogênica tem efeito protetor, inibindo o desenvolvimento da cárie dental devido aos seus componentes (SHAW *et al.*, 1959; JENKINS E FERGUSON, 1966; REYNOLDS E JOHNSON, 1981; BOWEN E PEARSON, 1993; ARAÚJO *et al.*, 1998). Vários autores mostraram que as fosfoproteínas, entre elas a caseína, contidas no leite são fortemente adsorvidas ao esmalte dental *in vitro*, inibindo a dissolução ácida e formando, com a gordura presente no leite, uma película protetora sobre essa superfície, prevenindo a ação microbiana (WEISS & BIBBY, 1966; REYNOLDS *et al.*, 1982; REYNOLDS & WONG, 1983; REYNOLDS, 1987; VACCA-SMITH & BOWEN, 1995). Muitos componentes da dieta como carboidratos, lipídios e proteínas podem ser incorporados à película salivar e afetar a atividade da glucosiltransferase (GTF) presente na superfície da película (VACCA-SMITH & BOWEN, 1995). Em um estudo *in vitro*, esses autores demonstraram que a caseína do leite reduz a adsorção da GTF sobre a hidroxiapatita, resultando numa menor produção de glucano. Toda caseína derivada do leite bovino comportou-se também como um potente inibidor da adesão de *Streptococcus sanguis* (OMZ 9), *S. sobrinus* (OMZ 176) e *S. mutans* (GS-5) sobre a hidroxiapatita, quando

comparada às outras proteínas, apesar de não interferir na fixação de *Actinomyces viscosus* Ny1, à semelhança de relatos em outros trabalhos (VACCA-SMITH *et al.*, 1994; GUGGENHEIM *et al.*, 1999). Esses resultados sugerem que a caseína tem efeito inibitório sobre os estreptococos orais, pois é capaz de interagir com a superfície da bactéria que está envolvida na adesão (NESSER *et al.*, 1994).

Alguns autores encontraram que interações entre bactéria e proteínas salivares podem resultar em adesão na superfície do esmalte envolvendo adsorção de proteínas salivares ou aglutinação, reduzindo, assim, a fixação das bactérias (ELLEN *et al.*, 1983; DOUGLAS, 1994). Estudos recentes apontam que micelas presentes no leite ou saliva podem facilitar a agregação e sedimentação de bactérias sobre a película dental e revelam que a formação da película pode ser influenciada pela composição da dieta (YOUNG *et al.*, 1997, 1999; VACCA-SMITH & BOWEN 2000a, 2000b). O leite bovino contém proteínas na forma de micelas de caseína. As micelas de caseína são formadas por 4 diferentes moléculas de caseína, que são fosfoproteínas largamente anfifílicas, exibindo propriedades que permitem a formação de muitos complexos estáveis com uma quantidade relativamente grande de fosfato de cálcio, alta afinidade pelos minerais do dente e representando o principal componente da película adquirida (NYVAD & FEJERSKOV, 1984; GUGGENHEIM *et al.*, 1994; RÖLLA & RYKKE, 1994; YOUNG *et al.*, 1997, 1999; VACCA-SMITH & BOWEN, 2000a). VACCA SMITH & BOWEN (2000b), num estudo *in situ*, ao avaliarem os efeitos do leite e kappa-caseína na

formação da película salivar sobre a hidroxiapatita, observaram largas estruturas semelhantes a micelas sobre discos de hidroxiapatita presentes na boca depois de bochechos com leite e kappa-caseína e ausência de bactérias. Nesse estudo, a atividade média da glucosiltransferase nos discos, após os bochechos com leite e kappa-caseína eram 45% e 67% menores que a atividade da glucosiltransferase nos discos presentes na boca após bochecho com água, respectivamente. Esses dados sugerem que o leite e kappa-caseína podem influenciar a formação da película *in vivo*.

Com base nesses relatos, muitos trabalhos procuram esclarecer o verdadeiro papel do leite bovino na saúde bucal, investigando a cariogenicidade e propriedades cariostáticas de seus componentes.

2.2.2. Leite Humano

O leite humano oferece duas vantagens para a criança: é a melhor fonte de alimentação para o recém-nascido e oferece considerável proteção contra infecção durante muitos meses, permitindo que a criança desenvolva sua própria defesa. A amamentação representa o fator inicial do bom desenvolvimento dentofacial, favorecendo a obtenção de uma oclusão dentária normal e conseqüentemente mastigação correta futura, num perfeito equilíbrio neuromuscular dos tecidos que envolvem o aparelho mastigatório (MOYERS,

1974). Esse tipo de leite contém basicamente os mesmos constituintes do leite bovino, no entanto, sua composição pode variar significativamente durante o período de lactação (LÖNNERDAL, 1986). O leite humano é um sistema nutricional e imunológico com adequados níveis de vitamina D para a saúde bucal da criança (WESTOVER *et al.*, 1989), sendo considerado um alimento não cariogênico (ARAÚJO *et al.*, 1995). No entanto, um excessivo período de amamentação materna foi relacionado com o desenvolvimento de cárie rampante que se manifesta inicialmente em incisivos superiores e posteriormente em molares superiores e inferiores (KOTLOW, 1977; ROBERTS, 1982; BRAMS & MALONEY, 1983; ALALUUSUA *et al.*, 1996a). Neste último trabalho, os autores ressaltam a importância da presença de contaminantes ambientais no leite materno e seu efeito na saúde bucal, associando a exposição de crianças normais a dióxidos, via leite materno, com a hipomineralização do primeiro molar permanente. Assim, um prolongado período de amamentação pode aumentar o risco de defeitos de mineralização pela interferência de contaminantes no desenvolvimento dental (LÖNNERDAL, 1986; ALALUUSUA *et al.*, 1996c).

RUGG-GUNN *et al.* (1985), ao compararem o efeito do leite humano, leite bovino, sacarose e lactose sobre o pH da placa (*in situ*) e dissolução do esmalte (*in vitro*), concluíram que o leite humano causou mais dissolução do esmalte do que o leite bovino (JOLLIFE, 1976; HACKETT *et al.*, 1984; THOMSON *et al.*, 1996), além de promover uma queda de pH levemente maior. Esse resultado

foi atribuído à maior concentração de lactose no leite humano e menor quantidade de proteína, que conseqüentemente não atuaria como um tampão contra a diminuição do pH da placa. Ao comparar os nutrientes dos leites humano e bovino, observou-se que a porcentagem de lactose entre os leites (7%-humano, 4%-bovino) justificava o maior potencial do leite humano de promover queda de pH (JOLLIFE, 1976; GARDNER *et al*, 1977). Além do mais, o leite bovino contém 3,3% de proteína, 0,12% de cálcio e 0,095% de fósforo, enquanto o leite humano apresenta 1,2%, 0,036% e 0,018% respectivamente de proteínas, cálcio e fósforo, evidenciando o potencial limitado para tamponar o ácido produzido a partir da quantidade de lactose presente. Entretanto, ARAÚJO *et al*, 1995, ao avaliarem o potencial cariogênico do leite humano *in situ*, concluíram que mesmo em altas condições de cariogenicidade (dente imaturo, retenção de placa, grande quantidade de substrato e ação limitada da saliva) o leite humano não foi considerado cariogênico quando, importante ressaltar, testados em esmalte de dentes permanentes. SPERB *et al*, 1997, ao avaliarem a cariogenicidade de diferentes tipos de leite, bovino, humano e formulados, concluíram que os leites bovino e formulado não apresentaram efeito anticariogênico e que o leite humano potencializou a cariogenicidade da dieta 2000a utilizada no experimento. Em um estudo recente, ERICKSON & MAZHARI (1999), com o objetivo de determinar o risco de cárie associado com o leite humano, avaliaram: o pH da placa de 18 crianças com 12-24 meses de idade, 5 minutos antes e depois da alimentação com

leite humano; número de colônias de *S. sobrinus* (ufc); solubilidade do esmalte; capacidade tampão do leite humano e colonização de *Streptococos mutans* em janelas criadas no esmalte de coroas de pré-molares extraídos e incubadas com leite humano. Os autores encontraram que o leite humano não promoveu uma queda de pH significativa quando comparado com água utilizada como bochecho; permitiu um crescimento bacteriano moderado; cálcio e fosfato foram de fato depositados sobre o esmalte pulverizado depois da incubação com leite humano; a capacidade tampão foi muito baixa e que a utilização apenas do leite humano não causou desmineralização do esmalte, mesmo depois de 12 semanas de exposição. Baseado nesses achados, os autores concluíram que o leite humano não é cariogênico. Estudos mais recentes, que comprovam a importância do papel das micelas na agregação de bactérias e adsorção das proteínas com alta afinidade pelo esmalte (YOUNG *et al.*, 1997, 1999; VACCA SMITH & BOWEN, 2000a), são relevantes na tentativa de explicar a não cariogenicidade do leite humano.

O leite humano, indiscutivelmente, representa fonte alimentar essencial para a saúde do infante. Apesar das controvérsias, várias campanhas têm sido desenvolvidas com objetivos de motivar e orientar a população sobre a importância da amamentação materna (WESTOVER *et al.*, 1989).

2.2.3. Leite Formulado

Apesar das vantagens que a amamentação oferece, muitas vezes o leite humano é substituído por leites formulados infantis. A utilização de leites formulados como suplementação nutricional de bebês tem aumentado nos últimos anos. Nesses leites, a composição do leite bovino é em geral alterada pela indústria, que acrescenta ou reduz componentes, originando o leite formulado de utilização em determinada época da vida do infante. Exemplos desses são os leites fortificados ou suplementados e conhecidos pelo teor diferencial de certos componentes, como: ferro, algumas vitaminas, ou pelo baixo teor de lactose e gordura. As fórmulas infantis são uma combinação sintética complexa de nutrientes, incluindo carboidratos fermentáveis. Existem diferentes fórmulas com diferentes fontes de carboidratos: lactose, xaropes de milho, sacarose e polímeros de glicose (SHEIKH E ERICKSON, 1996). Nesse estudo, ao avaliarem as mudanças de pH da placa dental com bochechos, utilizando oito diferentes fórmulas infantis, concluíram que todas as fórmulas tinham a capacidade de reduzir o pH significativamente quando comparado com o pH inicial, sendo, portanto, acidogênicos e tendo grande atuação no desenvolvimento da cárie de mamadeira.

Como suplemento energético, polímeros de glicose estão sendo acrescentados a fórmulas infantis, entretanto informações sobre o efeito desses componentes na saúde dental são praticamente inexistentes (MOYNIHAN *et al.*, 1996). Nesse estudo, ao investigarem a acidogenicidade dos polímeros de glicose a

10% em água, leite bovino e colágeno, frente à capacidade de redução do pH da placa dental associada à desmineralização do esmalte, os autores encontraram que os polímeros de glicose podem reduzir o pH da placa, portanto, podem estar associados a um aumento da cariogenicidade dos leites formulados, embora sejam menos cariogênicos que a sacarose.

A influência da composição do leite no desenvolvimento da cárie dental foi experimentalmente estudada por BOWEN *et al.* 1996 e 1997, utilizando ratos cirurgicamente dessalivados. Nesse último trabalho, os autores determinaram o potencial cariogênico de várias fórmulas infantis comumente utilizadas no mercado americano e compararam seus efeitos com aqueles observados em ratos tratados com soluções de sacarose, água destilada e leite bovino contendo 2% de gordura. Os resultados mostraram que algumas fórmulas infantis são altamente cariogênicas e que todas elas desenvolveram algum nível significativo de cárie. A solução de sacarose induziu alta destruição dental, enquanto os leites formulados testados foram classificados em baixa, moderada e alta capacidade de induzir cárie. Os resultados mostraram também a dificuldade em prever a cariogenicidade das fórmulas, baseando apenas no conteúdo de carboidratos, pois outros componentes como cálcio, fósforo, ferro e peptídeos podem influenciar a capacidade dos açúcares em produzir cárie. Nesse trabalho, os autores mostraram que os leites elaborados em fórmulas infantis apresentaram potencial cariogênico e

que formulações contendo baixa concentração de ferro foram as mais cariogênicas.

Em um estudo recente, ERICKSON *et al.* (1998), 26 fórmulas infantis foram testadas, analisando pH da placa dental, cultura de *S. sobrinus* e o índice de cárie, em humanos. Após a obtenção de resultados clínicos e radiográficos em 18 semanas, os autores concluíram que a maioria dos leites formulados reduziu o pH significativamente e alguns propiciaram grande crescimento bacteriano. Quanto ao índice de cárie (*in situ*) foi observada, em primeiro molar permanente extraído e em incisivo decíduo esfoliado, lesão de dentina em aproximadamente 3 semanas após o uso do leite formulado, enquanto o envolvimento pulpar se desenvolveu em 7 semanas (ERICKSON *et al.*, 1998).

3. Ferro e Cárie Dental

A alta cariogenicidade apresentada nos leites formulados com baixa concentração de ferro (BOWEN *et al.*, 1997) comprova experimentos anteriores, que mostram as propriedades cariostáticas do ferro disponível em solução para aplicação tópica (EMILSON & KRASSE, 1972) e também como componentes da dieta (EMILSON & KRASSE; 1972; OPPERMANN & RÖLLA, 1980; ROSALEN *et al.*, 1996; MIGUEL *et al.*, 1997a, 1997b, 1997c).

Antes mesmo dos relatos sobre o efeito cariostático do ferro, já se conhecia que esse íon é um mineral essencial ao organismo, servindo como cofator necessário para o funcionamento apropriado de enzimas e moléculas transportadoras de oxigênio como a hemoglobina e mioglobina (GUYTON, 1992). A deficiência de ferro na dieta alimentar causa a anemia ferropriva, que é uma das doenças mais comuns e prevalentes no mundo, inclusive nos países desenvolvidos, afetando principalmente mulheres adultas e crianças (COTRAN *et al.*, 1994). Segundo a Organização Mundial de Saúde, a anemia por deficiência de ferro afeta cerca de 2,5 bilhões de pessoas no mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1990). Na América Latina estima-se que 29% das crianças entre 6 e 12 anos sofrem de anemia (YIP, 1995). O requerimento diário de ferro para uma pessoa adulta está entre 1 e 1,5 mg. Levando-se em conta que apenas 15% do ferro ingerido é absorvido, a quantidade diária ingerida deve ser de 5 a 20 mg. Em crianças, durante os primeiros anos de vida, a reposição de ferro é especialmente crítica devido ao rápido crescimento dos ossos e expansão do volume sanguíneo. O combate à anemia carencial ferropriva, devido à sua elevada prevalência e conseqüências sobre o crescimento, desenvolvimento e mortalidade da população infantil, principalmente em menores de 2 anos, é hoje uma das prioridades para os profissionais responsáveis pelo planejamento de Programas de Nutrição em Saúde Pública (TORRES, 1982; DE MAEYER, 1989; TURCONI & TURCONI, 1992). Essa afirmação encontra respaldo político no compromisso assumido pelo Brasil e mais

159 países participantes da Conferência Internacional em Nutrição da FAO/OMS, em Roma, de reduzir a prevalência dessa patologia até o ano 2000 (INTERNATIONAL CONFERENCE ON NUTRITION, 1992).

O leite é um dos alimentos com a menor concentração de ferro (0,1 a 0,3 mg de ferro/1000 mL). De uma forma geral, a absorção do ferro varia de acordo com o indivíduo. O leite humano possui uma baixa concentração de ferro, que está ao redor de 0,3 mg/1000 mL, sendo esse nível reduzido durante o progresso da lactação (DOREA, 2000). Entretanto, possui melhor biodisponibilidade que o leite bovino, embora esse último contenha aproximadamente o dobro de ferro que o leite materno (COTRAN *et al.*, 1994). Os leites formulados fornecidos a nossa população contém em sua formulação o ferro, sendo considerado um bom veículo para prevenção da anemia durante a infância (GILL & VINCENT, 1997; BRAMHAGEN & AXELSSON, 1999). Entretanto, desconhece-se se na quantidade presente esse elemento exibe algum potencial cariostático.

Desse modo, a adição de ferro ao leite pode ser uma abordagem estratégica na prevenção da cárie de mamadeira, e também servir como suplementação desse íon à dieta em áreas onde a anemia ferropriva é um problema endêmico. Prevalência de anemia é drasticamente reduzida, quando ferro é dado à população de risco (LAYRISSE, 1985; DE MAEYER, 1989). Vários trabalhos têm mostrado que essa deficiência pode ser prevenida pela

suplementação deste íon aos alimentos (VITERI *et al.*, 1981, COOK E REUSSER, 1983; LAYRISSE, 1985, TROWBRIDGE *et al.*, 1993).

É importante ressaltar que, ao sugerir a fortificação do ferro ao leite, as características organolépticas desse alimento não podem ser alteradas, assim como a absorção do mineral. Além do mais, o custo do produto não deve ser afetado por essa implementação (VITERI *et al.*, 1981; COOK & REUSSER, 1983).

3.1. Mecanismo de Ação do Ferro

Embora o ferro seja essencial para o metabolismo da bactéria, existe evidência de que o mecanismo de ação do ferro envolva alterações nos microrganismos e inibição da produção de ácido na célula bacteriana. Acredita-se que esse metal inibe a formação da placa dental devido à sua propriedade anti-glicolítica, interferindo na acidogenicidade da placa (EMILSON & KRASSE, 1972; OPPERMANN & RÖLLA, 1980; DAVEY & EMBERY, 1992). EMILSON & KRASSE (1972) mostraram que o cloreto férrico e o sulfato ferroso, quando incluídos na dieta, na água e quando aplicados como solução tópica a 2% reduziam o índice de cárie em hamsters. Os trabalhos de BOWEN & PEARSON (1992), ROSALEN *et al.*, (1996) e MIGUEL *et al.*, (1997a, 1997b, 1997c), associando 88 ppm de ferro co-cristalizado com sacarose, também demonstraram redução do potencial cariogênico do açúcar, diminuindo o índice de cárie em 30%. Esses autores

demonstraram o efeito cariostático do sulfato ferroso e glicerofosfato férrico adicionados à sacarose, mostrando que fórmulas divalentes e trivalentes de ferro são igualmente capazes de reduzir o índice de cárie dental, porém foi observado que o ânion sulfato causou manchas de cor marrom metálica sobre a superfície dos dentes, indicando a precipitação do ferro inorgânico, enquanto o glicerofosfato não provocou coloração significativa (ROSALEN *et al.*, 1996; MIGUEL 1997a).

Estudos conduzidos em humanos sustentam a opinião de que o ferro tem efeito cariostático e tem sido encontrado em maior concentração no esmalte de indivíduos com baixo índice de cárie, quando comparado com indivíduos com alto índice (CURZON & CROCKER, 1978). Além disso, o conteúdo de ferro no esmalte parece aumentar com a idade (DERISE & RITCHEY, 1974), sem, no entanto alterar as propriedades do mesmo (FEATHERSTONE & NELSON, 1980).

Alguns trabalhos mostram que os processos de desmineralização e remineralização, aos quais os indivíduos estão constantemente submetidos, proporciona aumento do conteúdo de ferro no esmalte de áreas remineralizadas (CRAWFORD E DE BRUIN, 1983). Entretanto, parece improvável que qualquer efeito cariostático do ferro resulte no aumento de resistência do esmalte à desmineralização (FEATHERSTONE & NELSON, 1980).

O metabolismo da sacarose pela bactéria oral resulta na formação de polissacarídeos intracelular (PI) e extracelular (PE). Os PI sintetizados na placa

servem como reservatório de carboidratos (MAKINEN & PHILOSOPHY, 1972). Os PE são os principais constituintes da estrutura da placa dental. Além disso, atuam como uma barreira contra o tamponamento de ácidos da placa pela saliva (COLMAN *et al*, 1977; DIBBIN & SHELLIS, 1988). A síntese de PE, a partir da glicose, aumenta a cariogenicidade dos estreptococos orais (BOWEN, 1970; HAMADA & SLADE, 1980; MUNRO *et al*, 1991). Estreptococos mutans têm a capacidade de sintetizar glucanos e frutanos a partir da sacarose através da via glucosiltransferase (GTF) e frutosiltransferase (FTF). Esses dois grupos de enzimas anabólicas, juntamente com a dextranase e frutanase, formam um mecanismo complexo de síntese e hidrólise de PE. Tanto o Fe^{2+} quanto Fe^{3+} têm um efeito inibitório sobre a dextranase. A inibição da atividade da dextranase poderia inibir a formação de glucano insolúvel, o que induziria a uma atividade da placa menos acidogênica por alteração da colonização da mesma ou por permitir a difusão do tampão. Uma outra ação do ferro é proteger o sistema piruvato formato-liase (PFL) da inativação pelo oxigênio (ABBE 1982). Estreptococos mutans usam esse sistema como uma via alternativa para o metabolismo da glicose. A principal fonte de energia desses microrganismos é a via fermentativa do ácido láctico, usando a enzima lactato desidrogenase (LDH) (HILLMAN, 1978). Durante excesso de glicose, a LDH é ativada pelo aumento da frutose, 1,6 – fosfato (FDP) e a PFL é inibida. Inversamente, durante a ausência de glicose, FDP e outras enzimas diminuem de atividade, enquanto a PFL aumenta a atividade para produzir

formato, acetato, etanol e reduzido lactato. Esses ácidos são importantes durante a formação da cárie. Entretanto, o lactato tem baixo pka e os outros ácidos um elevado pka, o que significa que ácidos menos ionizados se difundem para dentro do esmalte para se dissociarem, resultando em menos perda de mineral do esmalte (MARGOLIS & MORENO, 1994).

O ferro pode ter um efeito sobre o metabolismo do açúcar na bactéria, por atuar sobre o transporte de membrana. Vários açúcares são transportados através da membrana por sistemas enzimáticos e seus receptores. Enzima II é uma enzima específica de membrana responsável pelo transporte de açúcar através da membrana e fosforilação. Essa enzima tem Mg^{2+} como um co-fator (KUNDIG & ROSEMAN, 1971; SATO *et al.*, 1981; RUSSELL, 1992). Tem sido sugerido que o ferro poderia interferir no transporte de glicose por competição com Mg^{2+} (OPPERMAN E RÖLLA, 1980).

Em resumo, relatos na literatura mostram que o ferro é capaz de reduzir a cariogenicidade da dieta. O mecanismo de ação é ainda desconhecido. Existe alguma evidência de que o mecanismo envolve alterações na microbiota e inibição da produção de ácido.

3. PROPOSIÇÃO

Tendo em vista os resultados conflitantes da literatura sobre o potencial cariogênico dos leites bovino e humano, assim como o aparente potencial cariogênico dos leites elaborados em fórmulas infantis e considerando o efeito anticariogênico e antianêmico do ferro, este trabalho apresenta duas proposições:

- 3.1 - avaliar e comparar o potencial cariogênico dos leites bovino (Tipo A), humano e elaborados em fórmulas infantis mais comuns no Brasil, identificando o leite mais cariogênico;
- 3.2 - avaliar o efeito da suplementação de ferro à formulação infantil considerada mais cariogênica, a partir do primeiro experimento.

4. MATERIAL E MÉTODO

Foram realizados dois experimentos, de acordo com cada objetivo proposto. Em cada experimento foram incluídas soluções de sacarose, como controle positivo e água, como controle negativo. Em ambos os experimentos foi utilizado o modelo de ratos dessalivados para desenvolvimento de cárie, sujeito a um alto desafio cariogênico (BOWEN *et al.*, 1986, BOWEN *et al.*, 1988a, b). O primeiro foi delineado para avaliar o potencial cariogênico do leite bovino com 2% de gordura e leites elaborados em fórmula infantil, e o segundo para avaliar o potencial cariogênico do leite humano e a efetividade da suplementação com ferro no leite em fórmula infantil, considerado mais cariogênico no experimento I. Ambos os experimentos utilizaram ratas dessalivadas infectadas com *S. sobrinus* e o período experimental foi de 21 dias. Os animais foram distribuídos nos grupos de forma aleatória e colocados individualmente em gaiolas suspensas de aço inox.

Foram utilizadas, no primeiro e segundo experimentos, respectivamente, 60 e 50 ratas Wistar, spf (specific pathogen free), com 19 dias de idade, agrupadas por ninhadas, provenientes do Biotério Central da UNICAMP, credenciado pela International Council For Laboratory Animal Science (ICLAS).

As ninhadas foram mantidas em condições de isolamento padrão e testadas inicialmente quanto à presença de estreptococos do grupo mutans (microbiota indígena) através de esfregaços nas superfícies dos dentes com

MATERIAL E MÉTODO

cotonete, que foram inoculados em ágar mitis salivarius - MSA (Difco Lab.) e ágar mitis salivarius mais bacitracina - MSB (200 unidades/mL, Difco Lab. e Sigma Chem. Co.), GOLD *et al.* (1973). As placas foram incubadas em atmosfera de 10% de CO₂, a 37°C, por 48 horas (BOWEN *et al.*, 1988a). Todos os animais estavam livres desse grupo de microrganismo, portanto estavam aptos ao experimento.

As ratas foram infectadas oralmente em três dias sucessivos com uma cultura de *S. sobrinus* 6715 (fase exponencial de crescimento), resistente à estreptomicina e reisolado de um rato dessalivado (BOWEN *et al.*, 1980, 1988b), sendo o inóculo preparado em caldo de baixo peso molecular (*Low Molecular Weight* – LMW), SCHILLING & BOWEN (1988). A fase exponencial da curva de crescimento do *S. sobrinus* foi estabelecida por meio de um espectrofotômetro (Spectronic 20, Bausch & Lomb) com um comprimento de onda de 700 nm. As infecções individuais foram realizadas, utilizando cotonete esterilizado embebido em cultura de *S. sobrinus*, em seguida foi realizado esfregaço nas superfícies dentárias de cada animal. Os animais receberam dieta 2000 com 56% de sacarose (Anexo 01) (KEYES & JORDAN, 1964) e água contendo 10% de sacarose *ad libitum* durante 7 dias, a fim de estabelecer e aumentar a infecção por *S. sobrinus*.

Com 23 dias de idade, foram realizados esfregaços nas superfícies dos dentes dos animais (FIG. 01) para a verificação da infecção por *S. sobrinus*, através de inoculação em ágar mitis salivarius mais estreptomicina – MSS (200 unidades/mL, Difco Lab. e Sigma Chem. Co.).

Tabela 3: Liberação diária de fluoretos em ppm pelo produto Vitremer

Corpos De prova	1 ° Dia	4 ° Dia	7 ° Dia	10 ° Dia	15 ° Dia	21 ° Dia
1	10,60	5,68	3,32	2,63	2,90	2,75
2	11,20	6,00	3,57	2,63	2,80	2,66
3	10,80	5,92	3,60	2,66	2,65	2,87
4	10,90	5,75	3,48	2,64	2,70	2,92
5	10,50	5,87	3,52	2,60	2,66	2,59
Média	10,80	5,84	3,50	2,63	2,74	2,76
Desvio Padrão	0,2739	0,1290	0,1096	0,0217	0,1064	0,1384

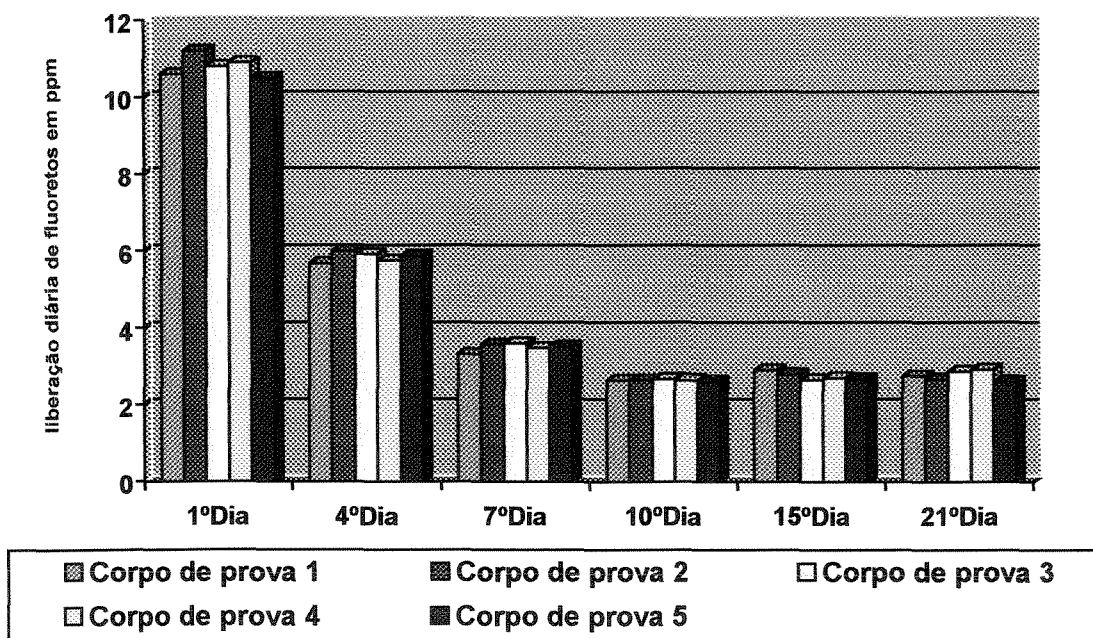


Figura 09: Ilustração gráfica da liberação diária de fluoretos do produto Vitremer

Tabela 4: Liberação diária de fluoretos em ppm pelo composto F2000

Corpos De prova	1 ° Dia	4 ° Dia	7 ° Dia	10 ° Dia	15 ° Dia	21 ° Dia
1	2,87	1,88	1,32	0,98	1,07	1,01
2	2,91	1,99	1,37	1,02	1,02	1,02
3	2,91	1,93	1,37	1,02	1,01	0,99
4	2,88	1,89	1,35	1,01	1,03	1,03
5	2,90	1,91	1,35	0,99	1,01	1,00
Média	2,89	1,92	1,35	1,00	1,03	1,01
Desvio Padrão	0,0182	0,0436	0,0205	0,0182	0,0249	0,0158

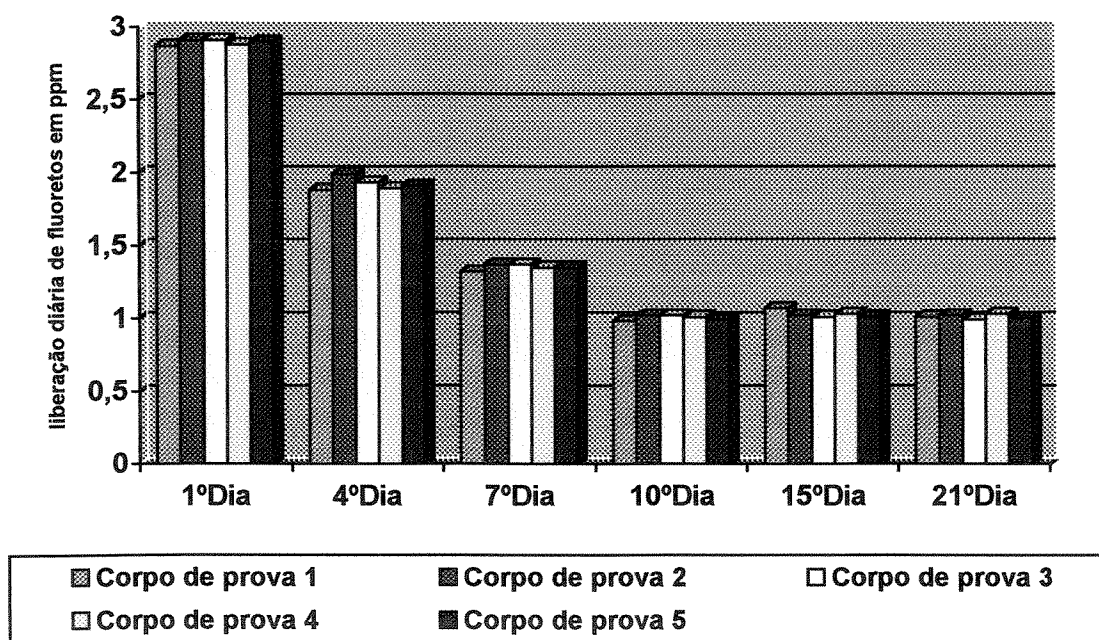


Figura 10: Ilustração gráfica da liberação diária de fluoretos do produto F2000

Tabela 5: Liberação diária de fluoretos em ppm pelo composto Dyract

Corpos De prova	1 ° Dia	4 ° Dia	7 ° Dia	10 ° Dia	15 ° Dia	21 ° Dia
1	1,06	0,74	0,6	0,54	0,58	0,51
2	1,07	0,76	0,62	0,56	0,60	0,48
3	1,09	0,77	0,61	0,58	0,60	0,52
4	1,08	0,75	0,63	0,57	0,57	0,58
5	1,07	0,74	0,59	0,53	0,53	0,56
Média	1,07	0,75	0,61	0,56	0,58	0,53
Desvio Padrão	0,0114	0,0130	0,0158	0,0207	0,0288	0,0400

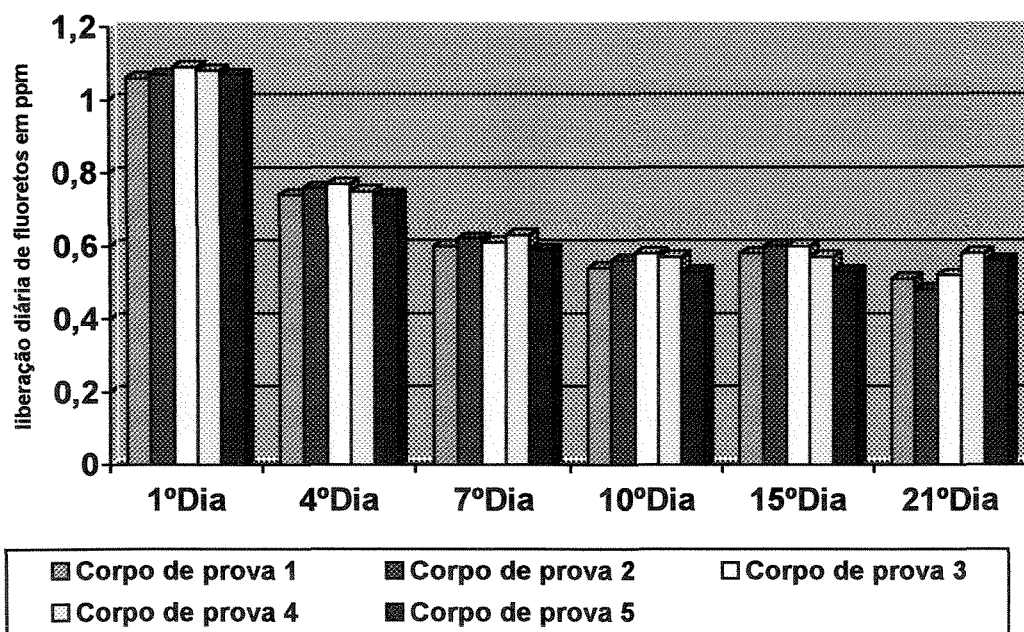


Figura 11: Ilustração gráfica da liberação diária de fluoretos do produto Dyract

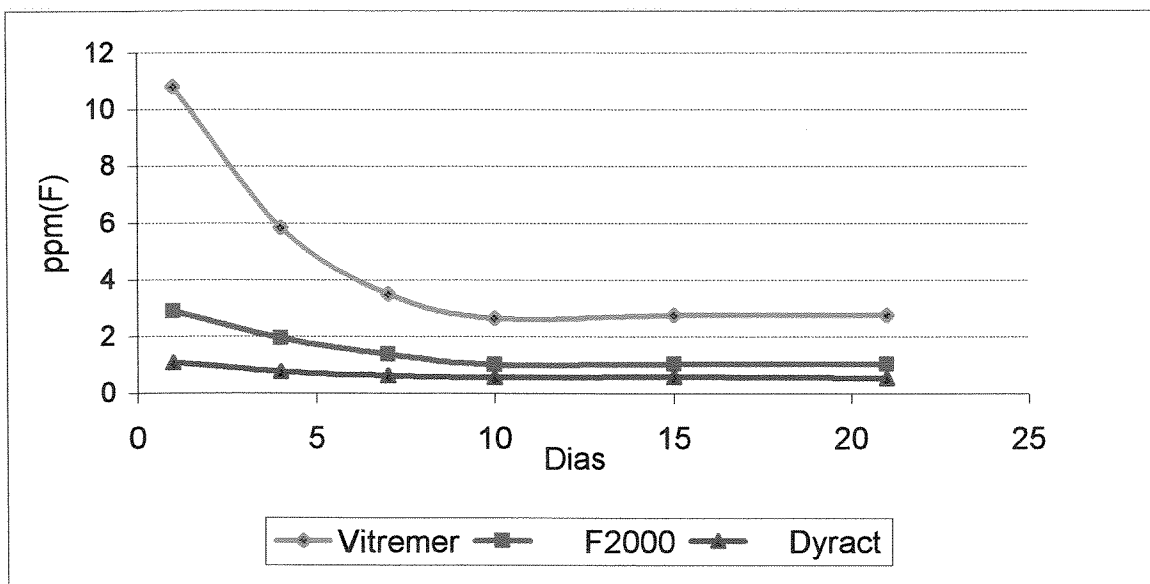


Figura 12 : Ilustração gráfica de regressão das médias de liberação de íons flúor.

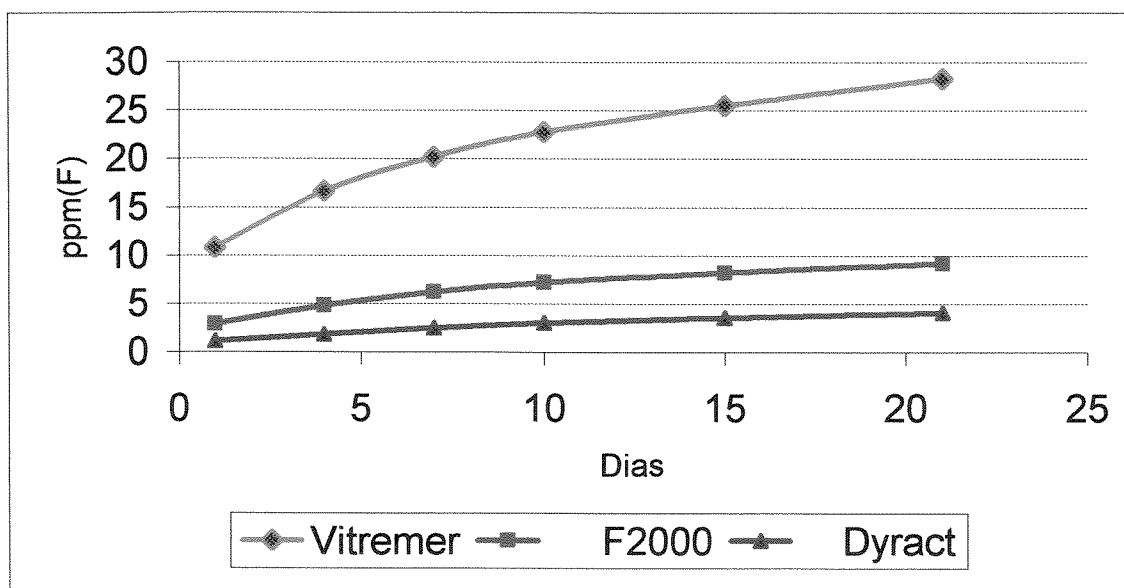


Figura 13: Ilustração gráfica cumulativa das médias de liberação de íons flúor.

6. DISCUSSÃO

Comparando-se os resultados das medidas de liberação de fluoretos dos três materiais pesquisados, verificamos resultados distintos. Observa-se em todos os materiais testados uma grande liberação inicial, diminuindo pela metade ao redor do 4º dia e 7º dia de medição. Analisando-se esta Tabela 2, os resultados obtidos são semelhantes aos encontrados por autores como MARTINS (1991), BALA *et al.* (1997), GROBER *et al.* (1998), MEYER *et al.* (1998), SHAW *et al.* (1998), CARVALHO e CURY (1999) e YIP e SMALES (2000).

O cimento de ionômero de vidro modificado por resina composta Vitremer (3M) mostra valores significativamente maiores de liberação que as resinas compostas modificadas por poliácidos Dyract (Dentsply) e F2000 (3M) em todos os períodos analisados, segundo comparações pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$). Embora os três materiais sejam híbridos ionômero/resina (Vitremer) e resina/ionômero (Dyract e F2000), o Vitremer como híbrido ionômero/resina tem em sua composição uma grande quantidade de fluoretos, que aparece na liberação diária verificada neste experimento. GARCIA/GODOY (1997), GROBER *et al.* (1998), BERTACHINI *et al.* (1999), e PRESTON *et al.* (1999), obtiveram resultados que demonstram a mesma ocorrência.

O fato dos materiais restauradores que contém flúor poderem prevenir cáries secundárias, é uma das razões pelas quais estes materiais se tornaram

populares, e têm seu emprego cada vez mais difundido. Desde 1972, quando WILSON e KENT anunciaram os cimentos de ionômero de vidro, vários trabalhos foram realizados sobre a propriedade vantajosa destes materiais liberarem íons flúor para o meio bucal, como a realizada por MARTINS *et al.* (1987), FORSTEN (1990), COSTA *et al.* (1995), MOUNT (1996), DONLY e INGRAM (1997), BALA *et al.* (1997), GROBER (1998), SHAW *et al.* (1998).

A liberação de flúor para o meio bucal em níveis constantes mas baixos, após o 10º dia de medição, tem sua importância na redução de microinfiltrações ao redor de restaurações, conforme SIDHU e WATSON (1995) e VERBEECK *et al.* (1998) relatam em suas pesquisas.

As concentrações liberadas nos três materiais avaliados parecem ser suficientes para manter um potencial cariostático, que vai dificultar a recidiva de cárie. A presença de forma constante com baixa concentração de fluoretos, também foi encontrada em avaliações por pesquisadores como BRUUN e THYLSTRUP (1984), CLARKSON *et al.* (1988) e FORSTEN (1991).

As concentrações de fluoretos liberadas neste experimento mostram resultados numéricos muitas vezes diferentes dos obtidos por vários autores, diferenças estas provavelmente resultantes das dimensões diferentes dos corpos de prova, volume do líquido empregado para análise da liberação, energia de superfície e porosidade.

Como a liberação de fluoretos no ionomérico modificado por resina Vitremer é significativamente maior que a das resinas modificadas por poliácidos F2000 e Dyract, a inibição de cáries poderá ter melhores resultados com o Vitremer,

pois *in vivo* ainda não há pesquisas suficientes.

Em análise realizada por MILLAR *et al.* (1998), houve maior degradação marginal nas restaurações feitas com resinas compostas modificadas por poliácidos, o que poderia indicar menor poder de inibição de cáries secundárias.

Como há diferenças significativas entre os valores liberados de fluoretos entre o Vitremer, F2000 e Dyract, e conseqüentemente o potencial cariostático também varia, sugerimos o emprego do F2000 e Dyract para pacientes com baixa atividade de cárie, ou com atividade de cárie controlada. Autores como BURGESS *et al.* (1996) e ELIADES *et al.* (1998) sugerem uma análise do paciente e indicam o Vitremer para alta atividade de cárie, e os materiais F2000 e Dyract para baixa atividade de cárie.

Como os ionômeros convencionais e ionômeros modificados por resina tem a propriedade vantajosa de reservatório de fluoretos, o Vitremer provavelmente exerce melhor este papel do que o F2000 e Dyract, pois a quantidade de poliácidos na composição dos mesmos é pequena. Isto é um importante fator em relação às resinas modificadas por poliácidos, pois se a capacidade de reservatório é baixa, as propriedades cariostáticas dos mesmos são pequenas. SERRA e RODRIGUES Jr. (1998) confirmam isto em trabalho sobre potencial cariostático.

Como o fato anterior é de extrema importância, sugerimos que o profissional deve analisar com rigor a atividade de cárie do paciente, bem como planejar o tipo de cavidade e região de localização da mesma.

Embora a liberação de fluoretos seja baixa na avaliação dos materiais

F2000 e Dyract, ela é importante, pois a presença permanente do íon flúor é mais relevante do que esporádicas liberações de alto nível. Como os materiais F2000 e Dyract liberam pequenas quantidades de íons flúor permanentemente ao redor do dente, isto reduzirá o efeito de subsaturações locais quando o pH da placa cair a níveis cariogênicos. GEURTSEN *et al.*, em 1999 e SAVARINO *et al.*, em 2000, realizaram trabalhos, corroborando com esta afirmação.

Neste trabalho de pesquisa, está demonstrada a liberação de fluoretos dos materiais Vitremer, F2000 e Dyract por 21 dias, sendo que do décimo dia em diante os níveis permanecem praticamente constantes, o que nos leva a acreditar de que se continuássemos as medições, esta liberação de fluoretos se manteria por um determinado período de tempo em patamares constantes e baixos.

Uma das indicações dos materiais restauradores liberadores de íons flúor é para pacientes com alta atividade de cárie que usam medicamentos xerostomogênicos, ou em tratamento radioterápico em cabeça ou pescoço, pois os materiais como Vitremer, F2000 ou Dyract adicionariam fluoretos ao meio bucal. EKSTRAND *et al.* (1981), realizaram trabalho sobre tratamento intensivo com gel liberador de fluoretos para este tipo de paciente.

Estudo de DISNEY *et al.* (1989), mostra que bochechos com soluções de fluoretos semanais ou quinzenais são eficientes, mas com o aparecimento dos materiais restauradores liberadores de fluoretos, juntamente com os dentífricos fluoretados, acreditamos que os níveis de fluoretos na cavidade bucal se manterão estáveis e eficientes.

FEJERSKOV *et al.* (1981), discutem as três teorias sobre a função do

flúor na doença cárie, e afirmam a importância da presença deste elemento químico na saliva, placa ou esmalte. CURY (1989), confirma esta importância dinâmica do flúor nos processos de desmineralização e remineralização. WEYNE (1986) e LARSEN (1990), em seus trabalhos também relatam esta importância dinâmica.

A baixa exposição dos dentes aos íons flúor acentua o poder cariogênico por vários fatores, e os pacientes, com alta atividade de cárie são os mais prejudicados. A escolha do tratamento é de fundamental importância neste caso, pois a presença dos fluoretos é considerada essencial para se diminuir a infecção cariogênica. Autores como BARATIERI *et al.* (1989) e WALTER *et al.* (1999), descrevem esta importância.

A presença de íons flúor na cavidade oral é diretamente proporcional ao número de restaurações com materiais restauradores liberadores de fluoreto importante destacar, pois só assim haverá interferência no processo de desmineralização e remineralização.

Observamos que os procedimentos mais adequados para serem utilizados em serviços de saúde da rede pública, que enfatizam, em sua organização de trabalho, medidas que interferem no processo saúde/doença, com a finalidade de monitorar e controlar as doenças bucais, devem utilizar materiais restauradores liberadores de fluoretos.

7. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, podemos concluir que:

1. O padrão de liberação de fluoretos foi similar para os três materiais testados, pois todos os materiais apresentaram maior liberação nas primeiras horas, com tendência à estabilização após o 10º dia, com diminuição paulatina da liberação de fluoretos.
2. Em todos os períodos testados (1º ao 21º dia), os valores de liberação de fluoretos dos três materiais testados mostraram diferenças estatisticamente significativas entre os mesmos.
3. Analisando-se estatisticamente, a maior liberação de fluoretos ocorreu com o cimento de ionômero de vidro modificado por resina Vitremer, seguido pela resina composta modificada por poliácidos F2000, sendo que a resina composta modificada por poliácidos Dyract apresentou a menor liberação.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS *

1. ATTIN, T., BUCHALLA, W., SIEWERT, C., HELLIGE, E. Fluoride realese/upta of olyacid-modified resin composites (compomers) in neutral and acid buffer solutions. **J Oral Rehabil**, Oxford, v.26, n.5, p. 388-393, May 1999.
2. BALA, O., ÜÇTALI, M., CAN, H., TÜRKÖZ, E., CAN, M. Fluoride release from various restorative materials. **J Nihon Univ Sch Dent**, Tokio, v.39, n. 3, p. 123-127, June 1997.
3. BARATIERI, L. N. *et al.* Cariologia. In : Dentística – Procedimentos preventivos e restauradores. **Quintessence Int**, Rio de Janeiro. p. 28-37, 1989.
4. BERTACHINI, S. M., ABATE, P. F., BLANK, A ., BAGLIETO, M.F., MACCHI, R.L., Solubility and fluoride release in ionomers and compomers. **Quintessence Int**, Berlin, v.30, p. 193-197, 1999.
5. BURGESS, J. O., NORLING, B.K., RAWLS, F. R., ONG,L.I. Directly placed esthetic restorative materials. **Compendium**, San Antonio, v.17, n.8, p. 731-732, 1996.
6. BRUUN, C., GIVSKOV, H. Calcium fluoride formation in enamel from semi or low concentrated F agents in vitro. **Caries Res**, Basel, v. 27, p.96-99 1993.

*De acordo com a NBR-6023 de 1989, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).
.Abreviaturas de periódicos de conformidade com a Base de Dados MEDLINE.

7. BRUUN, C., THYLSTRUP, A. Fluoride in whole saliva and dental caries experience in areas with high or low concentrations of fluoride in the drinking water. **Caries Res**, Basel, v.25, p. 96-100, 1991.
8. CARVALHO, A. S., CURY, J. A. Fluoride release from some dental materials in different solutions. **Operative Dent**, Seattle, v. 2, p. 14-19, 1999.
9. CLARKSON, *et al.* Rational use of fluorides in caries prevention and treatment. In: EKSTRAND, Jr., FEJERSKOV, O., SILVERSTONE, L.M. **Fluoride in Dentistry**, Copenhagen, 1988, p. 276-288.
10. COSTA, B., ROSA O.P.S., CARVALHO, R.M., BIJELLA, M.F.T.B. Estudo comparativo da liberação de flúor de materiais dentários restauradores. **Revta Odont Univ**, São Paulo, São Paulo, v.9, n.4, p. 279-284, out/dez 1995.
11. CURY, J. A. Uso do flúor em dentística. In : Baratieri, L. N. et al. Dentística – Procedimentos preventivos e restauradores. **Quintessence Int**, Rio de Janeiro. p. 43-67, 1989.
12. DISNEY, J. A. *et al.* Comparative effects of a 4 year fluoride mouth rinse program on high and low caries-forming grade 1 children. **Community Dent Oral Epidemiol**, Copenhagen, v. 17, p. 139-143, 1989.
13. DONLY, K. J., INGRAM, C. An in vitro caries inhibition of photopolymerized glass ionomers liners. **J Dent Child**, Chicago, p.128-130, Mar/Apr 1997.

14. EKSTRAND, J. *et al.* Pharmacokinetics of fluoride gels in children and adults. **Caries Res**, Basel, v.15, p. 213-220, 1981.
15. ELIADES, G., KAKABOURA, A., PALAGHIAS, G. Acid-base reaction and fluoride and release profiles in visiblelight-cured poly-acid modified composite restoratives (compomers). **Dent Mater**, Washington, v.14, p. 57-63 Jan. 1998.
16. FALSTER, C.A. A cárie dentária como uma doença infecciosa transmissível. **Rev Fac Odont Pernambuco**, Recife, v.2, n. 1, p. 23-32 , 1997.
17. FEJERSKOV, O., THYLSTRUP, A ., LARSEN, M. J., Rational use of fluorides in caries prevention. **Acta Odont Scand**, Oslo, v. 39, p. 241-249, 1981.
18. FORSTEN, L. Short and long-term fluoride release from glass ionomer base liners. **Scand J Dent Res**, Copenhagen, n. 99, p. 340-342, 1991.
19. GARCIA-GODOY, F. Fluoride release study. Effect of materials on dentin. **Internal reports to 3M Dental Products**, Saint Paul, 1997.
20. GEURTSSEN, W., LEYHAUSEN, F., GARCIA-GODOY, F. Effect of storage media on the fluoride release and surface microhardness of four polyacid-modified composite resins ("compomers"). **Dental Materials**, Hannover, n.15, p.196-201, Feb. 1999.
21. GROBLER, S. R., ROSSOUW, R. J., VAN WYK KOTZE, T. J. A comparison of fluoride release from various dental materials. **J Dent**, Oxford, v. 26, n. 3, p. 259-265, June 1998.

22. KITTY, M. Y., STEPHEN, H. Y. The clinical performance of the compomer versus hybrid composite resin. **J Am Dent Assoc**, Chicago, p. 1088-1089, Aug, 1997.
23. LARSEN, M. J. Chemical events during tooth dissolution. **J Dent Res** Washington, v. 69, p. 575-580, 1990.
24. MARTINS, L. R. M. *et al.* Restaurações com cimentos ionoméricos. **Rev Odont USP**, São Paulo, v. 1, n. 2, p. 24-27, abr/jun. , 1987.
25. MARTINS, L. R. M. **Liberção de flúor de restaurações com cimentos de ionômero de vidro e sua incorporação no esmalte dentário humano submetido à ciclagem de desmineralização e remineralização.** Bauru, 1991. 73 p. Tese (Doutorado) Faculdade de Odontologia de Bauru (USP).
26. McLEAN, J. W., NICHOLSON, J. W., WILSON, A. D. Proposed nomenclature for glass-ionomer dental cements and related materials. **Quintessence Int**, Berlin, v. 25, n. 9, p. 587-589, 1994.
27. MEYER, J. M. , CATTANI-LORENTE, M. A., DUPUIS, V. Compomers: between glass-ionomer cements and composites. **Biomaterials**, Stoneham, v. 19, p.529- 539, 1998.
28. MILLAR, B.J., ABIDEN, F., NICHOLSON, J. W. In vitro caries inhibition by poliacid modified composite resins (compomers) **J Dent**, p.133-136, May 1998.

- 29.MOUNT, J. G. Descrição dos cimentos de ionômero de vidro. In: Atlas de cimentos de ionômero de vidro . Guia para o clínico. 2 Ed. **Santos**, p. 27, 1996.
- 30.NEWBRUN, E. Cariologia. 2. Ed. São Paulo: **Santos** , 1988.
- 31.PIMENTA, I. C., PIMENTA, L.A. F. Selantes: prevenção ou tratamento. **Rev Assoc Bras Odont**, São Paulo, v.4, n. 5, p. 298-302, out/nov., 1996.
- 32.PRESTON, A . J. et al. Fluoride release from aesthetic dental materials. **J Oral Rehabil**, Oxford, n.26, p. 123-129, 1999.
- 33.QUIST, J., QUIST, V., Placement and longevity of amalgam restorations in Denmark . **Acta Odontol Scand**, Oslo, n.48, p. 297-303, Jan. 1991.
- 34.RUSE, N. D. What is a compomer? **J Can Dent Assoc**, v.65, p. 500-504, 1999.
- 35.SAVARINO, L., CERVELLATI, M., STEA, S., CAVEDAGNA, D., PIZOFERRA, V. M. In vitro investigation of aluminum and fluoride release from compomers, convencional and resin-modifies glass ionomer cements: a standardized approach. **J Biomater**, Bolonha, v. 11, n. 3, p. 289-300, 2000.
- 36.SHAW, A . J., CARRICK, T., McCABE, J. F. Fluoride release from glass ionomer and compomer restorative materials: 6-month data. **J Dent**, Oxford, v. 26, n. 4, p. 355-359, 1998.

37. SERRA, M. C., RODRIGUES JR. A. L. Potencial cariostático de materiais restauradores contendo flúor. **Rev Assoc Paul Cir Dent**, v. 52, n.5, p. 359 - 364, set/out 1998.
38. SIDHU, S. K., WATSON, T. F. Resin modified glass ionomer materials : a status report for the American Journal of Dentistry. **Am J Dent**, San Antonio, v.8, n. 1, p 59-67, Feb. 1995.
39. THYLSTRUP, A., FEJERSKOV, O. Cariologia clínica. 2. Ed. São Paulo: **Santos**, p. 235-238, 1995.
40. TYAS, J. M. Avaliação clínica de uma resina composta poliácida modificada. **Jornal de Clínica em Odontologia**. V. 9, n. 3, p. 22-26, 2000.
41. VAIKUNTAM, J. Resins modified glass ionomer cements: Implications for use in Pediatric dentistry. **J Dent Child**, Chicago, p. 131-134, Mar/Apr 1997.
42. VERBEECK, R. M. H. *et al*. Fluoride release process of (resin modified) glass ionomer cements versus (polyacid-modified) composite resins. **Biomaterials**, Stoneham, n. 19, p. 509-519, 1998.
43. WALTER, K. *et al*. Influência do pH na dessorção e adsorção de íons fluoreto pelo selante de fóssulas e fissuras Fluroshield (Dentsply). **J B C**, v. 3, n. p. 63-68, 1999.
44. WEYNE, S. Estudo da cárie: o diagnóstico da atividade de cárie. A descoberta os pacientes de alto risco. **Rev Bras Odont**, Rio de Janeiro, v. 5, p. 36-49, 1986.

45. WILSON, A . D., KENT, B. E. A new translucent cement for dentistry. **Br Dent J**, London , v. 132,n. 4, p. 133-135, Feb. 1972.
- 46.YIP, H. K., SMALES, R. J. Fluoride release from a polyacid-modified resin composite and 3 resin-modified glass-ionomer cements. **Quintessence Int**, Berlin, v.31,p. 261-266, 2000.

9. APÊNDICE

Análise de variância – valores originais.

RESUMO

<i>Dias</i>	<i>Observações</i>	<i>Média</i>
15	5	0,548
21	5	0,460

ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,01968	1	0,0197	39,955	0,0002	5,318
Residuo	0,00394	8	0,0005			
Total	0,02363	9				

<i>Produtos</i>	<i>Observações</i>	<i>Média</i>
Vitremer	5	28,274
Dyract	5	4,098
F2000	5	9,208

ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	1623,5057	2	811,753	10882,86	0,000	3,885
Residuo	0,8951	12	0,075			
Total	1624,4008	14				

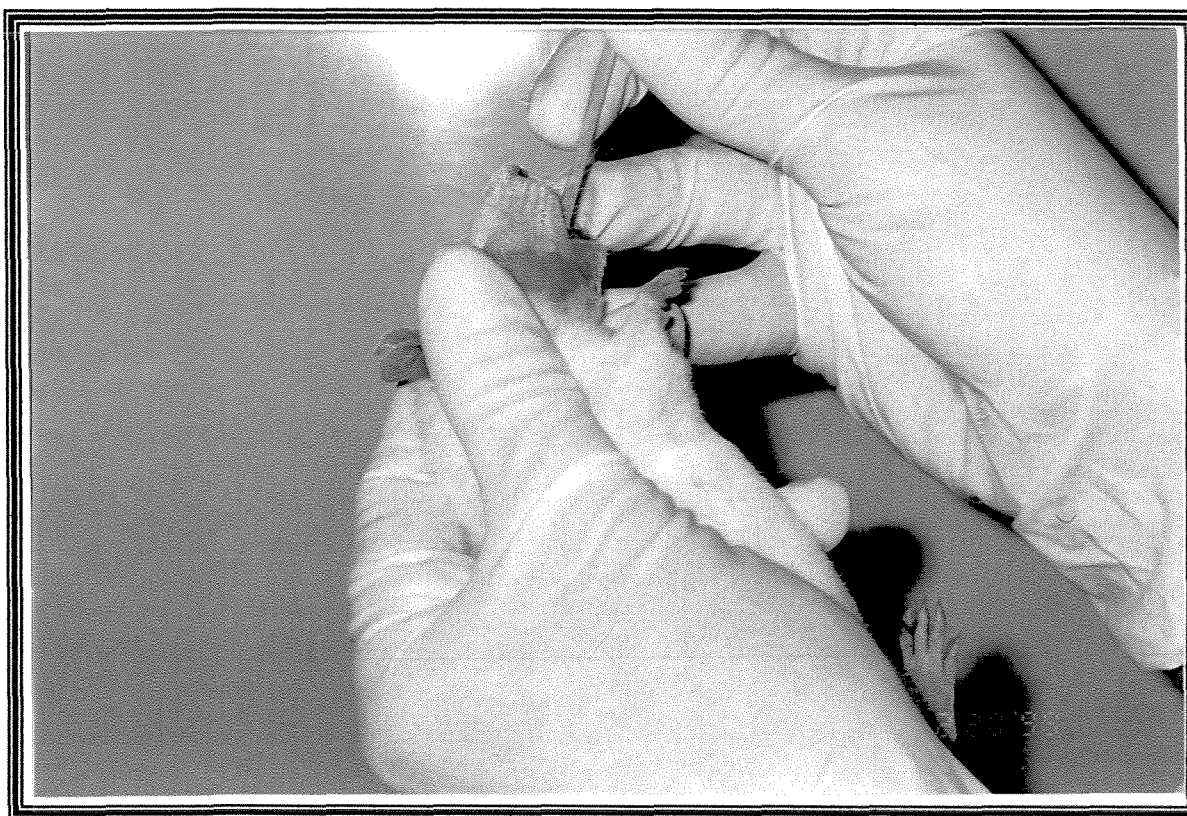


Figura 01. Obtenção de esfregaço bucal dos animais para verificação da infecção com *S. sobrinus*.

4.1. Procedimentos Cirúrgicos

Aos 25 dias de idade, os animais foram dessalivados cirurgicamente por ligação dos ductos das glândulas parótidas, usando fio de sutura nº 4 (Ethicon, Johnson & Johnson) (FIG. 02) e remoção das glândulas sublinguais e submandibulares após dissecação através de incisão mediana (FIG. 03) (BOWEN *et al.*, 1988b). Nesse procedimento, os animais foram anestesiados através da via intraperitoneal com hidrato de cloral na dose de 400 mg/kg. Todas as incisões foram fechadas com cliques cirúrgicos (Autoclip, Becton & Dickinson), que foram

removidos 3 dias após a dessalivação. Procedeu-se à cirurgia normalmente, sem intercorrências e todos os animais se recuperaram bem.

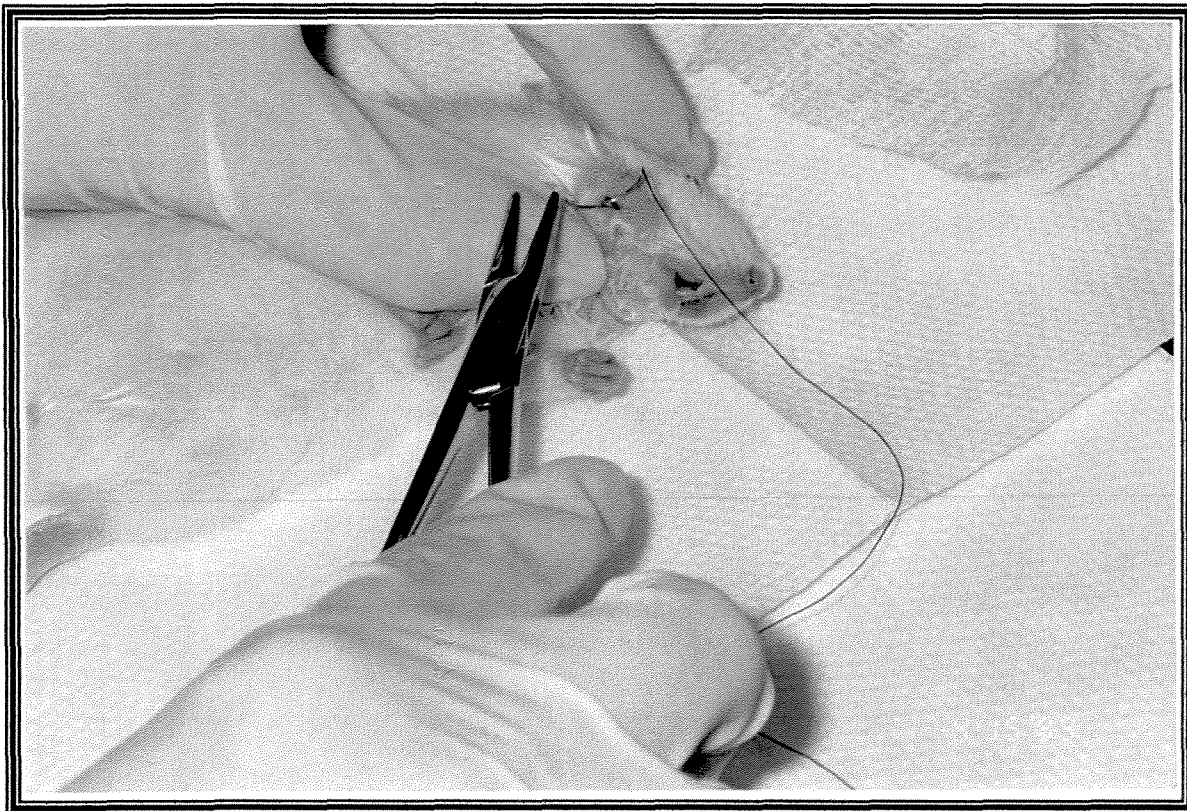


Figura 02. Ligação do ducto da glândula parótida.



Figura 03. Remoção das glândulas sublinguais e submandibulares.

Aos 26 dias de idade os animais foram colocados aleatoriamente e individualmente em gaiolas suspensas e divididos em 6 grupos (Experimento I) e 5 grupos (Experimento II) contendo cada grupo 10 animais, que receberam os seguintes tratamentos:

4.2. Experimento I

Grupo 1: solução de água destilada, deionizada e esterilizada (ADE),
contendo 5% de sacarose, *ad libitum*;

Grupo 2: leite bovino² (Leite da Granja® - Tipo A), *ad libitum*;

Grupo 3: leite elaborado em fórmula infantil Nan II® (Nestlé Ind. e Com. Ltda)² reconstituído com ADE, *ad libitum*;

Grupo 4: leite elaborado em fórmula infantil Nestogeno II® (Nestlé Ind. e Com. Ltda)² reconstituído com ADE, *ad libitum*;

Grupo 5: leite elaborado em fórmula infantil Ninho® coadjuvante de crescimento (Nestlé Ind. e Com. Ltda)² reconstituído com ADE, *ad libitum*;

Grupo 6: ADE *ad libitum*.

4.3. Experimento II³

Grupo 1: solução de água destilada, deionizada e esterilizada (ADE),
contendo 5% de sacarose, *ad libitum*;

² Leites adquiridos em supermercados de Piracicaba. Leite bovino pasteurizado e armazenado em embalagem Tetra Pak

³ Realizado após a avaliação dos resultados do 1º experimento

Grupo 2: leite humano⁴, *ad libitum*;

Grupo 3: leite Ninho[®] coadjuvante de crescimento (Nestlé Ind. e Com. Ltda), reconstituído com ADE, *ad libitum*;

Grupo 4: leite Ninho[®] coadjuvante de crescimento (Nestlé Ind. e Com. Ltda), com 88 ppm de Fe⁺⁺ reconstituído com ADE, *ad libitum*;

Grupo 5: ADE, *ad libitum*.

Os grupos 1 e 6 do experimento I e os grupos 1 e 5 do experimento II receberam dieta essencial-NCP#2 (Anexo 02) (BOWEN *et al.* 1997), via entubação gástrica (gavage), duas vezes ao dia, 3 mL às 9 h e 2 mL às 14 h para suprir as necessidades nutricionais (FIG. 04). O consumo diário de todos os líquidos foi registrado, e ao final de cada semana os animais eram pesados (FIG. 05 e 06). Os experimentos foram conduzidos de forma cega, e o período experimental foi de 21 dias. Após esse período, os animais foram sacrificados por asfixia por CO₂ e decapitados.

Em ambos os experimentos, foram realizadas análises microbiológicas para determinação da microbiota total e da população de *S.sobrinus* recuperada (BOWEN *et al.*, 1986); determinação do índice de cárie pelo sistema de KEYES

⁴ Leite humano foi fornecido pelo Banco de Leite Materno do Hospital das Clínicas da Fac. de Medicina de Ribeirão Preto-USP e conservado a -20°C em freezer.

(1958) modificado por LARSON (1981) e análises estatísticas não paramétricas pelo método de Kruskal-Wallis (Bioestat for Windows versão 1.0).

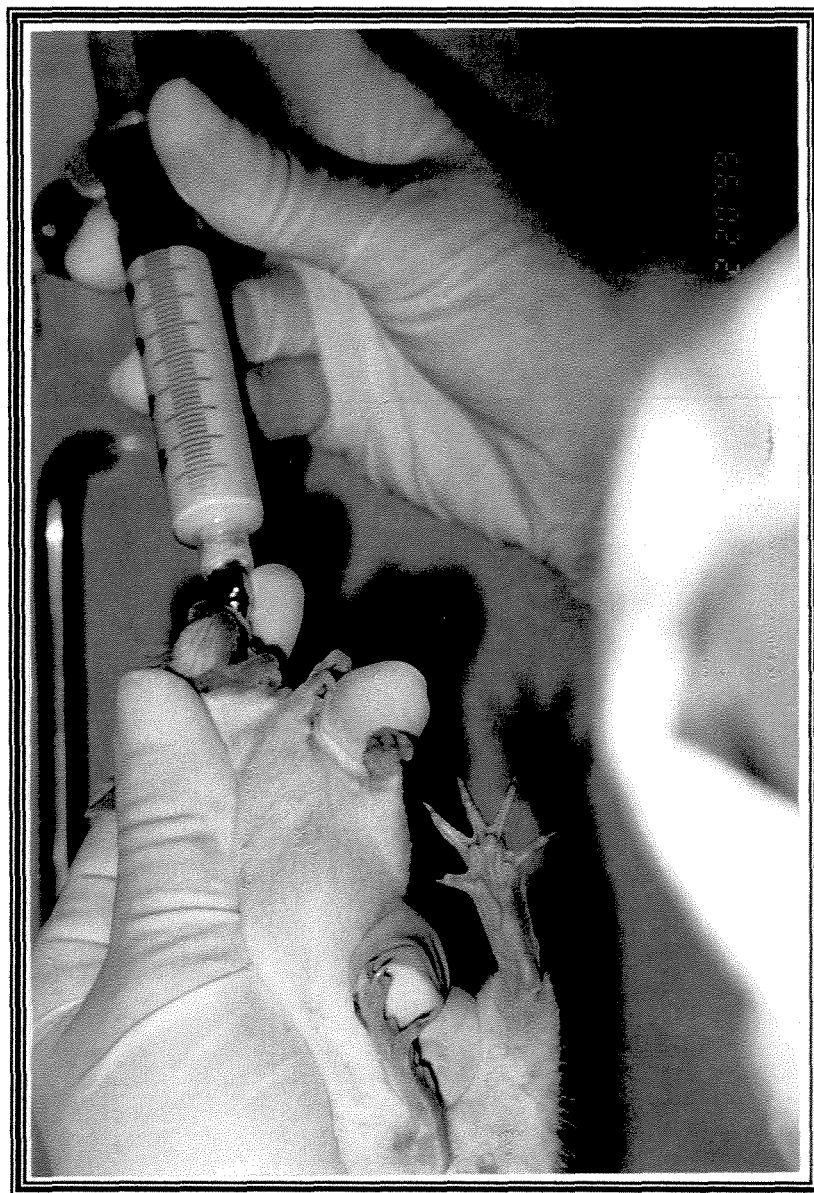


Figura 04. Entubação gástrica para administração de dieta líquida NCP#2.



Figura 05. Registro do consumo diário de líquidos.

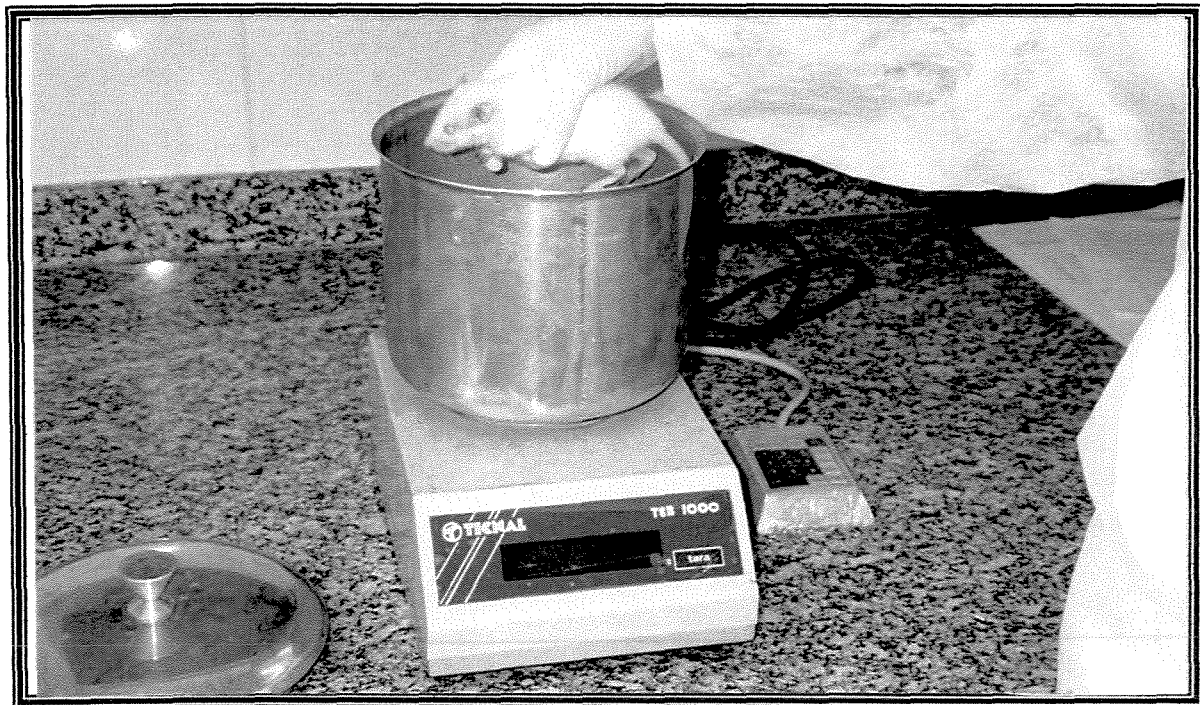


Figura 06. Pesagem semanal dos animais.

4.4. Preparo dos Leites

Os leites formulados foram preparados de acordo com as instruções do fabricante. Mamadeiras autoclavadas, contendo 100 mL de leite preparado, foram trocadas a cada 24 h às ratas durante o período do experimento. Com o leite humano, a fim de se evitar a variabilidade dos resultados devido ao conteúdo de lactose e outros constituintes do leite de diversas mães, optou-se por homogeneizar a cada dia várias garrafas de leite, para então distribuí-las em mamadeiras e serem oferecidas aos animais. O leite materno foi homogeneizado mecanicamente, a cada 2 horas, após o oferecimento aos animais. Toda medida de volume foi realizada com proveta.

4.5. Análise Microbiológica

Imediatamente após o término dos experimentos I e II, a mandíbula esquerda de cada animal foi removida assepticamente (FIG. 07) e suspensa em 5 mL de solução de NaCl a 0,9% esterilizada (FIG. 08) e sonicada com 3 pulsos de 10 segundos com descanso de 5 segundos (FIG. 09), a 400 W de potência e amplitude de 10% (Sonics & Materials inc.), BOWEN *et al.* (1986).

A partir da suspensão obtida, foi feita diluição 1:100. Tanto a suspensão quanto sua respectiva diluição, foram inoculadas, em duplicata, em ágar sangue

MATERIAL E MÉTODO

contendo 5% de sangue desfibrinado de carneiro (ágar base, Difco Lab.), para determinar a microbiota total, e em MSS para determinar a população de *S. sobrinus* recuperada (FIG. 10), através do equipamento Spiral-Plater (Whittley Automatic Spiral Plater da DW Scientific). As placas de MSS e ágar sangue foram incubadas em uma atmosfera de 10% de CO₂, a 37°C, por 48 horas. As placas de ágar sangue foram incubadas por mais 24 horas, a 37°C, em atmosfera normal. A contagem de microrganismos foi expressa em u.f.c./mL (unidades formadoras de colônias), sendo contadas visualmente, utilizando lupa de aumento com luz e estereomicroscópio (BOWEN *et al.*, 1986).

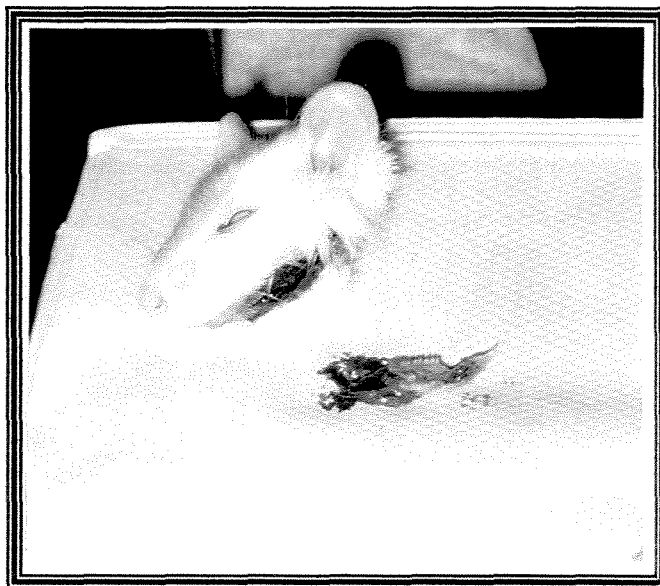


Figura 07. Remoção da hemimandíbula esquerda.

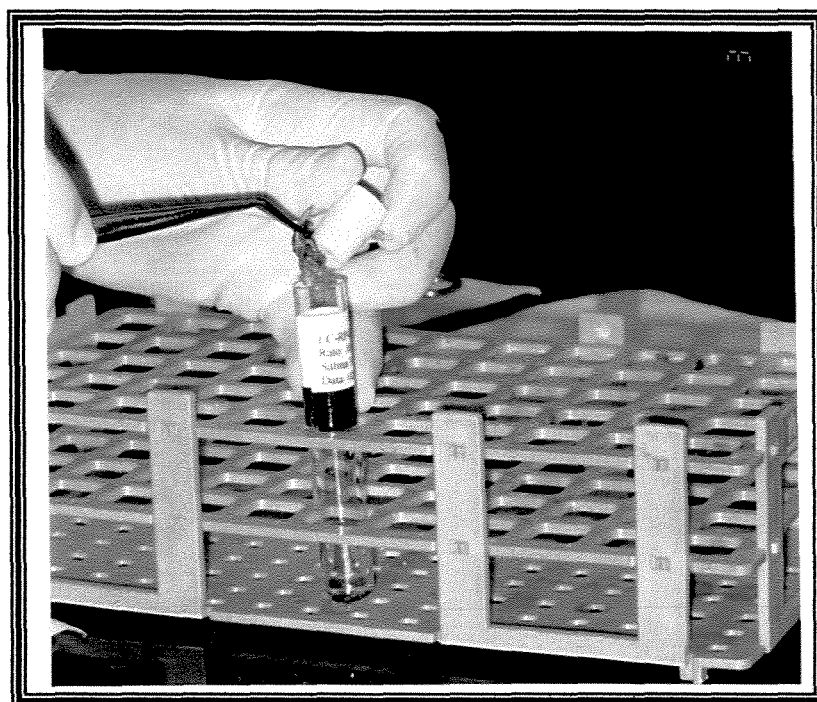


Figura 08. Suspensão da hemimandíbula em NaCl a 0,9%

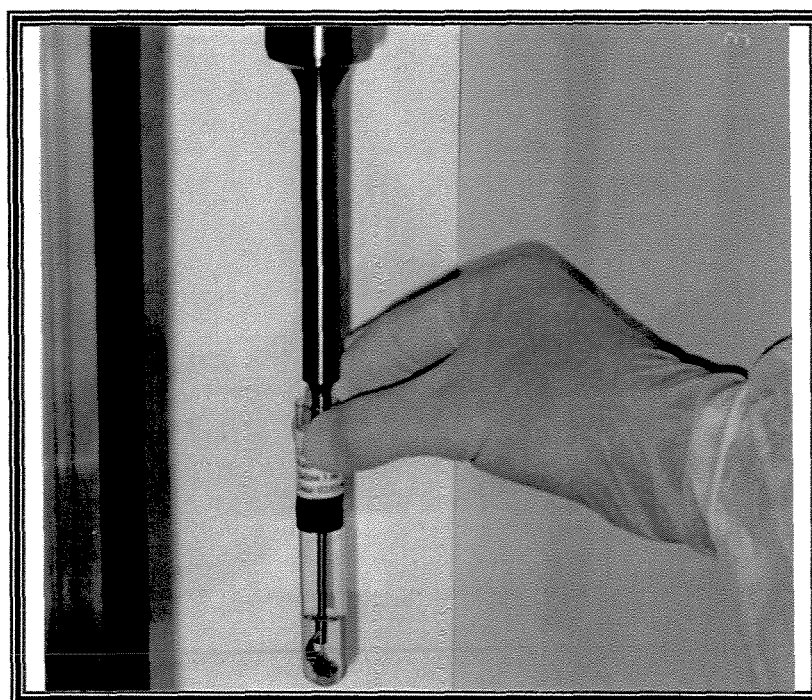


Figura 09. Sonicação das amostras

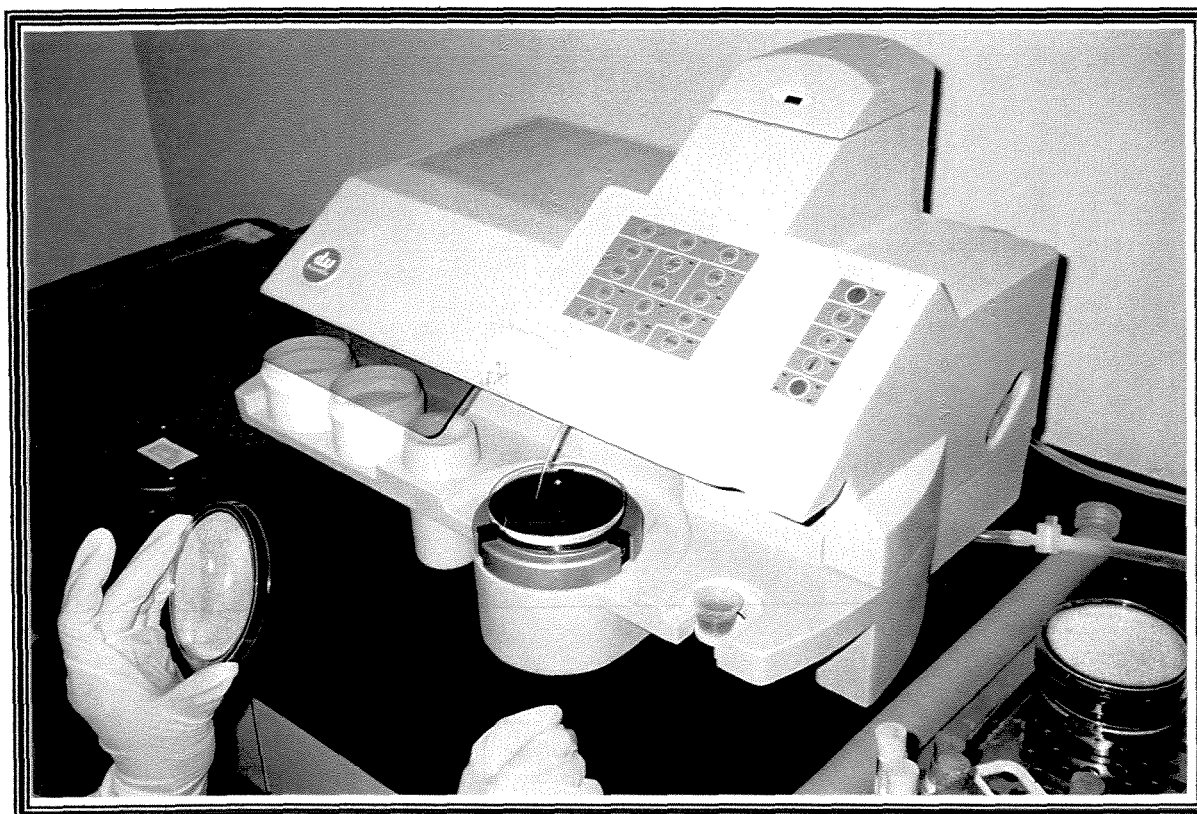


Figura 10. Inoculação da suspensão em meio de cultura, utilizando máquina *Spiral Plater*

4.6. Determinação do índice de cárie

As mandíbulas e maxilas foram autoclavadas, por 30 seg., a 120°C, dissecadas cuidadosamente e os dentes preparados para determinar índice de cárie, utilizando-se o sistema de Keyes modificado por Larson (FIG. 11) (KEYES, 1958; LARSON, 1981).

MATERIAL E MÉTODO

A determinação do índice de cárie foi realizada em duas etapas (utilizando aparelho de captura de imagem acoplado ao estereomicroscópio SV-6 Carl Zeiss). Inicialmente foi feita determinação das lesões de superfícies lisas (buciais, linguais) e proximais. A segunda etapa correspondeu à avaliação das lesões presentes nos sulcos, após coloração e seccionamento dos dentes.

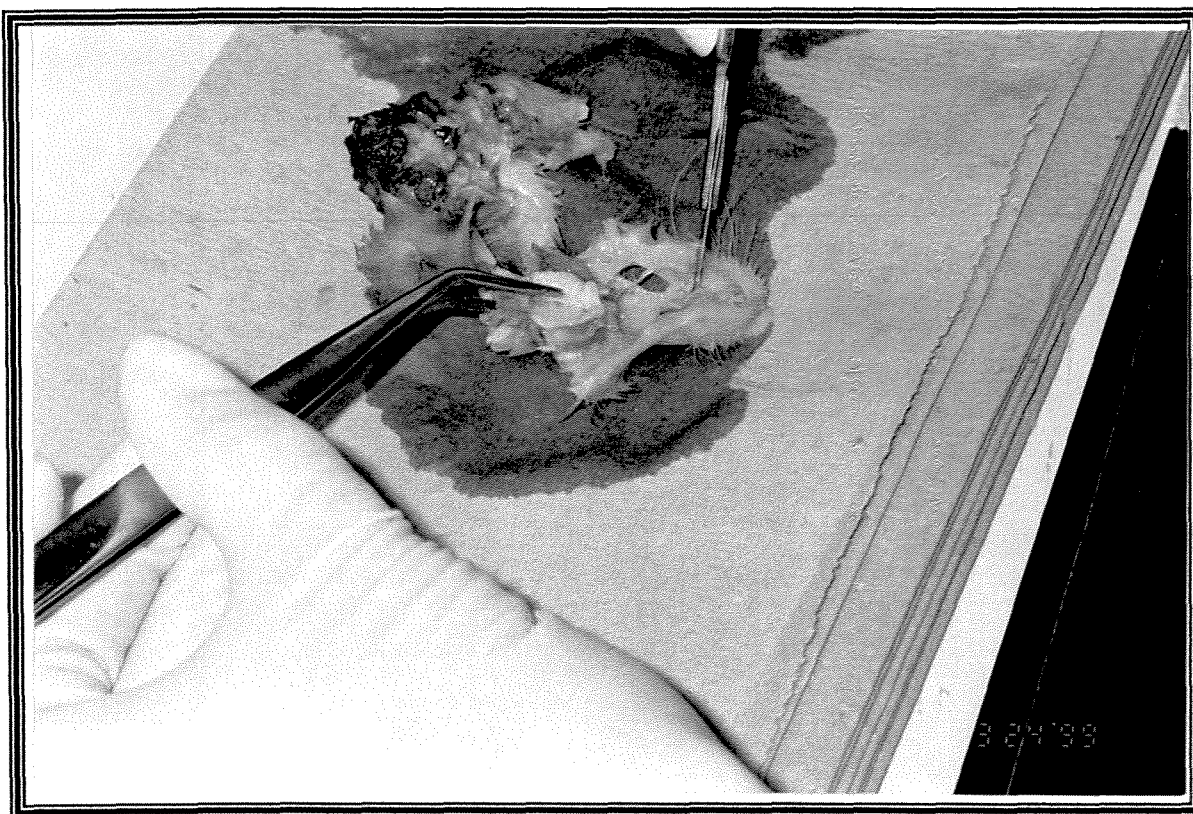


Figura 11. Dissecação das mandíbulas e maxilas para o índice de cárie.

Na primeira etapa foram feitos dois tipos de avaliações. A primeira consistiu na contagem do número de pontos cariados em uma superfície. É uma avaliação linear feita em unidades ou "áreas", que representam uma porção da

MATERIAL E MÉTODO

superfície do dente. O número máximo de unidades que podem ser designadas a uma superfície é predeterminado pelo seu tamanho. Na segunda avaliação foi determinada a profundidade da lesão na dentina. Os valores foram designados a cada tipo de lesão e registrados no diagrama (Anexo 03). O método de designação de valores envolveu julgamento da extensão linear das lesões e registro da profundidade da lesão. A aparência das lesões cariosas tendo alcançado diferentes profundidades, foi descrita como:

E - somente esmalte, esmalte branco e opaco;

Ds - lesão leve da dentina, superfície do esmalte seca ou quebradiça;

Dm - lesão moderada da dentina, a dentina está exposta;

Dx - lesão extensa da dentina, a dentina está mole ou faltando e pode estar escura.

Na segunda etapa as maxilas e mandíbulas foram coradas com murexida 0,024% em etanol/água (7:3) e seccionadas ao meio. As mandíbulas e maxilas ficaram em contato com a solução de murexida por 17 horas (FIG. 12). A avaliação de cárie nos sulcos foi alcançada por uma estimativa linear para um sulco teoricamente aberto. A avaliação da profundidade da lesão também foi realizada. O número de sulcos examinados no 1º, 2º e 3º molares mandibulares é

3, 2 e 1, respectivamente; e no 1º, 2º e 3º molares maxilares é 2, 1 e 1 respectivamente.

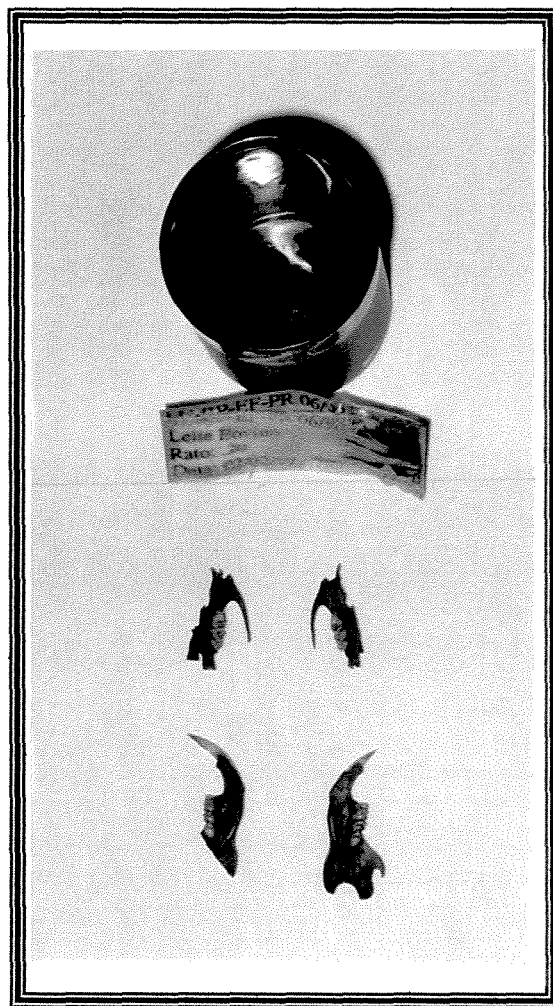


Figura 12. Maxilas e mandíbulas coradas com murexida 0,024%

4.7. Análise Estatística

Inicialmente foi feita análise exploratória, observando-se que os dados não apresentavam distribuição normal ou homocedasticidade (Shapiro-Wilk). Por não encontrar nenhuma transformação adequada aos dados, utilizou-se teste de Kruskal-Wallis (Bioestat for Windows versão 1.0) para os resultados não paramétricos de índice de cárie.

4.8. Determinações do Perfil de Açúcares Presentes nos Leites⁵

Foi feito um perfil cromatográfico qualitativo e quantitativo dos açúcares presentes nos leites estudados, por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), utilizando Cromatógrafo Líquido CG modelo 480 E, seguindo a metodologia descrita por ALPENFELS *et al.* (1982).

4.9. Determinação de Ferro Presente nos Leites⁶

Foi feita a determinação analítica quantitativa de ferro presente nos leites estudados, assim como no leite suplementado com ferro (FeSO_4) em nosso laboratório. Essa determinação foi realizada por meio da absorção atômica, utilizando forno de grafite, seguindo a metodologia descrita por COOK *et al.*, 1997.

⁵ A determinação de açúcares nos leites estudados foi realizada pelo Laboratório de referência da América Latina da NESTLÉ

⁶ A determinação de ferro presente nos leites foi realizada pelos laboratórios da NESTLÉ e do CENA, USP

4.10. Determinação de Flúor Total Presente nos Leites ⁷

A determinação de flúor total nas amostras dos diferentes tipos de leite foi realizada pelo método de microdifusão de íon flúor descrito por TAVES, 1968. Esse método foi utilizado para extrair o flúor das amostras de leites bovino, humano e em fórmulas infantis (Nan II[®], Nestogeno II[®] e Ninho[®]) possuindo como vantagens a eliminação de interferências como, por exemplo, pH da solução, além de permitir o aumento da concentração do flúor na amostra em cerca de 7 vezes a partir de um volume inicial.

4.11. Determinação do Índice de Cariogenicidade Relativa dos Leites

Esse índice foi realizado para comparar os resultados de cárie entre os experimentos I e II, analisando o potencial cariogênico relativo dos leites avaliados. Os valores foram calculados baseando-se nos trabalhos de BOWEN *et al.*, 1980, 1997.

⁷ A determinação de Flúor dos leites foi realizada no laboratório de Bioquímica Oral da Faculdade de Odontologia de Piracicaba

A cariogenicidade relativa é calculada, somando o total de cárie de sulco e total de cárie de superfície lisa produzidos pelo leite a ser analisado, subtraindo-se a soma do total dos índices de cárie de superfície lisa e sulco do controle negativo (ADE). O valor obtido dessa subtração é dividido pelo valor resultante da subtração do total dos índices de cárie de superfície lisa e sulco do controle positivo (5% de sacarose) do total dos índices de cárie de superfície lisa e sulco da ADE. Devem ser considerados os grupos controles positivo e negativo de cada experimento, com o leite pertencente ao mesmo experimento em análise. Esse cálculo está expresso na seguinte fórmula:

$$CR = \frac{\text{Leite (T S + T L)} - \text{ADE (T S + T L)}}{\text{Sac (T S + T L)} - \text{ADE (T S + T L)}}$$

Legenda

CR = cariogenicidade relativa.

Leite = leite a ser calculada a CR.

T S = total de cárie de sulco.

T L = total de cárie de superfície lisa.

ADE = água destilada deionizada esterilizada.

Sac = grupo 5% de sacarose.

4.12. Aprovação pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEAA)

Os experimentos descritos neste trabalho foram aprovados pela CEEA / IB / UNICAMP em 04 de maio de 1999 (Anexo 04).

5. RESULTADOS

5.1. Experimento I

Todos os animais permaneceram aparentemente saudáveis durante o experimento. Como esperado, o ganho de peso dos animais variou entre os grupos. Animais que receberam alimentação essencial via gavagem (grupos: 5% de sacarose e ADE) ganharam pouco peso ou nenhum em relação aos demais. Os animais pertencentes aos grupos dos leites formulados e bovino ganharam mais peso que os grupos controles (TAB. 01 e GRAF. 01).

TABELA 01 - Média (erro padrão) do ganho de peso (g) das ratas dessalivadas, após 21 dias experimentais. (Experimento I)

Experimento I						
Grupos	5% Sacarose*	Leite Bovino	Leite Nan II®	Leite Nestogeno II®	Leite Ninho®	ADE*
Ganho de peso (g)	7,0 (0,9)	74,4 (2,3)	55,0 (2,2)	72,3 (1,7)	61,6 (1,5)	0,0 (1,5)

ADE = água destilada esterilizada* receberam dieta essencial via gavagem.

RESULTADOS

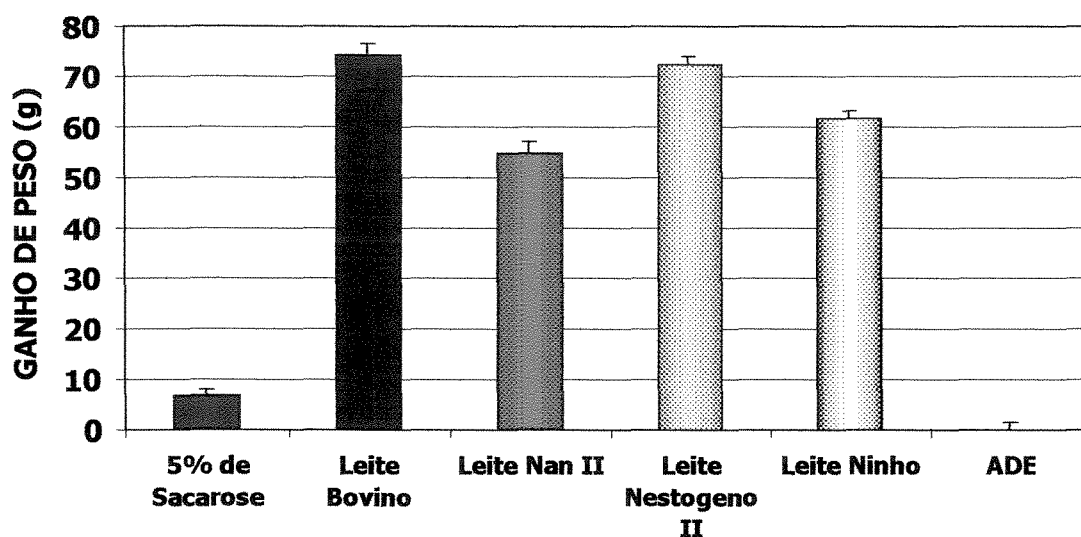


GRÁFICO 01 - Média do ganho de peso (g) das ratas dessalivadas, após 21 dias experimentais (Experimento I).

A TAB. 02 e GRAF. 02 mostram os menores consumos de líquidos dos grupos 5% de sacarose e ADE, e os maiores consumos dos demais grupos que receberam leite.

TABELA 02 - Média (erro padrão) da quantidade de líquidos (mL) consumidos diariamente pelas ratas. (Experimento I)

Experimento I						
Grupos	5% Sacarose*	Leite Bovino	Leite Nan II®	Leite Nestogeno II®	Leite Ninho®	ADE*
Consumo líquidos (mL)	40,5 (2,0)	76,0 (1,1)	77,8 (3,6)	83,9 (1,0)	83,9 (0,9)	18,5 (2,0)

ADE = água destilada esterilizada; * receberam dieta essencial via gavagem.

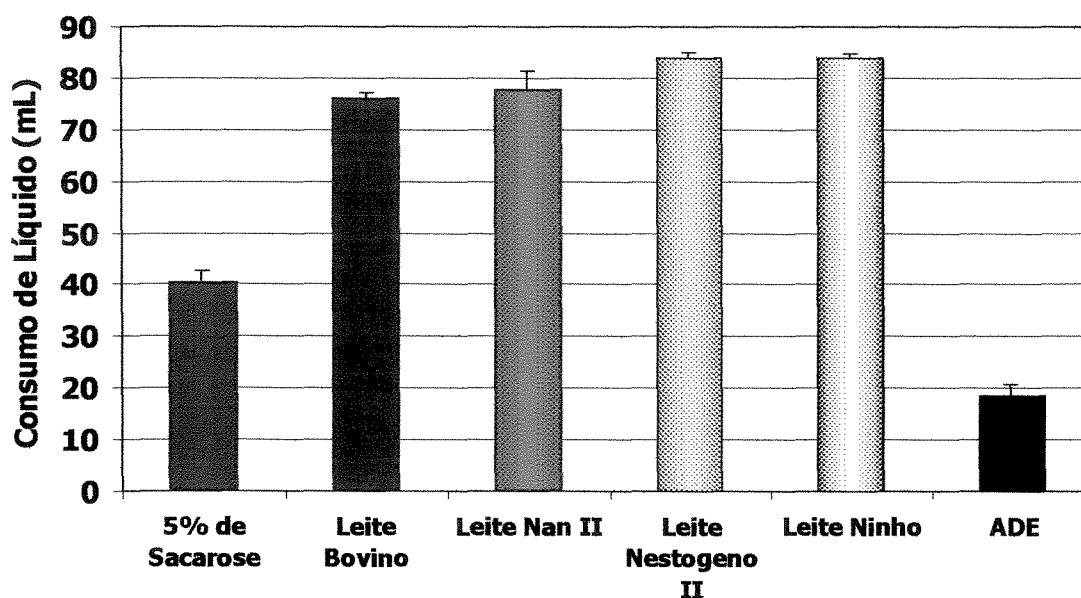


GRÁFICO 02 – Média da quantidade de líquidos (mL) consumidos diariamente pelas ratas (Experimento I).

Analisando a TAB. 03, observa-se que com relação à quantidade total de microrganismos, o grupo do leite Nestogeno II[®] apresentou o menor número de microrganismos, que diferiu estatisticamente de todos os grupos, exceto do grupo que recebeu leite bovino ($p < 0,05$). A quantidade, bem como a porcentagem de *S. sobrinus* recuperadas de cada um dos grupos, não apresentaram diferença estatisticamente significativa, exceto para o grupo que recebeu ADE, cuja quantidade e porcentagem de *S. sobrinus* foram as menores (GRAF. 03)

RESULTADOS

TABELA 03 - Média (Posto Médio)* da microbiota total, número e % de *S. sobrinus* recuperados da cavidade bucal de ratos (Experimento I).

Experimento I						
Microbiota	5% sacarose	Leite Bovino	Leite Nan II®	Leite Nestogeno II®	Leite Ninho®	ADE
Total (x 10 ⁶)	14,4 (40,9) ^a	11,0 (26,7) ^{ab}	14,2 (29,7) ^a	8,0 (14,3) ^b	12,7 (37,0) ^a	13,9 (31,0) ^a
<i>S. sobrinus</i> (x10 ⁶)	7,4 (41,2) ^a	4,2 (34,0) ^a	3,9 (27,3) ^a	3,7 (30,3) ^a	7,4 (41,9) ^a	0,05 (5,7) ^b
<i>S. sobrinus</i> (%)	47,3 (36,9) ^a	38,5 (32,7) ^a	32,5 (27,2) ^a	50,0 (37,4) ^a	54,5 (40,3) ^a	0,5 (5,7) ^b

* Análise estatística não paramétrica por Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). Valores estatísticos diferentes estão seguidos por letras diferentes na horizontal.

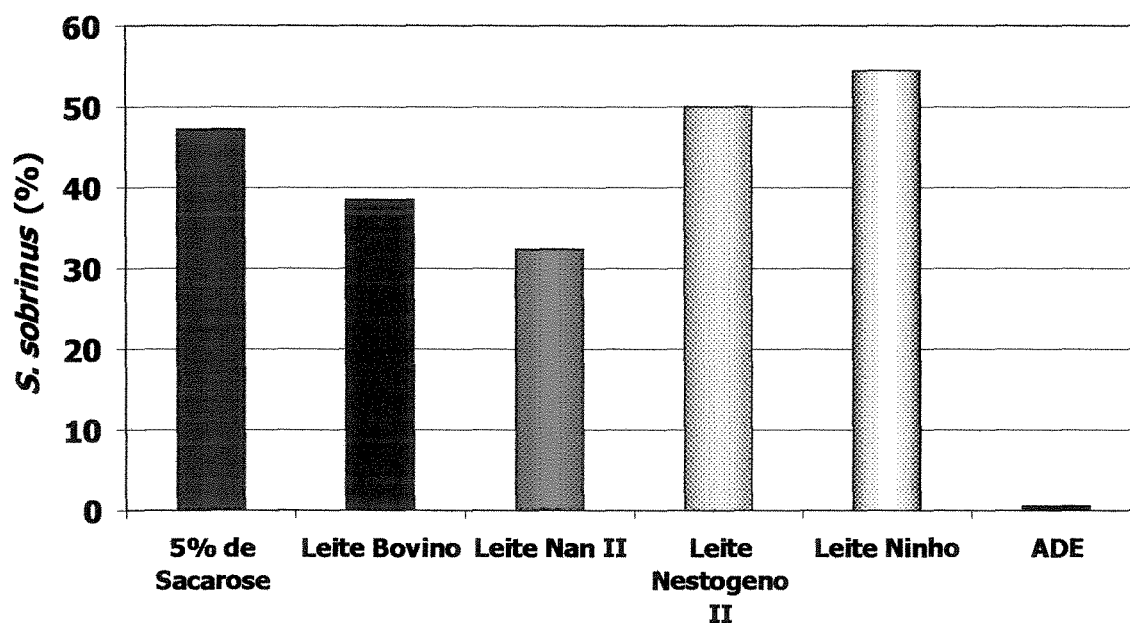


GRÁFICO 03 – Média da porcentagem de *S. sobrinus* recuperada da cavidade bucal das ratas que receberam diferentes tipos de leites (Experimento I).

RESULTADOS

Analisando a TAB. 04, pode-se observar com relação aos índices de cárie de superfície lisa, que o grupo 5% de sacarose apresentou o maior número de cárie, diferindo estatisticamente dos demais ($p < 0,05$), exceto do grupo Ninho® em severidade (Ds - lesão leve de dentina). Quanto ao total de superfície lisa, o leite bovino causou o menor índice de cárie quando comparado com os grupos dos leites em fórmulas infantis e não diferiu estatisticamente do grupo que recebeu ADE. Os leites em fórmulas infantis apresentaram os maiores índices de cárie entre os leites testados, não diferindo entre si.

TABELA 04 – Média (Posto Médio) do índice de cárie* do total de superfícies lisas e severidade em ratas dessalivadas. (Experimento I)

Experimento I						
Índice de Cárie	5% de Sacarose	Leite Bovino	Leite Nan II®	Leite Nestogeno II®	Leite Ninho®	ADE
Total Sup. Lisa	74,0 (53,5) ^a	4,0 (10,7) ^b	33,8 (36,7) ^c	30,4 (33,9) ^c	30,6 (33,8) ^c	2,3 (9,3) ^b
Ds	50,9 (54,3) ^a	1,5 (19,0) ^b	3,6 (26,2) ^{bc}	7,5 (26,9) ^{bc}	11,8 (40,0) ^{ac}	0,7 (11,7) ^b
Dm	16,9 (50,9) ^a	0,5 (21,7) ^{bc}	2,4 (30,4) ^{bc}	1,4 (26,0) ^{bc}	3,3 (34,5) ^b	0,2 (15,5) ^c

* Método de **Keys** (1958) modificado por **Larson** (1981). Análise estatística não paramétrica por Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). Valores estatísticos diferentes estão seguidos por letras diferentes na horizontal; Ds – lesão leve da dentina; Dm – lesão moderada da dentina

Com relação à severidade da lesão na superfície lisa (Ds), o grupo do leite bovino apresentou um índice de cárie baixo, não diferindo estatisticamente do grupo ADE, assim como dos leites Nan II® e Nestogeno II®, que apresentaram índices intermediários de cáries, não diferindo do grupo ADE e Ninho®. O grupo Ninho®, entretanto, apresentou o índice mais alto dentre os leites avaliados, não diferindo estatisticamente do grupo 5% de sacarose, mas diferindo estatisticamente do grupo ADE. Analisando a severidade da lesão na superfície lisa (Dm – lesão moderada da dentina), o grupo Ninho® apresentou alto índice de cárie, quando comparado com os demais leites testados, diferindo estatisticamente do grupo ADE. Os grupos bovino, Nan II® e Nestogeno II® não diferiram significativamente entre si nem do grupo ADE.

A TAB. 05 mostra os índices de cárie de sulco e sua severidade. O maior índice de cárie total de sulco foi observado novamente nos animais que receberam solução contendo 5% de sacarose, o qual diferiu estatisticamente dos demais ($p < 0,05$). Os leites em fórmulas infantis não diferiram estatisticamente entre si, porém apenas os leites Nan II® e Nestogeno II® não diferiram do leite bovino, o qual foi o único que não diferiu estatisticamente do grupo ADE.

RESULTADOS

TABELA 05 – Média (Posto Médio) do índice de cárie* do total de sulco e severidade em ratas dessalivadas (Experimento I).

Experimento I						
Índice de Cárie	5% Sacarose	Leite Bovino	Leite Nan II®	Leite Nestogeno II®	Leite Ninho®	ADE
Total Sulco	57,9 (53,7) ^a	24,0 (19,1) ^{bd}	35,7 (31,7) ^{bc}	34,1 (31,7) ^{bc}	38,3 (35,7) ^c	11,0 (7,0) ^d
Ds	35,1 (51,6) ^a	3,4 (12,3) ^b	15,4 (29,9) ^c	15,3 (29,4) ^c	32,5 (46,7) ^a	2,1 (8,2) ^b
Dm	11,2 (50,5) ^a	3,1 (15,0) ^{bd}	2,8 (28,6) ^{bcd}	3,0 (31,7) ^{bc}	3,8 (35,8) ^{ac}	1,1 (16,9) ^d

* Método de **Keys** (1958) modificado por **Larson** (1981). Análise estatística não paramétrica por Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). Valores estatísticos diferentes estão seguidos por letras diferentes na horizontal; Ds – lesão leve da dentina; Dm – lesão moderada da dentina.

Analisando a profundidade da cárie de sulco (Ds), os grupos 5% de sacarose e leite Ninho® apresentaram os maiores índices de cárie, não diferindo estatisticamente entre si. O leite bovino apresentou o menor índice de cárie, não diferindo estatisticamente do grupo ADE. Os leites formulados Nan II® e Nestogeno II® não diferiram estatisticamente entre si, diferindo dos demais grupos. Com relação à profundidade da cárie de sulco (Dm), os grupos 5% de sacarose e Ninho® novamente apresentaram os maiores índices de cáries, não diferindo estatisticamente entre si ($p < 0,05$). O leite bovino apresentou o menor índice de cárie, seguido do Nan II® que não diferiram estatisticamente entre si e do grupo ADE. Os leites formulados não diferiram entre si estatisticamente.

Todos os leites em fórmulas infantis foram considerados cariogênicos, porém o Ninho[®] apresentou maior cariogenicidade que os demais leites, por não diferir do grupo 5% sacarose em algumas severidades de cárie (Ds de superfície lisa, Ds e Dm de sulco) e diferir estatisticamente, em todos os índices, do grupo ADE.

5.2 Experimento II

À semelhança do Experimento I, os animais permaneceram aparentemente saudáveis por todo o período experimental. Como esperado, o ganho de peso dos animais variou entre os grupos. Os animais que receberam alimentação essencial via gavagem (grupos: 5% de sacarose e ADE) ganharam pouco peso em relação aos demais (TAB. 06 e GRAF. 04). Os animais pertencentes aos grupos dos leites formulados administrados *ad libitum* ganharam mais peso que os grupos controles e leite humano.

RESULTADOS

TABELA 06 - Média (erro padrão) do ganho de peso (g) das ratas dessalivadas após 21 dias experimentais (Experimento II).

Experimento II					
Grupos	5% Sacarose*	Leite Humano	Leite Ninho®	Leite Ninho® Fe	ADE*
Ganho de Peso (g)	12,6 (1,2)	15,1 (2,4)	73,7 (2,1)	71,5 (1,7)	2,6 (1,4)

ADE = água destilada esterilizada; * receberam dieta essencial via gavagem.

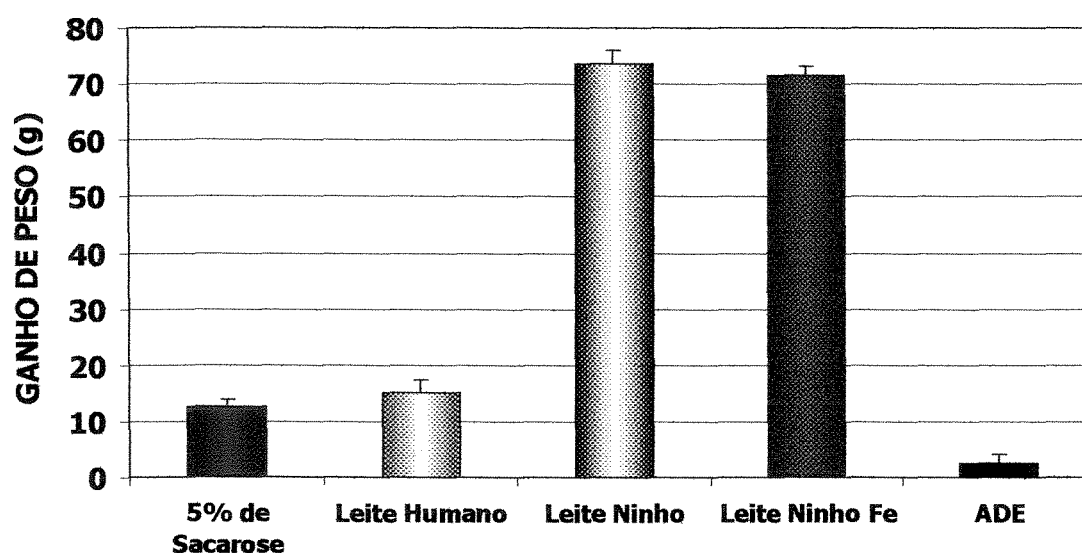


GRÁFICO 04 - Média do ganho de peso (g) das ratas dessalivadas, após 21 dias experimentais (Experimento II).

A TAB. 07 e GRAF. 05 mostram os menores consumos de líquidos dos grupos 5% de sacarose, ADE e leite humano, e os maiores consumos dos demais grupos.

RESULTADOS

TABELA 07 - Média (erro padrão) da quantidade de líquidos (mL) consumidos diariamente pelas ratas. (Experimento II)

Experimento II					
Grupos	5% Sacarose*	Leite Humano	Leite Ninho®	Leite Ninho® Fe	ADE*
Consumo de Líquido (mL)	33,8 (1,4)	23,4 (1,8)	71,6 (1,7)	73,8 (1,7)	14,2 (0,7)

ADE = água destilada esterilizada; * receberam dieta essencial via gavagem.

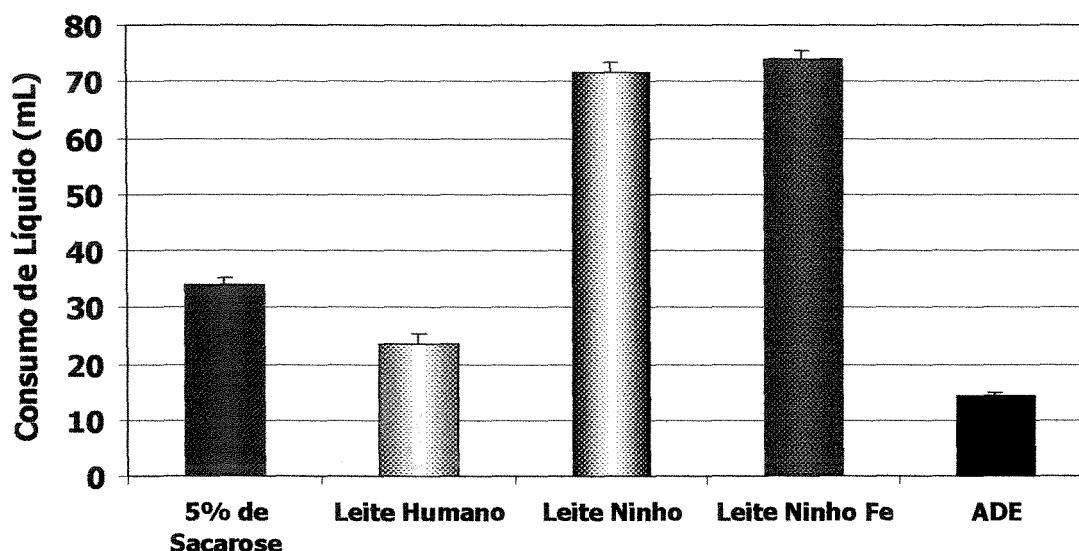


GRÁFICO 05 - Média da quantidade de líquidos (mL) consumidos diariamente pelas ratas (Experimento II).

Analisando os resultados da microbiota na TAB. 08, observa-se que, com relação à quantidade total de microrganismos, o grupo 5% sacarose, juntamente com os grupos dos leites humano, Ninho® não diferiram estatisticamente entre si ($p < 0,05$), porém o grupo leite Ninho® + Fe^{++} não diferiu estatisticamente da ADE e de 5% sacarose. O número e a porcentagem de *S. sobrinus* recuperado da

RESULTADOS

cavidade bucal foram significativamente menores nos grupos que receberam ADE e Ninho®+Fe⁺⁺ e não diferiram estatisticamente entre si ($p<0,05$). Os demais grupos apresentaram maior colonização de *S. sobrinus* e não diferiram estatisticamente entre si (GRAF. 06).

TABELA 08. Valores da Média (Posto Médio)* da microbiota total, *S. sobrinus* e % de *S.sobrinus* recuperados da cavidade bucal das ratas. (Experimento II)

Experimento II					
Microbiota	5% Sacarose	Leite Humano	Leite Ninho®	Leite Ninho® Fe	ADE
Total (x10 ⁶)	38,0 (26,6) ^{ab}	35,8 (16,3) ^a	28,2 (18,6) ^a	43,0 (31,4) ^b	78,0 (32,8) ^b
<i>S.sobrinus</i> (x10 ⁶)	7,1 (35,0) ^a	6,5 (32,5) ^a	6,8 (33,3) ^a	0,6 (16,6) ^b	0,05 (5,5) ^b
<i>S.sobrinus</i> (%)	22,3 (32,6) ^a	27,1 (34,3) ^a	26,7 (35,0) ^a	1,5 (14,7) ^b	0,05 (6,5) ^b

*Análise estatística não paramétrica por Kruskal-Wallis ($p<0,05$). Valores estatísticos diferentes estão seguidos por letras diferentes na horizontal.

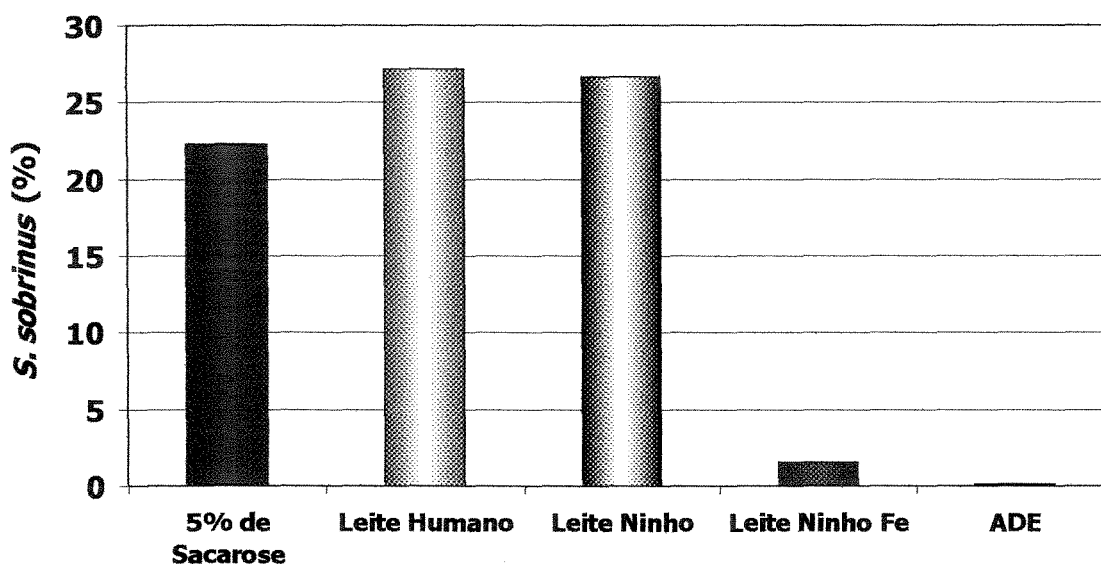


GRÁFICO 06 – Média da porcentagem de *S. sobrinus* recuperada da cavidade bucal de ratas que receberam diferentes tipos de leites. (Experimento II)

Analisando a TAB. 09, podemos observar que, com relação ao total de cárie de superfície lisa e severidade (Ds), os animais que receberam 5% sacarose apresentaram o maior índice de cárie, não diferindo estatisticamente do grupo Ninho[®] ($p < 0,05$). Dos leites avaliados, os grupos que receberam leites humano e Ninho[®]+Fe⁺⁺ apresentaram os menores índices de cárie, não diferindo estatisticamente entre si. Entretanto, o leite humano apresentou o menor potencial cariogênico, pois não diferiu estatisticamente da água destilada. O leite Ninho[®] + Fe⁺⁺ apresentou um índice de cárie mais baixo que o Ninho[®], diferindo estatisticamente entre si.

RESULTADOS

TABELA 09. Valores da Média (Posto Médio) do índice de cárie* do total de superfície lisa e severidade em ratas dessalivadas. (Experimento II)

Experimento II					
Índice de Cárie	5% Sacarose	Leite Humano	Leite Ninho [®]	Leite Ninho [®] Fe	ADE
Total	91,6	18,7	54,1	26,8	7,5
Sup. Lisa	(44,8) ^a	(16,8) ^{bc}	(35,0) ^a	(22,1) ^b	(8,7) ^c
Ds	64,4	9,1	38,3	15,3	1,9
	(44,1) ^a	(19,4) ^{bc}	(35,5) ^a	(21,7) ^b	(6,7) ^c
Dm	29,8	0,9	6,7	4,6	0,1
	(45,0) ^a	(19,4) ^{bd}	(35,5) ^c	(21,7) ^{bc}	(6,7) ^d

* Método de Keys modificado por Larson (1981). Análise estatística não paramétrica por Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). Valores estatísticos diferentes estão seguidos por letras diferentes na horizontal; Ds – lesão leve da dentina; Dm – lesão moderada da dentina

Analisando a severidade da lesão na superfície lisa (Dm), o grupo 5% sacarose apresentou o maior índice, diferindo estatisticamente dos demais ($p < 0,05$). Os grupos dos leites humano e Ninho[®]+Fe⁺⁺ apresentaram os menores índices de cárie, não diferindo estatisticamente entre si ($p < 0,05$). Entretanto, o leite humano foi o único que não diferiu estatisticamente da ADE e o grupo Ninho[®]+Fe⁺⁺ não diferiu estatisticamente do leite Ninho[®].

A TAB. 10 representa os valores de lesão de sulco. Com relação ao total de cárie presente no sulco (total sulco), os grupos 5% sacarose e Ninho[®] apresentaram os maiores índices de cárie, não diferindo estatisticamente entre si

RESULTADOS

($p < 0,05$). Dos leites avaliados, os leites humano e Ninho[®]+Fe⁺⁺ apresentaram os menores índices de cárie, não diferindo estatisticamente entre si ($p < 0,05$). Entretanto, o grupo Ninho[®]+Fe⁺⁺ também não diferiu estatisticamente do leite Ninho[®], enquanto o leite humano não diferiu estatisticamente do grupo ADE, à semelhança do resultado obtido no índice de cárie total de superfície lisa.

TABELA 10. Valores da Média (Posto Médio) do índice de cárie* do total de sulco e severidade em ratas dessalivadas. (Experimento II)

Experimento II					
Índice de Cárie	5% de Sacarose	Leite Humano	Leite Ninho [®]	Leite Ninho [®] Fe	ADE
Total Sulco	71,6 (43,8) ^a	20,3 (16,1) ^{bc}	63,3 (37,1) ^{ad}	35,1 (24,9) ^{bd}	2,3 (5,5) ^c
Ds	36,5 (43,2) ^a	6,9 (18,3) ^{bc}	27,1 (38,0) ^a	8,0 (22,1) ^b	1,0 (6,0) ^c
Dm	19,8 (45,1) ^a	0,5 (14,4) ^{bc}	10,4 (35,4) ^a	2,1 (21,0) ^{bc}	0,0 (11,5) ^c

* Método de **Keys (1958)** modificado por **Larson (1981)**. Análise estatística não paramétrica por Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). Valores estatísticos diferentes estão seguidos por letras diferentes na horizontal ; Ds – lesão leve da dentina; Dm – lesão moderada da dentina.

Ainda na TAB. 10, podemos observar com relação à severidade da lesão de sulco (Ds), que os grupos 5% sacarose e Ninho[®] apresentaram os maiores índices de cárie, não diferindo estatisticamente entre si ($p < 0,05$). Dos 3 leites avaliados, os leites humano e Ninho[®]+Fe⁺⁺ apresentaram os menores índices, não diferindo

estatisticamente entre si. Entre os dois, o leite humano apresentou o menor índice de cárie, não diferindo estatisticamente da água destilada ($p < 0,05$). O Ninho[®]+Fe⁺⁺ apresentou menor cariogenicidade que o Ninho[®], apresentando diferença estatística ($p < 0,05$). Observando os valores de Dm de sulco, podemos notar que igualmente à lesão de sulco (Ds), os grupos 5% sacarose e Ninho[®] apresentaram os maiores índices de cárie não diferindo estatisticamente entre si. Os demais grupos não apresentaram diferença estatística entre si ($p < 0,05$), porém novamente o leite humano não diferiu estatisticamente dos grupos ADE e Ninho[®]+Fe⁺⁺.

5.3. Determinação dos Açúcares e Fe Presentes nos Leites

De acordo com a TAB. 11, podemos observar que os leites bovino e humano apresentaram uma quantidade extremamente inferior de ferro em relação aos demais leites avaliados. O leite Ninho suplementado inicialmente com 88 ppm de Fe⁺⁺, utilizado do experimento II, apresentou 87 ppm na formulação final. O açúcar encontrado nos leites bovino e humano foi a lactose e em concentração inferior à dos leites formulados. Entretanto, o leite humano possui 1,7 vezes mais lactose que o bovino.

RESULTADOS

Os leites formulados, além da lactose, apresentaram outros açúcares, como a maltodextrina (Nestogeno II® e Nan II®), sacarose (Ninho® e Nestogeno II®), glicose (Ninho®) e frutose (Ninho®). O leite Ninho® apresentou uma maior variabilidade de açúcares com relação aos demais.

TABELA 11 - Açúcares(%) e Ferro (mg/100g) presentes nos leites avaliados.

Açúcares e ferro						
LEITES	Ferro mg/100g	Malto- dextrina (%)	Lactose (%)	Sacarose (%)	Glicose (%)	Frutose (%)
Leite Bovino Tipo A	0,038	-	4,9	-	-	-
Leite Humano	0,026	-	8,3	-	-	-
Ninho®	9,4	-	29	9,3	1,5	2,1
Nestogeno II®	8,5	8	29	14	-	-
Nan II®	8,7	13	44	-	-	-
Ninho® + Fe (88 ppm)	67 (87 ppm)	-	29	9,3	1,5	1,5

5.4. Determinação da Quantidade de Flúor Total nos Leites

A concentração de flúor encontrada nas amostras dos leites bovino, humano e Ninho[®], foi inferior ao limite de sensibilidade do método utilizado (<0,02), entretanto os leites Nan II[®] e Nestogeno II[®] apresentaram concentrações de flúor de aproximadamente 0,5 ppm (Tabela 12).

TABELA 12 – Flúor Total (ppm) presente nos leites avaliados.

Leites Utilizados	Quantidade média (DP) de Flúor Total nos Leites ppm F
Bovino	0,02 (0,01)
Humano	0,00 (0,00)
Nan II [®]	0,53 (0,15)
Nestogeno II [®]	0,51 (0,09)
Ninho [®]	0,02 (0,02)

Método: Microdifusão de íons flúor (TAVES, 1968).

5.5. Determinação do Índice de Cariogenicidade Relativa dos Leites - Classificação dos Fluidos

A Tabela seguinte mostra a cariogenicidade relativa dos leites avaliados com base na classificação proposta por Bowen *et al.* (1980; 1997). Nessa tabela é possível observar os menores índices de cariogenicidade representados pelos leites

RESULTADOS

bovino e humano, assim como uma cariogenicidade moderada do leite Ninho® suplementado com ferro. Os leites em fórmulas infantis Nestogeno II®, Nan II® e Ninho® apresentaram os maiores índices de cariogenicidade relativa.

TABELA 13 - Índice de Cariogenicidade Relativa dos Leites

Cariogenicidade Relativa dos Leites*	
Líquidos Testados	Cariogenicidade Relativa
Sacarose	1
Ninho® exp. I	0,50
Ninho® exp. II	0,70
Nan II®	0,50
Nestogeno II®	0,43
Ninho® + Fe ⁺⁺	0,33
Leite Humano	0,18
Leite Bovino	0,12

* O cálculo foi baseado nos trabalhos de BOWEN *et al.* (1980, 1997)

6. DISCUSSÃO

O modelo de rato dessalivado para desenvolvimento de cárie utilizado nestes experimentos promove um dos mais severos desafios cariogênicos disponíveis (BOWEN *et al.*, 1988b). Apesar de diferirem em alguns detalhes dos dentes humanos, o modelo animal oferece vantagens por permitir o processo de iniciação da cárie, assim como o crescimento de microrganismos cariogênicos. Os *Streptococcus mutans* são quase sempre cariogênicos em hamsters e são capazes de provocar cárie em todos os três tipos de superfícies dentárias (KRASSE, 1965). Entretanto, qualquer afirmativa em relação à associação de microrganismos com a cárie dentária em humano deve basear-se em análises de dados experimentais e epidemiológicos coletados de estudos em humanos (THYLSTRUP, 1988). Resultados de inúmeros estudos mostram que microrganismos cariogênicos isolados de humanos induzem cáries em ratos, açúcares promovem cárie em animais (BOWEN *et al.*, 1986) e o flúor em várias formas previne cárie em roedores (LARSON *et al.*, 1976; ROSALEN *et al.*, 1997), sendo coerente afirmar que experimentos conduzidos em ratos são relevantes em humanos.

Em nosso trabalho foi possível constatar que o modelo de cárie em ratos dessalivados desenvolveu lesões cariosas significantes nos animais pertencentes ao grupo controle positivo (5% sacarose), enquanto no controle negativo essas lesões foram irrelevantes. É importante esclarecer que a cárie

observada no grupo controle negativo (ADE) foi provavelmente devido a dois motivos. Primeiramente, antes da cirurgia de dessalivação, os animais receberam durante 7 dias alimentação contendo 56% de sacarose denominada dieta 2000, assim como, água contendo 10% de sacarose, às quais poderiam ser responsáveis por desmineralização na superfície dos dentes à semelhança do observado por outros autores (BOWEN *et al.*, 1997). Além disso, após a administração da dieta NCP#2, os animais dos grupos controles regurgitavam o líquido, que continha carboidratos em sua constituição, permitindo o contato indesejável sobre a superfície dos dentes e conseqüentemente lesão. Nos grupos testes, os animais também desenvolveram cárie dental com padrões característicos cujos resultados serão discutidos posteriormente. Durante todo o experimento, os animais permaneceram aparentemente saudáveis e, embora existam relatos de que é baixo o ganho de peso nos animais submetidos a este modelo experimental (BOWEN *et al.*, 1988a, 1988b), nossos dados mostram que a maioria dos animais que recebeu leite *ad libitum* teve maior ganho de peso, porém aqueles que tiveram uma dieta essencial controlada (NCP#2, administrada via gavagem, duas vezes ao dia) ganharam pouco ou nenhum peso devido a esse tipo de restrição (TAB. 01 e 06). Tais valores de peso estão de acordo com relato da literatura, que mostrou, em um experimento semelhante, que os grupos recebendo ADE e solução de sacarose a 5% não apresentaram nenhum ganho de peso ao final do experimento,

pelo contrário tiveram uma perda de 15 g no grupo que recebia NCP#2, via gavagem, e água destilada (BOWEN *et al.*, 1997).

A reduzida quantidade de líquidos consumida pelos grupos controles (TAB. 02 e 07), que receberam dieta essencial NCP#2, pode justificar em parte o pequeno ganho de peso em relação aos demais grupos, uma vez que a dieta essencial, por satisfazer as necessidades nutricionais dos animais, não os estimulava ao maior consumo de líquidos. Dos leites avaliados, o grupo que recebeu leite humano apresentou consumo inferior em relação aos demais leites e ao controle positivo (Tabela 7), embora com um ganho de peso semelhante a esse controle. Isso pode ser devido à formação de fases ("quebra" de emulsão do leite humano), que ocorria durante o período de não-homogeneização do leite, fazendo com que as ratas consumissem primeiramente a fase inferior da emulsão que era constituída de água e elementos solúveis, como a lactose, a qual provavelmente foi responsável em provocar diarreias nos animais. Esses dados estão de acordo com LIUZZI *et al.*, 1998, que, ao avaliarem o efeito da diarreia induzida pela lactose sobre a absorção de vitaminas A e E em ratos, observaram que a lactose causou redução significativa na ingestão de alimento, produziu diarreia que persistiu durante todo o experimento, e diminuiu absorção de vitaminas A e principalmente vitamina E. Além disso, os baixos consumo e ganho de peso verificados nos animais que receberam leite humano também podem estar associados à diferença na composição dos leites, uma vez que os leites em

fórmulas infantis apresentaram diferentes tipos de açúcares (TAB.11), sendo possível que o paladar diferenciado tenha determinado ingestões distintas. Entretanto, apesar das diferenças de ingestões, é importante considerar no processo de indução de cárie a frequência de consumo de alimentos avaliados (BOWEN *et al.*, 1991; BOWEN & PEARSON, 1993).

Ao comparar o consumo dos líquidos ingeridos, deve-se ressaltar que diferentes quantidades foram consumidas nos grupos experimentais, e que tanto a frequência quanto a quantidade de ingestão de líquidos oferecidos *ad libitum* não foram controlados neste experimento, ficando o consumo na dependência da espontaneidade do animal. Entretanto, BOWEN *et al.*, 1990a, explicam, ao utilizarem esse tipo de delineamento que se igual ou superior quantidade de líquidos testados é consumido, quando comparado ao grupo sacarose (controle positivo), ou seja, se o volume consumido do líquido menos cariogênico excede o volume do líquido mais cariogênico, comparações válidas podem ser realizadas. Por outro lado, se mais solução de sacarose é consumida, quando comparado aos líquidos testados, faz-se necessária a utilização de alimentação programada para atingir dados significativos. No nosso experimento, excetuando-se o leite humano, o volume consumido de líquidos menos cariogênicos excedeu o consumo de líquido considerado mais cariogênico (sacarose 5%) (TAB. 02 e 07) à semelhança de outros relatos da literatura (BOWEN *et al.*, 1991; BOWEN & PEARSON, 1993). O grupo leite humano, teve uma ingestão de 23,4 mL/dia, a qual foi inferior ao

controle positivo. Essa diferença talvez não tenha nenhuma significância biológica neste estudo devido ao intenso desafio cariogênico produzido (BOWEN *et al.*, 1986).

Com relação à infecção do microrganismo *S. sobrinus* 6715 recuperado da cavidade bucal das ratas, podemos observar que todos os leites avaliados mantiveram a infecção do microrganismo (TAB. 03 e 08), o que está de acordo com relatos anteriores, que mostram que a sacarose não é o único açúcar que pode manter a infecção de microrganismos do grupo mutans (BOWEN *et al.*, 1997). Ao analisar o perfil de açúcares (TAB. 11), observa-se que os leites bovino e humano apresentaram qualitativa e quantitativamente menos açúcares fermentáveis pelos microrganismos que os leites em fórmulas infantis, cerca de 6,0 e 3,5 vezes menos lactose, respectivamente, que os leites Ninho® e Nestogeno II®. No entanto, quanto às análises microbiológicas, verificou-se que essa diferença apresentada na tabela de açúcares não resultou em um menor crescimento bacteriano. Segundo relatos da literatura, em geral, os mais altos índices de infecção por *S. sobrinus* são observados nos animais que receberam solução contendo 5% ou 10% de sacarose (BOWEN & PEARSON, 1993). Em nosso experimento, a colonização por *S. sobrinus* do grupo contendo 5% de sacarose não diferenciou dos demais grupos testes, à exceção do grupo ADE e Ninho + Fe⁺⁺, indicando que o número de *S. sobrinus* foi importante para o aparecimento da cárie dental nos grupos testados, mas não foi determinante, sendo que outros

fatores, como os componentes dos leites, poderiam justificar as diferenças encontradas em relação ao potencial cariogênico dos mesmos. Entretanto, os dados enfatizam a importância da interação entre bactéria e dieta na patogênese da cárie, haja visto que os níveis de infecção nos animais que receberam ADE foram insignificantes (TANZER, 1981; BOWEN *et al.*, 1997).

A porcentagem de *S. sobrinus* no leite suplementado com ferro não diferiu do controle negativo (experimento II, Tabela 8) e foi significativamente menor em relação ao controle positivo e aos demais leites, à semelhança do trabalho de MIGUEL *et al.*, 1997a,b, que utilizaram açúcar co-cristalizado com 88 ppm de Fe^{++} em ratos dessalivados. Inúmeros estudos têm descrito mecanismos diferentes para os efeitos de diversos íons, entre eles o ferro, na redução da colonização de estreptococos do grupo mutans e do índice de cárie (OPPERMAN & RÖLLA, 1980; DAVEY & EMBERY, 1992; BOWEN & PEARSON, 1992; BOWEN & PEARSON, 1994). O mecanismo preciso do efeito cariostático do ferro permanece obscuro. BEIGHTON & MCDOUGALL (1981) relataram que no biofilme bacteriano dental de ratos alimentados com água contendo 500 ppm de Fe^{++} ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) havia significativamente menor quantidade de estreptococos e *S. mutans* que os grupos controles, à semelhança do nosso experimento. Estes dados não confirmam as observações de ARANHA *et al.* (1982), que relataram aumento do crescimento dos *S. mutans* em um sistema *quimostato* Teflon®, seguido da adição de até

5,4 μ M de ferro. Parece que *S. mutans* requer ferro, mas quando em excesso pode ter um efeito inibitório (STRACHAN *et al.*, 1982).

Apesar de existirem controvérsias com relação ao efeito do ferro sobre os microrganismos, experimentos prévios demonstraram redução similar nos índices de cárie de superfícies lisa e de sulco, quando ferro foi adicionado à sacarose, sugerindo que outros mecanismos, e não a específica atividade antibacteriana, poderiam estar envolvidos no efeito cariostático do ferro adicionado à sacarose (MIGUEL *et al.*, 1997a,b,c; ROSALEN *et al.*, 1996). Segundo OPPERMANN & RÖLLA (1980), o ferro pode também influenciar o metabolismo da glicose na placa, o que poderia explicar as baixas concentrações do principal ácido orgânico, láctico e ácidos totais encontrados no experimento de ROSALEN *et al.* (1996). Um outro papel do ferro é proteger, da inativação por O₂, o sistema piruvato formato-liase, uma importante via alternativa utilizada pelos *S. mutans* para o metabolismo da glicose (ABBE, 1982). Durante a privação da glicose, ocorre aumento da atividade do piruvato formato-liase para produzir formato, acetato, etanol e quantidade reduzida de lactato (HILLMAN, 1978). Esses ácidos são importantes para a formação da cárie, entretanto lactato tem baixo pKa e os outros ácidos têm um pKa mais elevado, o que significa que menos ácidos ionizados se difundem para dentro da estrutura do esmalte para se dissociarem, resultando em menor perda de mineral da estrutura do esmalte (MARGOLIS & MORENO, 1994). Assim, o ferro pode atuar diretamente na via glicolítica, inibindo-

a, para atuar indiretamente no sistema piruvato formato-liase, tornando a placa menos acidogênica.

Uma outra função do ferro sobre a diminuição da produção de ácido é a inibição de enzimas que contêm S-H e, possivelmente, deslocamento do co-fator Mg^{2+} requerido por inúmeras enzimas transportadoras de açúcar (OPPERMANN & RÖLLA, 1980). O ferro pode também ter um efeito inibitório sobre a produção de polissacarídeos extracelulares a partir de microrganismos orais e inibir atividade da dextranase extracelular (GUGGENHEIM, 1970, IGARASHI *et al.*, 1992), que tem a função de regular a produção de glucanos insolúveis (WALKER *et al.*, 1981; SUN *et al.*, 1994). Experimentos com *S. mutans* mutantes, ou seja, desprovidos de glucano insolúvel pela atividade da glucosiltransferase (GTF-I e GTF-SI), demonstraram que a redução da produção de glucanos insolúveis pode diminuir a incidência de cárie de superfície lisa e, em menor extensão, cárie de sulco em ratos (HAMADA *et al.*, 1991; MUNRO *et al.*, 1991; YAMASHITA *et al.*, 1992, 1993).

Nossos dados mostraram que, ao adicionar ferro (sulfato ferroso) ao leite considerado mais cariogênico do primeiro experimento (Ninho – TAB. 04 e 05), observou-se que o sulfato ferroso atuou reduzindo moderadamente a cariogenicidade do leite Ninho® (Tabela 13), sendo efetivo tanto na redução do total de cárie de superfície lisa (redução de 50,5%), quanto no total de sulco (redução de 44,5%). Tal resultado não difere de outros relatos, onde se observou, em maior proporção redução de cárie de superfície lisa (HAMADA *et al.*, 1991;

YAMASHITA *et al.*, 1992, 1993; MUNRO *et al.*, 1991, 1995). Segundo tais autores, o efeito inibitório do ferro sobre a glucosiltransferase poderia explicar em parte essas observações. A redução de cárie de sulco em severidade pode ser explicada pelos achados de BEIGHTON & MCDOUGALL (1981), ao observarem que a microbiota da placa da fissura dos dentes de ratos era afetada pelo ferro que se depositava nessa região. Ainda neste trabalho, os ratos que receberam 500 ppm de ferro na água tinham significativamente menor número de *S. mutans* na placa. Além disso, a própria anatomia do sulco dos molares dos ratos, que apresentam dentina exposta, podem explicar tal efeito na redução de cárie de sulco por facilitar a deposição do ferro (PER TORELL, 1988). Embora o mecanismo não seja claro, o tipo de ferro utilizado (sulfato ferroso), por ser inorgânico, pode causar manchas extrínsecas nos dentes (ADDY & MORAN, 1995). Entretanto, no nosso experimento, durante a fase de avaliação do índice de cárie, não foi observado nenhum tipo de mancha que discriminasse o grupo que recebeu leite suplementado com ferro (FeSO_4).

O leite Ninho suplementado com ferro, quando comparado ao Ninho, demonstrou uma redução do potencial cariogênico em aproximadamente 50% (Tabela 13). Essa redução poderia ainda ser maior que a observada, se o Fe tivesse uma alta biodisponibilidade, ou seja, se a lactoferrina – uma proteína que se liga ao ferro - ou outros componentes de baixo peso molecular presentes no leite, não se ligassem a esse metal, indisponibilizando-o, em parte, para a bactéria

(MCMILLAN *et al.*, 1977; FRANSSON *et al.*, 1980; DAVIDSON *et al.*, 1994).

Entretanto, tais resultados podem ser considerados promissores estimulando a elaboração de futuros trabalhos no sentido de se obterem formas desse metal mais disponível e menos reativa com lactoferrina, sendo talvez mais efetiva na redução da cárie dental e na prevenção da anemia ferropriva.

Embora o ferro seja essencial no combate a anemia ferropriva, é importante ressaltar que o uso de alimentos suplementados com ferro em pessoas portadoras da Talassemia deve ser criterioso, tendo em vista que em tais indivíduos o excesso de absorção de ferro presente na dieta, associado ao acúmulo desse íon em decorrências das transfusões requeridas podem promover injúrias aos pacientes, como por exemplo, hemocromatose (COTRAN *et al.*, 1994).

Além da avaliação do potencial cariogênico do leite suplementado, observamos diferentes potenciais cariogênicos nos demais tipos de leite utilizados nos nossos experimentos. Entre os diversos tipos de leites avaliados no nosso trabalho, o leite bovino se destacou pela baixa indução de cárie tanto na superfície lisa quanto na região de sulco (TAB. 04 e 05). Esses achados confirmam outros relatos que, da mesma forma, observaram baixa a cariogenicidade desse tipo de leite (WEISS & BIBBY, 1966; JENKINS & FERGUSON, 1966; VIANNA, 1971; DEVER *et al.*, 1987; BOWEN *et al.*, 1991; ARAÚJO *et al.*, 1998). Nesses trabalhos, os autores sugeriram que o leite bovino possui potencial anticariogênico, devido à presença de diversos componentes como Ca e P sob a forma iônica e também da

caseína, que possui ação antibacteriana, podendo interferir nos fenômenos de desmineralização e remineralização do esmalte. A baixa cariogenicidade, observada nos nossos resultados, parece não estar relacionada com a viabilidade direta dos microrganismos, pois não foi observada nenhuma diferença estatisticamente significativa na microbiota total ou na população de *S.sobrinus*, exceto no grupo da controle negativo (TAB. 03), à semelhança dos trabalhos de BOWEN & PEARSON (1993) e ERICKSON *et al.* (1998). O alto consumo observado no grupo que recebeu o leite bovino também não promoveu efeito de "lavagem" ou uma redução mecânica no número de microrganismos da boca dos animais semelhante às observações feitas por BOWEN & PEARSON em 1993. Esses autores, ao analisarem o efeito do leite com 2% de gordura sobre a superfície dos dentes de ratos, ressaltaram a importância dos diversos componentes do leite bovino na proteção do esmalte, como as fosfoproteínas, em destaque a caseína, que além de atuar sobre os microrganismos, pode também formar micelas, originando complexos muito estáveis com grande quantidade de Ca e P, apresentando maior capacidade tampão e maior afinidade por hidroxiapatita (SWAUSGOOD, 1985; HOLT, 1992; ROLLEMA, 1992; VACCA-SMITH & BOWEN, 1995; VACCA SMITH & BOWEN, 2000b).

Em nosso experimento, devido ao delineamento utilizado, não foi possível concluir que o leite bovino apresenta propriedade anticárie, à semelhança do trabalho de BOWEN & PEARSON (1993), que constataram tal atividade ao

observar menor cariogenicidade do leite bovino com sacarose, em relação à solução de água com sacarose, porém podemos concluir que o leite bovino demonstra baixa cariogenicidade, quando submetido a um modelo de alto desafio cariogênico, corroborando com os resultados de BOWEN *et al.*, 1997.

Dos leites avaliados, o leite humano destaca-se por ser considerado essencial para o infante. Se por um lado, a amamentação materna está relacionada ao atraso na introdução ou à redução do uso de mamadeiras contendo sacarose (AL-DASHTI *et al.*, 1995; MATTOS-GRANER *et al.*, 1998), por outro, a amamentação materna prolongada (além dos 12 meses) associa-se ao maior risco de desenvolvimento de cárie dental (KOTLOW, 1977; ROBERTS, 1982; MATEE *et al.*, 1992; ALALUUSUA *et al.*, 1996a), sendo tal cariogenicidade atribuída também a contaminantes do meio ambiente, como a dioxina, que por possuir afinidade por gorduras, pode estar presente nos leites, inclusive no leite humano (ALALUUSUA *et al.*, 1996c). Contrariamente, outros relatos confirmam nossos resultados atribuindo ao leite humano ausência ou baixa cariogenicidade (ARAÚJO *et al.*, 1995; AL-DASHTI *et al.*, 1995; ERICKSON & MAZHARI, 1999). Neste último trabalho, os autores concluíram, através de estudos em crianças, que o leite humano não proporcionou uma queda significativa do pH da placa dental, quando comparado com o grupo da água; permitiu um crescimento bacteriano moderado, além de apresentar ativos depósitos de cálcio e fosfato, não causando desmineralização do

esmalte após 12 semanas de exposição, concluindo que o leite humano não pode ser considerado cariogênico.

Ao compararmos o leite humano com o leite bovino, observa-se que este último produziu menor cariogenicidade relativa (TAB. 13), embora os índices de cárie não apresentarem diferença estatisticamente significativa entre esses leites e o grupo ADE de cada experimento (Tab. 04, 05, 09, 10). De acordo com HACKETT *et al.*, 1984; THOMSON *et al.*, 1996, que testaram o potencial cariogênico e acidogenicidade dos leites, teoricamente, o potencial cariogênico do leite humano é maior que o do leite bovino, devido ao fato do leite humano apresentar maior quantidade de lactose e menor quantidade de cálcio e fósforo que o leite bovino (GARDNER, 1977).

O verdadeiro efeito do leite humano na saúde bucal ainda é discutido por pediatras, dentistas e pesquisadores, quanto a sua questionável cariogenicidade. No entanto, mesmo na presença de um alto desafio cariogênico, o leite humano apresentou um baixo índice de cárie, quando comparado às demais formulações testadas, sendo semelhante ao grupo ADE, contribuindo paralelamente com os benefícios conhecidos na literatura para estimular o seu uso (WESTOVER *et al.*, 1989; ARAÚJO *et al.*, 1995).

Observando e comparando na tabela de perfil de açúcares dos leites (TAB. 11) os valores quantitativos e qualitativos desses componentes nos leites

bovino e humano, constatamos que esses leites não apresentaram diversidades de açúcares (apenas lactose), enquanto os demais leites diferem deles tanto na diversidade quanto na quantidade de açúcares (lactose, sacarose, glicose, frutose, maltodextrina), o que poderia explicar os baixos índices de cárie observados nos grupos que receberam leite bovino e humano, e elevados níveis de cáries nos grupos que receberam leites em fórmulas infantis, à exceção do grupo suplementado com ferro, pois segundo os autores KRASSE, em 1988 e NEWBRUN, em 1988, a presença de outros açúcares, como a sacarose, podem conferir maior cariogenicidade ao produto avaliado.

Vários pesquisadores têm encontrado maior quantidade de lesões cariosas especialmente em superfícies lisas de esmalte, em ratos infectados com *S. mutans* e sob uma dieta à base de sacarose, do que com dietas contendo glicose, frutose, açúcares invertidos (glicose e frutose produzidos pela hidrólise da sacarose), maltose ou lactose (BIRKHED *et al.*, 1980, 1981). COLE *et al.*, em 1980, relataram que a sacarose e a frutose foram igualmente causadoras de cárie, enquanto a frutose em solução pode aumentar o desenvolvimento de cárie de superfície lisa em animais (BOWEN *et al.*, 1990b). Outros estudos mostraram que a lactose do leite é menos cariogênica que a sacarose (KOULOURIDES, *et al.*, 1976; BIRKHED *et al.*, 1981; SCHEMMELE *et al.*, 1982; BOWEN *et al.*, 1990b, 1997).

Independente da possível diferença no potencial causador de cárie por sacarose e por outros açúcares da alimentação, THYLSTRUP & FEJERSKOV

(1988) concluíram que todos os monossacarídeos e dissacarídeos em nossa dieta são altamente cariogênicos, pois todos são rapidamente fermentados pela placa dental. Entretanto, é difícil prever a cariogenicidade dos alimentos com base apenas no conteúdo de carboidrato (BOWEN *et al.*, 1980, 1997). Outros fatores como: a frequência com que são consumidos, o tempo que o alimento permanece na boca e o quanto a saliva é estimulada também devem ser considerados. Além disso, constituintes dos alimentos podem influenciar a cariogenicidade por reduzir ou aumentar o efeito do açúcar, assim como a inclusão de fosfato de cálcio pode ter um efeito significativo na cariogenicidade da sacarose (LILIENTAL, 1977, BOWEN *et al.*, 1980).

Quanto aos leites formulados infantis testados, todos permitiram o desenvolvimento de cárie, à semelhança de trabalhos *in vitro* (SHEIKH & ERICKSON, 1996; ERICKSON *et al.*, 1998) e *in vivo* (SHEIKH & ERICKSON, 1996), apesar dos diferentes valores encontrados com relação à presença natural de flúor e açúcares entre os leites (BROWN *et al.*, 1977; BIRKHED *et al.*, 1981). ERICKSON e colaboradores, em 1998, relataram que esses leites promoveram dissolução do esmalte mesmo na ausência de fermentação bacteriana. Além do mais, são acidogênicos, por apresentarem baixos valores de pH (SHEIKH E ERYCKSON, 1996; ERICKSON *et al.*, 1998). Entre os leites testados, o Ninho® foi considerado o mais cariogênico por diferir do grupo ADE em todos os índices analisados e ser, em

alguns índices, estatisticamente significante ao grupo contendo 5% de sacarose, apresentando maior severidade na progressão da lesão.

Como já discutido, a cariogenicidade dos leites formulados não pode ser baseada apenas no conteúdo de açúcares, pois, minerais como cálcio, fósforo, ferro e peptídeos presentes nesses leites podem modificar a cariogenicidade dos açúcares (BOWEN *et al.*, 1980). Também parece que outros constituintes podem influenciar a cariogenicidade dos açúcares presentes na fórmula. BOWEN *et al.* (1997), avaliando o potencial cariogênico de algumas fórmulas infantis, concluíram que a solução 5% de sacarose foi mais cariogênica que todos os líquidos testados, entretanto as fórmulas testadas continham 9% de carboidrato, maioria lactose, xarope de milho ou sacarose.

Em nosso experimento, os leites Ninho[®] e Nestogeno II[®] apesar de apresentarem em sua constituição de açúcares uma maior porcentagem de sacarose, 9,3% e 14%, respectivamente, que o controle positivo (5% de sacarose) (TAB. 11), desenvolveram menor incidência de cárie dental. Esse efeito provavelmente se deve ao fato dos leites apresentarem outros componentes em suas formulações, como caseína, cálcio, flúor (somente para o Nestogeno II[®]), que lhes conferem propriedades cariostáticas (WHITE, 1987; BOWEN & PEARSON, 1993), reduzindo assim, o índice de cárie em relação ao controle positivo. Ainda, observa-se que o leite Nestogeno II[®] apresentou quantidades de açúcares superiores ao Ninho[®]; no entanto, no que se refere à cárie dental, houve menor

índice no grupo do Nestogeno II[®], indicando possivelmente que a diferença entre os açúcares, assim como a presença de flúor (TAB. 12) observada em sua constituição, sejam responsáveis por essa redução. Os leites Nestogeno II[®] e Nan II[®] apresentaram aproximadamente 0,5 ppm de flúor, podendo contribuir na diminuição do potencial cariogênico dos leites (BOWEN, 1973; ROSALEN *et al.*, 1997).

A quantidade de flúor presente nos leites citados anteriormente, não deve ser desconsiderada quando da sua utilização por crianças residentes em lugares contendo água fluoretada, devido ao risco de desenvolvimento de fluorose. Estudos mostram que fórmulas infantis preparadas com água não fluoretada não causam risco de fluorose dental (SILVA & REYNOLDS, 1996), no entanto, se preparadas com água de abastecimento contendo esse íon em concentração adequada (0,7 a 1,0 ppm F) pode resultar em fluorose, devido ao seu excesso durante o desenvolvimento do esmalte dentário (DAMANTE *et al.*, 2000).

Podemos concluir em relação aos leites formulados, que embora sejam menos cariogênicos que a água com sacarose (5%), apresentam algum potencial cariogênico que não deve ser desprezível e, portanto, merecem cuidado e racionalização na sua prescrição ou utilização.

Esses resultados contribuem positivamente no processo de conhecimento e informação para prevenção da doença cárie dental, permitindo

que crianças na faixa etária de 6 a 36 meses, período em que se inicia e se completa a dentição decídua, não tenham experiência de cárie dental provocada pela utilização de mamadeira noturna contendo leite e carboidratos fermentáveis.

7. CONCLUSÃO

Nas condições experimentais, utilizando o modelo de cárie em animal dessalivado é possível concluir que:

- 9.1 O leite potencialmente mais cariogênico foi o Ninho[®], evidenciado pelos experimentos I e II, seguido pelos leites Nan II[®], Nestogeno II[®], Humano e Bovino.
- 9.2 os leites bovino, humano e formulados não apresentaram efeito antibacteriano sobre a microbiota bucal;
- 9.3 os leites bovino no experimento I e humano, no experimento II, apresentaram baixo potencial cariogênico e não diferiram do controle negativo mesmo sob um elevado desafio cariogênico;
- 9.4 embora os leites formulados sejam menos cariogênicos que a sacarose, eles apresentam maior potencial cariogênico que os leites bovino e humano, devendo ser ressaltada a importância dos métodos de higiene bucal após a utilização desses leites ;
- 9.5 a adição de ferro na reconstituição do leite formulado é capaz de reduzir sua cariogenicidade em cerca de 50%, sendo eficaz na redução da progressão das lesões cariosas;

- 9.6 o ferro quando suplementado ao leite formulado na concentração de 87 ppm apresenta efeito antibacteriano tendo sido responsável pela diminuição significativa da microbiota de *S. sobrinus*, o que provavelmente resultou na redução dos índices de cárie observados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. ABBE, K., TAKAHASHI, S., YAMADA, T. Involvement of oxygen-sensitive pyruvate formate-lyase in mixed-acid fermentation by *Streptococcus mutans* under strictly anaerobic conditions. **J Bacteriol**, Washington, v.152, n.1, p.175-182, Oct. 1982.
2. ADDY, M., MORAN, J. Mechanisms of stain formation on teeth in particular associated with metal ions and antiseptics. **Adv Dent Res**, Washington, v.9, n.4, p.450-456, 1995.
3. ALALUUSUA, S., RENKONEN, O.V. *Streptococcus mutans* establishment and dental caries experience in children from 2 to 4 years old. **Scand J Dent Res**, Copenhagen, v.91, n.6, p.453-457, Dec. 1983.
4. _____. *et al.* Developmental dental defects associated with long breast feeding. **Eur J Oral Sci**, Copenhagen, v.104, n.5/6, p.493-497, Oct./Dec. 1996a.
5. _____. *et al.* Oral colonization by more than one clonal type of mutans streptococcus in children with nursing-bottle dental caries. **Arch Oral Biol**, Oxford, v.41, n.2, p.167-173, Feb. 1996b.

* De acordo com a NBR-6023, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), de 1989. Abreviatura dos periódicos conforme o Medline.

6. ALALUUSUA, S. *et al.* Polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans via mother's milk may cause developmental defects in the child's teeth. ***Environ Toxicol Pharmacol***, Amsterdam, v.1, p.193-197, 1996c.
7. _____. *et al.* Production of glucosyltransferases by clinical mutans streptococcal isolates as determined by semiquantitative cross-dot assay. ***Arch Oral Biol***, Oxford, v.42, n.6, p.417-422, June 1997.
8. ALBEY, L.M. A amamentação ao seio será causa de cáries dentárias em crianças pequenas. ***Bol Serv Odontol***, Rio de Janeiro, v.2, n.7, p.3-5 jan. /dez. 1980.
9. AL-DASHTI, A.A., WILLIAMS, S.A., CURON, M.E.J. Breast feeding, bottle feeding and dental caries in Kuwait, a country with low-fluoride levels in the water. ***Community Dent Health***, Houndsmills, Hampshire, v.12, n.1, p.42-47, Mar. 1995.
10. ARANHA, H. *at al.* Effect of trace metals on growth of *Streptococcus mutans* in a Teflon chemostat. ***Infect Immun***, Washington, v.35, n.2, p.456-460, Feb. 1982.
11. ALPENFELS, W.F. *et al.* The rapid determination of neutral sugars in biological samples by High-Performance Liquid-Chromatography. ***J Liq Chromatogr***, New York, v.9, p.1711-1723, 1982.
12. ARAÚJO, D.R. *et al.* An *in situ* evaluation of cariogenic potencial of human breast milk. ***J Dent Res***, Washington, v.74, p.48, 1995. [Abstract 294].

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

13. ARAÚJO, F.B. *et al.* Estudo *in situ* da cariogenicidade do leite bovino: aspectos clínicos. **Rev ABO Nac**, São Paulo, v.6, n.2, p.103-106, abr./maio 1998.
14. AXELSSON, P., LINDHE, J. Effect of oral hygiene instruction and professional tooth cleaning on caries and gingivitis in schoolchildren. **Community Dent Oral Epidemiol**, Copenhagen, v.9, n.6, p.251-255, Dec. 1981.
15. BAEHI, P.C., GUGGENHEIM, B. Potential of diagnostic microbiology for treatment and prognosis of dental caries and periodontal diseases. **Crit Rev Oral Biol Med**, Boca Raton, v.7, n.3, p.259-277, 1996.
16. BEIGHTON, D., MCDOUGALL, W.A. 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**, Oxford, v.26, n.5, p.419-425, 1981.
17. BERKOWITZ, R.G., TURNR, J., HUGHES, C. Microbial characteristics of the human dental caries associated with prolonged bottle-feeding. **Arch Oral Biol**, Oxford, v.29, n.11, p.949-951, 1984.
18. BIRKHED, D. Behavioural aspects of dietary habits and dental caries. **Caries Res**, Basel, v.24, p.27-35, Sept. 1990. [Supplement 1]
19. _____. *et al.* Cariogenicity of glucose, sucrose and amylopectin in rats and hamsters infected and no infected with *Streptococcus mutans*. **Caries Res**, Basel, v.14, n.6, p.441-447, 1980.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

20. BIRKHED, D. *et al.* Milk and lactose acid production in human dental plaque. **J Dent Res**, Washington, v.60, p.1245, 1981. [Abstract 6].
21. BOWEN, W.H. The effect of fluoride and molybdate on caries activity in monkeys (*Macaca fascicularis*). **Br Dent J**, London, v.135, n.11, p.489-493, Dec. 1973.
22. _____. Effects of foods on oral bacterial populations in man and animals. **J Dent Res**, Washington, v.49, n.6, p.1276-1281, Nov./Dec. 1970.
23. _____. Response to Seow: biological mechanisms of early childhood caries. **Community Dent Oral Epidemiol**, Copenhagen, v.26, p.8-27, 1998. [Suppl.1].
24. _____, PEARSON, S.K. Effect of ions co-crystallized with sugar on caries in desalivated rats. **J Dent Res**, Washington, v.71, p.522, 1992. [Abstract]
25. _____, _____. Effect of milk on Cariogenesis. **Caries Res**, Basel, v.27, n.6, p.461-466, 1993.
26. _____, _____. Influence of iron on caries in rats. **Caries Res**, Basel, v.28, p.183, 1994. [Abstract].
27. _____, MADISON, K.M., PEARSON, S.K. Influence of desalivation in rats on incidence of caries in intact cagemates. **J Dent Res**, Washington, v.67, n.10, p.1316-1318, Oct. 1988a.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

28. BOWEN, W.H., PEARSON, S.K., FALANY, J.L. Influence of sweetening agents in solution on dental caries in desalivated rats. ***Arch Oral Biol***, Oxford, v.35, n.10, p.839-844, Oct. 1990a.
29. _____, _____, YOUNG, D.A. The effect of desalivation on coronal and root surface caries in rats. ***J Dent Res***, Washington, v.67, n.1, p.21-23, Jan. 1988b.
30. _____, YOUNG, D.A., PEARSON, S.K. The effects of sucrose on coronal and root-surface caries. ***J Dent Res***, Washington, v.69, n.8, p.1485-1487, Aug. 1990b.
31. _____. *et al.* Assessing the cariogenic potential of some infant formulas, milk and sugar solutions. ***J Am Dent Assoc***, Chicago, v.128, n.7, p.865-871, July 1997.
32. _____. *et al.* Cariogenic potential of additional infant formulas. ***J Dent Res***, Washington, v.75, p.2605, 1996. [Special Issue].
33. _____. *et al.* The effect of partial desalivation on coronal and root surface caries in the rat. *In*: LEACH, S.A. (Ed.) ***Factors relating to demineralization and remineralization of the teeth***. Oxford : IRL Press, 1986. p.243-250.
34. _____. *et al.* Influence of milk, lactose-reduced milk, and lactose on caries in desalivated rats. ***Caries Res***, Basel, v.25, n.4, p.283-286, 1991.
35. _____. *et al.* A method to assess cariogenic potential of foodstuffs. ***J Am Dent Assoc***, Chicago, v.100, n.5, p.677-681, May 1980.

36. BRADSHAW, D.J., MARCH, P.D. Analysis of pH-driven of oral microbial communities in vitro. **Caries Res**, Basel, v.32, n.6, p.456-462, Nov./Dec. 1998.
37. BRAMS, M., MALONEY, J. Nursing bottle caries in breast-fed children. **J Pediatr**, Saint Louis, v.103, n.3, p.415-416, Sept. 1983.
38. BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Levantamento epidemiológico em saúde bucal (Cárie Dental)**. Centro de Documentação do Ministério da Saúde. 1996. Disponível na Internet: <http://www.saúde.gov.br/programs/bucal/inicial.htm> [acessado em 15 jun. 2000].
39. BROWN, C.R. *et al.* Effect of milk and fluoritade milk on bacterial enamel demineralization. **J Dent Res**, Washington, v.56, p.B210, 1977. [Abstract, 632].
40. BRAMHAGEN, A.C., AXELSSON, I. Iron status of children in southern Sweden: effects of cow'milk and follow-on formula. **Acta Paediatr**, Oslo, v.88, n.12, p.1333-1337, Dec. 1999.
41. CAMEROM, M., HOFVANDER, Y. **Manual feeding infant and young children**. 3.ed. New York: Oxford University Press, 1983. 214p. Cap.7: Foods and their nutrients values. p.52-61.
42. CARBONEL, V.V. *et al.* An *in situ* of cariogenesis of bovine milk. **J Dent Res**, Washington, v.74, n.3, p.811, 1995. [Abstract].
43. CARVALHO, A.S., CURY, J.A. Fluoride release from some dental materials in different solutions. **Oper Dent**, Seattle, v.24, n.1, p.14-19, Jan./Feb. 1999.

44. CAUFIELD, P.W. Dental caries – a transmissible and infectious disease revisited: a position paper. ***Pediatr Dent***, Chicago, v.19, n.8, p.491-498, Nov./Dec. 1997.
45. _____. *et al.* Initial acquisition of mutans streptococci by infants: evidence for a discrete window of infectivity. ***J Dent Res***, Washington, v.72, n.1, p.37-45, Jan. 1993.
46. COOK, J.D., REUSSER, M.E. Iron fortification: An update. ***Am J Clin Nutr***, Bethesda, v.38, n.4, p.648-659, Oct. 1983.
47. COOK, K.K. Extension of dry ash atomic absorption and spectrometric methods to determination of minerals and phosphorous in soy-based, whey-based, and enteral formulae. ***J AOAC Int***, Arlington, v.80, n.4, p.834-844, July/Aug. 1997.
48. COLE, M.F. *et al.* Effects of pyridoxine, phytate and invert sugar on plaque composition and caries activity in the monkey. ***Caries Res***, Basel, v.14, n.1, p.1-15, 1980.
49. COLMAN, G., BOWEN, W.H., COLE, M.F. The effects of sucrose, fructose, and a mixture of glucose and fructose on the incidence of dental caries in monkeys (*M. fascicularis*). ***Br Dent J***, London, v.142, n.7, p.217-221, Apr. 1977.
50. COTRAN, R.S., KUMAR, V., ROBINS, S.L. Diseases of red cells and bleeding diseases. In: _____, _____, _____. ***Pathologic basis of diseases***. 5.ed. Philadelphia: Saunders, 1994. Cap.13.

51. CRAWFORD, A., DE BRUIN, H. Concentration changes in surface Ca, P, F, Zn, Fe, and Sr during white Spot Formation. **J Dent Res**, Washington, v.62, n.9, p.964-968, Sept. 1983.
52. CURZON, M., CROCKER, D. Relationships of trace elements in human tooth enamel to dental caries. **Archs Oral Biol**, Oxford, v.23, n.8, p.647-653, 1978.
53. DAMANTE, C.A. *et al.* Fluoride content in powder milk prepared with different kinds of water. **J Dent Res**, Washington, v.79, p.382, 2000. [Abstract], 1907
54. DAVEY, H., EMBERY, G. Metal ions in oral hygiene products. In: EMBERY, G., ROLLA, G. (eds). **Clinical and biological aspects of dentrifices**. Oxford: University Press, 1992. p.165-172.
55. DAVIDSON, L. *et al.* Influence of lactoferrin on iron absorption from human milk in infants. **Pediatr Res**, Baltimore, v.35, n.1, p.117-124, Jan. 1994.
56. DE SOET, J.J. *et al.* Differences in cariogenicity between fresh isolates of *Streptococcus sobrinus* and *Streptococcus mutans*. **Caries Res**, Basel, v.25, n.2, p.116-122, Mar./Apr. 1991.
57. DEMAYER, E.M. **Preventing and controlling iron deficiency anaemia though primary health care**: a guide for health administrators and programme managers. Geneva: WHO, 1989. 58p.

58. DEMERS, M. *et al.* Carries predictors suitable for mass-screenings in children: a literature review. **Community Dent Health**, Houndsmills, Hampshire, v.7, n.1, p.11-21, Mar. 1990.
59. DERISE, N.L., RITCHEY, S.J. Mineral composition of normal human enamel and dentin and the relation of composition to dental caries: II. Microminerals. **J Dent Res**, Washington, v.53, n.4, p.853-858, July/Aug. 1974.
60. DEVER, J.G., THOMSON, M.E., HAMPTON, M. Fruit juice and flavoured milk effects on enamel in an intra-oral model. **N Z Dent J**, Auckland, v.83, n.371, p.7-10, Jan. 1987.
61. DIBBIN, G.H., SHELLIS, R.P. Physical and biochemical studies of *Streptococcus mutans* sediments suggest new factors linking the cariogenicity of plaque with its extracellular polysaccharide content. **J Dent Res**, Washington, v.67, n.6, p.890-895, June 1988.
62. DOREA, J.G. Iron and copper in human milk. **Nutrition**, Burbank, v.16, n.3, p.209-220, Mar. 2000.
63. DOUGLAS, C.W.I. Bacterial-protein interactions in the oral cavity. **Adv Dent Res**, Washington, v.8, n.2, p.254-262, July 1994.
64. ELLEN, R.P. *et al.* Actinomyces viscosus and Actinomyces naeslundii agglutinins in human saliva. **Scand J Dent Res**, Copenhagen, v.91, n.4, p.263-273, Aug. 1983.

65. EMILSON, C.G., KRASSE, B. The effect of iron salts on experimental dental caries in the hamster. **Arch Oral Biol**, Oxford, v.17, n.10, p.1439-1443, Oct. 1972.
66. ERICKSON, P.R., MAZHARI, E. Investigation of the role of human breast milk in caries development. **Pediatr Dent**, Chicago, v.21, n.2, p.86-90, Mar./Apr. 1999.
67. _____. *et al.* Estimation of the caries-related risk associated with infant formulas. **Pediatr Dent**, Chicago, v.20, n.7, p.395-403, Nov./Dec. 1998.
68. FEATHERSTONE, J.D.B., NELSON, D. The effect of fluoride, zinc, strontium, magnesium and iron on the crystal-structural disorder in synthetic carbonated apatites. **Aust J Chem**, Melbourne, v.33, p.2363-2368, 1980.
69. FIRESTONE, A. R., SCHMIDT, R. & MÜHLEMANN, H. R. Cariogenic effects of cooked wheat starch alone or with sucrose and frequency – controlled feeding in rats. **Arch Oral Biol**, Oxford, v.27, n.9, p.759-763, 1982.
70. FLYNN, A. Minerals and trace elements in milk. **Adv Food Nutr Res**, San Diego, v.36, p.209-252, 1992.
71. FRANSSON, G.B., LÖNNERDAL, B. Iron in human milk. **J Pediatr**, Saint Louis, v.96, n.3 pt.1, p.380-384, Mar. 1980.

72. FROSTELL, G. *et al.* Substitution of sucrose by Lycasin® in candy. The Roslagen study. ***Acta Odontol Scand***, Oslo, v.32, n.4, p.235-254, 1974.
73. GARDNER, D.E., NORWOOD, J.R., EISENSEN, J.E. At-will breast feeding and dental caries: four case reports. ***ASDC J Dent Child***, Chicago, v.44, n.3, p.186-191, May/June 1977.
74. GEDÁLIA, I. *et al.* Enamel softening with coca cola and rehardening with milk or saliva. ***Am J Dent***, San Antonio, v.4, n.3, p.12-22, June 1991.
75. GIBBONS, R. *et al.* Strains of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* attach to different pellicle receptors. ***Infect Immun***, Washington, v.52, n.2, p.555-561, May 1986.
76. GILL, D.G., VINCENT, S., SEGAL, D.S. Follow-on formula in the prevention of iron deficiency: a multicentre study. ***Acta Paediatr***, Oslo, v.86, n.7, p.683-689, July 1997.
77. GOLD, O.G., JORDAN, H.V., VAN HOUTE, J.A. A selective medium for *Streptococcus mutans*. ***Arch Oral Biol***, Oxford, v.18, n.11, p.1357-1364, Nov. 1973.
78. GUEDES-PINTO, A.C. ***Odontopediatria***. 4.ed. São Paulo: Santos, 1995.
79. GUGGENHEIM, B. Enzymatic hydrolysis and structure of water-insoluble glucan produced by glucosyltransferase from a strain of *Streptococcus mutans*. ***Helv Odontol Acta***, Zurich, v.14, p.89-108, Nov. 1970. [Suppl.5].

80. GUGGENHEIM, B. *et al.* Powdered milk micellar casein prevents oral colonization by *Streptococcus sobrinus* and dental caries in rats: a basis for the caries-protective effect of dairy products. ***Caries Res***, Basel, v.33, n.6, p.446-454, Nov./Dec. 1999.
81. _____. *et al.* Salivary pellicle modified by milk components mediates caries protection. ***Caries Res***, Basel, v.28, p.182, 1994. (ORCA Abstracts).
82. GUSTAFSON, G. *et al.* Vipeholm (Sweden) dental caries study. The effect of different levels of carbohydrate intake on caries activity in 436 individual observed for five years. ***Acta Odontol Scand***, Oslo, v.11, p.232-264, Sept. 1954.
83. GUYTON, A.C. Eritrócitos, anemia e policitemia. *In*: _____. ***Tratado de Fisiologia Médica***. 8.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. Cap.13.
84. HACKETT, A.F. *et al.* Can breast feeding cause dental caries? ***Hum Nutr Appl Nutr***, London, v.38, n.1, p.23-28, Feb. 1984.
85. HAJISHENGALLIS, G., MICHALEK, S.M. Current status of a mucosal vaccine against dental caries. ***Oral Microbiol Immunol***, Copenhagen, v.14, n.1, p.1-20, Feb. 1999.
86. HAMADA, S., SLADE, H.D. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. ***Microbiol Rev***, Washington, v.44, n.2, p.331-384, June 1980.

87. HAMADA, S. *et al.* Oral passive immunization against dental caries in rats by used of hen egg yolk antibodies specific for cell-associated glucosyltransferase of *Streptococcus mutans*. **Infect Immun**, Washington, v.59, n.11, p.4161-4167, Nov. 1991.
88. HAREL-RAVIV, M., LASKARIS, M., CHU, K.S. Dental caries and sugar consumption into the 21st century. **Am J Dent**, San Antonio, v.9, n.5, p.184-190, Oct. 1996.
89. HEROD, E.L. The use of milk as a saliva substitute. **J Public Health Dent**, Releigh, v.54, n.3, p.184-189, Summer 1994.
90. HILLMAN, J.D. Lactate dehydrogenase mutants of *Streptococcus mutans*: isolation and preliminary characterization. **Infect Immun**, Washington, v.21, n.1, p.206-212, July 1978.
91. HOLT, C. Structure and stability of bovine casein micells. **Adv Protein Chem**, San Diego, v.43, p.63-151, 1992.
92. _____, DALGLEISH, D.G., JENNES, R. Calculation of the ionic equilibrium in milk diffusate and comparison with experiment. **Anal Biochem**, Washington, v.113, n.1, p.154-163, May 1981.
93. HUDSON, M.C., CURTISS, R. Regulation of expression of *Streptococcus mutans* genes important to virulence. **Infect Immun**, Washington, v.58, n.2, p.464-470, Feb. 1990.
94. IGARASHI, T., YAMAMOTO, A., GOTO, N. Characterization of the dextrase purified from *Streptococcus mutans* Ingbritt. **Microbiol Immunol**, Tokyo, v.36, p.969-976, 1992.

95. INTERNATIONAL CONFERENCE ON NUTRITION. **Final report...** Rome: FAO/WHO, 1992.
96. JENKINS, G.N., FERGUSON, D.B. Milk and dental caries. **Br Dent J**, London, v.120, n.10, p.472-477, May 1966.
97. JOLLIFE, E.F.P. **Maternal nutrition and lactation**. In: Ciba Symposium Nº 45. Breast Feeding and the mother, 1976.
98. KASHKER, S., TASKELL, T. Enhanced intraoral remineralization of bovine enamel after administration of skim milk. **J Dent Res**, Washington, v.71, p.672, 1992. [Abstract].
99. KEYES, P.H. Dental caries in the molar teeth of rats. II. A method for diagnosis and scoring several types of lesions simultaneously. **J Dent Res**, Washington, v.37, p.1088-1099, 1958.
100. _____. The infectious and transmissible nature of experimental dental caries: findings and implications. **Arch Oral Biol**, Oxford, v.1, p.304-320, Mar. 1960.
101. _____. Recent advances in dental caries research. **Bacteriology Int Dent J**, v.2, p.443-63, 1962.
102. _____, JORDAN, H.V. Periodontal lesions in the Syrian hamster.II. Findings related to an infectious and transmissible component. **Arch Oral Biol**, Oxford, v.9, n.4, p.377-400, 1964.

103. KÖLLER, B. *et al.* Acid production by human strains of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. **Caries Res**, v.29, n.5, p.402-406, 1995.
104. KOSIKOWSKI, F. **Cheese and fermented milk foods**. Ann Arbor : Edward Brothers, 1970. p.330.
105. KOTLOW, L.A. Breast feeding: A cause of dental caries in children. **ASDC J Dent Child**, Chicago, v.44, n.3, p.192-193, May/June 1977.
106. KOULOURIDES, T. *et al.* Cariogenicity of nine sugars tested with an intraoral device in man. **Caries Res**, Basel, v.10, n.6, p.427-441, 1976.
107. KRASSE, B. The effect of the diet on the implantation of caries-inducing streptococci in hamsters. **Arch Oral Biol**, Oxford, v.10, p.215-221, 1965.
108. _____. **Risco de cárie**: guia prático para controle e assessoramento. 2.ed. São Paulo: Quintessence, 1988. Cap.1, p.15-26.
109. KUNDIG, R.G., ROSEMAN, S. Sugar Transport II. Characterization of constitutive membrane-bound enzyme II of the *Escherichia coli* phosphotransferase system. **J Biol Chem**, Baltimore, v.246, n.5, p.1407-1418, Mar. 1971.
110. LARSON, R.H. *et al.* Caries inhibition in the by water-borne and enamel-bound fluoride. **Caries Res**, Basel, v.10, n.5, p.321-331, 1976.

111. LARSON, R.W. Merits and modifications of scoring rat dental caries by Keyes's method. *In: SYMPOSIUM AND WORKSHOP ON ANIMAL MODELS IN CARIOLOGY*, 1980. Sturbridge. ***Proceedings...*** Washington : Information Retrieval, 1981. p.195-203.
112. LAYRISSE, M. Iron deficiency in Latin America. Causes and prevention. ***Int J Vitam Nutr Res***, Bern, v.27, p.105-116, 1985. [Sppl.].
113. LILIENTHAL, B. ***Phosphates and dental caries***. New York: Karger, 1977.
114. LIUZZI, J.P., CIOCCIA, A.M., HEVIA, P. In well-fed young rats, lactose-induced chronic diarrhea reduces the apparent absorption of vitamins A and E and affects preferently vitamin E status. ***J Nutr***, Bethesda, v.128, n.12, p.2467-2472, Dec. 1998.
115. LOESCHE, W.J. ***Dental caries, a treatable infection***. Chicago: Thoma, 1982.
116. _____. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. ***Microbiol Rev***, Washington, v.50, n.4, p.353-380, Dec. 1986.
117. LÖNNERDAL, B. Effects of maternal dietary intake on human milk composition. ***J Nutr***, Bethesda, v.116, n.4, p.499-513, Apr. 1986.
118. MACIEL, S.M., CHEDID, R.R., GUEDES-PINTO, A.C. Cárie dentária. In: GUEDES-PINTO, A.C. ***Odontopediatria***. 4. ed. São Paulo: Santos, 1993.

119. MAKINEN, K.K., PHILOSOPHY, L. The role of sucrose and other sugars in the development of dental caries. A review. ***Int Dent J***, Guildford, v.22, n.3, Sept. p.363-386, 1972.
120. MARGOLIS, H.C., MORENO, E.C. Composition and cariogenic potencial of dental plaque fluid. ***Crit Rev Oral Biol Med***, Boca Raton, v.5, n.1, p.1-25, 1994.
121. MARTHALER, T.M. Caries status in Europe and predictions of future trends. ***Caries Res***, Basel, v.24, n.6, p.381-396, 1990.
122. MATEE, M.I.N. *et al.* *Streptococci mutans* and Lactobacilli in breast-fed children with rampant caries. ***Caries Res***, Basel, v.26, n.3, p.183-187, 1992.
123. MATTOS-GRANER, R.O. *et al.* Association between caries prevalence and clinical, microbiological and dietary variables in 1.0 to 2.5-year-old Brazilian children. ***Caries Res***, Basel, v.32, n.5, p.319-323, Sept./Oct. 1998.
124. _____. *et al.* Caries prevalence in 6-36-month-old Brazilian children. ***Community Dent Health***, Houndsmilss, Hampshire, v.13, n.2, p.96-98, June 1996.
125. MCMILLAN, J.A. *et al.* Iron absorption from human milk, simulated human milk, and proprietary formulas. ***Pediatrics***, Grovevillage, v.60, n.6, p.896-900, Dec. 1977.

126. MIGUEL, J.C., BOWEN, W.H., PEARSON, S.K. Effects of iron salts in sucrose on dental caries and plaque in rats. **Arch Oral Biol**, Oxford, v.42, n.5, p.377-383, May 1997a.
127. _____. Effects of frequency of exposure to iron-sucrose on the incidence of dental caries in desalivated rats. **Caries Res**, Basel, v.31, n.3, p.238-243, 1997b.
128. _____. Influence of iron alone or with fluoride on caries development in desalivated rats. **Caries Res**, Basel, v.31, n.3, p.244-248, 1997c.
129. MILNES, A.R. Description and epidemiology of nursing caries. **J Public Health Dent**, Releigh, v.56, n.1, p.38-50, Winter 1996.
130. MOR, B.M., McDOUGALL, W.A. Effects of milk on pH of plaque and salivary sediment and the oral clearance of milk. **Caries Res**, Basel, v.11, n.4, p.223-230, 1977.
131. MOREIRA, B.H.W., TUMANG, A.J., GUIMARÃES, L.O.C. Incidência de cárie dentária em escolares de Piracicaba, SP (após 6 e 9 anos fluoretação da água de abastecimento público). **Rev Bras Odontol**, Rio de Janeiro, v.40, p.11-14, 1983.
132. MORITA, M.C. *et al.* Prévalence de la carie dentaire chez de enfants brésiliens de 0 à 36 mois. **J d'Odontostomatol Pédiatr**, v.3, n.1, p.19-28, mar 1993.
133. MOYERS, R.E. **Handbook of Orthodontics**. 3 ed. Chicago: Yearbook Medical, 1974. p.107-109.

134. MOYNIHAN, P.J. *et al.* Effect of glucose polymers in water, milk and milk substitute on plaque pH in vitro. ***Int J Pediatr Dent***, Oxford, v.6, n.1, p.19-24, Mar. 1996.
135. MUNDORFF, S.A. *et al.* Cariogenic potencial of foods. ***Caries Res***, Basel, v.24, n.5, -355, 1990.
136. MUNRO, C., MICHALEK, S.M., MACRINA, F.L. Cariogenicity of *Streptococcus mutans* V403 glucosyltransferase and fructosyltransferase mutans constructed by allelic exchange. ***Infect Immun***, Washington, v.59, n.7, p.2316-2323, July 1991.
137. _____. *et al.* Sucrose-derived exopolymers have site-dependent roles in *Streptococcus mutans*-promoted dental decay. ***FEMS Microbiol Lett***, Amsterdam, v.128, n.3, p.327-332, May 1995.
138. NESSER, J.R. *et al.* In vitro modulation of oral bacterial adhesion to saliva-coated hydroxyapatite beads by milk casein derivatives. ***Oral Microbiol Immunol***, Copenhagen, v.9, n.4, p.193-201, Aug. 1994.
139. NEWBRUN, E. ***Cariologia***. 2.ed. São Paulo : Santos, 1988. Cap.2, p.17-49.
140. NYVAD, B., FEJERSKOV, O. Experimentally induced changes in ultrastructure of pellicle on enamel in vivo. In: TENCATE, J.M., LEACH, S.A., ARENDS, J. (Ed.) ***Bacterial adhesion and preventive dentistry***. Oxford: IRL Press; 1984. p.143-51.

141. OPPERMANN, R.V., ROLLA, G. Effect of some polyvalent cations on the acidogenicity of dental plaque in vivo. ***Caries Res***, Basel, v.14, n.6, p.422-427, June 1980.
142. ORNELLAS, A., ORNELLAS, L. H. Alimentação da criança: ***Nutrição aplicada***. 2. ed. São Paulo: Atheneu. 1983. 453 p.
143. PER, T. Iron and dental caries. ***Swed Dent J***, Stockholm, v.12, n.3, p.113-124, 1988.
144. PETTI, S., TARSITANI, G., D'ARCA, A.S. Effect of milk and yogurt on caries in preschool children. ***J Dent Res***, Washington, v.79, p.383, 2000. [Abstract].
145. REYNOLDS, E.C. The prevention of sub surface demineralization of bovine enamel and change in plaque composition by casein in an intra oral model. ***J Dent Res***, Washington, v.66, n.6, p.1120-1127, June 1987.
146. REYNOLDS, E.C., DEL RIO, A. Effect of casein and whey-protein solutions on caries experience and feeding patterns of the rat. ***Arch Oral Biol***, Oxford, v.29, n.11, p.927-933, 1984.
147. REYNOLDS, E.C., JOHNSON, I.H. Effect of milk on caries incidence and bacterial composition of dental plaque in the rat. ***Arch Oral Biol***, Oxford, v.26, n.5, p.445-451, 1981.
148. _____, WONG, A. Effect of adsorbed protein on hydroxyapatite zeta potential and *Streptococcus mutans* adherence. ***Infect Immun***, Washington, v.39, n.3, p.1285-1290, Mar. 1983.

149. REYNOLDS, E.C., RILEY, P.F., STOREY, E. Phosphoprotein inhibition of hydroxyapatite dissolution. ***Calcif Tissue Int***, New York, v.34, p.52-56, 1982. [Supplement, 2].
150. ROBERTS, G.J. Is the breast feeding a possible cause of dental caries? ***J Dent***, Oxford, v.10, n.4, p.346-352, Dec. 1982.
151. RÖLLA, G., RYKKE, M. Evidence for the presence of micelle-like protein globules in human saliva. ***Colloids and Surfaces B: Biointerfaces***, v.3, p.177-182, 1994.
152. _____. *et al.* Adsorption of glucosyltransferase to saliva coated hydroxyapatite. Possible mechanism for sucrose dependent bacterial colonization of teeth. ***Scand J Dent Res***, Copenhagen, v.91, n.2, p.112-117, Apr. 1983.
153. ROLLEMA, H.S. Casein association and micell formation. In: Fox PF, editor. ***Advanced dairy chemistry: proteins***, London: Elsevier Applied Science, 1992. Vol.1. p.111-140.
154. ROSALEN, P.L., BOWEN, W.H., PEARSON, S.K. Influence of fluoride co-crystallized with sugar on caries development in desalivated rats. ***Arch Oral Biol***, Oxford, v.42, n.4, p.317-322, Apr. 1997.
155. _____., PEARSON, S.K., BOWEN, W.H. Effect of copper, iron and fluoride co-crystallized with sugar on caries development and acid formation in desalivated rats. ***Arch Oral Biol***, Oxford, v.41, n.11, p.1003-1010, Nov. 1996.

156. RUGG-GUNN, A.J., ROBERTS, G.J., WRIGTH, W.G. Effect of human milk on plaque *in situ* and enamel dissolution in vitro compared with bovine milk. Lactose and sucrose. ***Caries Res***, Basel, v.19, n.4, p.327-334, July/Aug. 1985.
157. RUSSELL, R.R.B. *et al.* A binding protein-dependent transport system in *Streptococcus mutans* responsible for multiple sugar metabolism. ***J Biol Chem***, Baltimore, v.267, n.7, p.4631-4637, Mar. 1992.
158. SATO, Y. *et al.* Characterization and sequence analysis of the scrA gene encoding enzyme II^{scr} of the *Streptococcus mutans* phosphoenolpyruvate-dependent sucrose phosphotransferase system. ***J Bacteriol***, Washington, v.171, n.1, p.263-271, Jan. 1989.
159. SCHEININ, A., MÄKINEN, K.K. Turku sugar studies I-XXI. ***Acta Odontol Scand***, Oslo, v.33, Suppl.70, 1975.
160. SCHEMMEL, R.A. *et al.* Influence of dietary disaccharides on mouth microorganism and experimental dental caries in rats. ***Arch Oral Biol***, Oxford, v.27, n.6, p.435-441, 1982.
161. SCHILLING, K., BOWEN, W.H. The activity of glucosyltransferase adsorbed onto saliva-coated hydroxyapatite. ***J Dent Res***, Washington, v.67, n.1, p.2-8, 1988.
162. SGAN-COHEN, H.D. *et al.* The effect of previous diet on plaque pH response to different foods. ***J Dent Res***, Washington, v.67, p.279, 1988. [Abstract 1333].

163. SHAW, J.H., ENSFIELD, B.J., WOLLMAN, D.H. Studies on the relation of dairy products to dental caries in caries-susceptible rats. **J Nutr**, Bethesda, v.67, p.253-273, 1959.
164. SHEIKH, C., ERICKSON, P.R. Evaluation of plaque pH changes following oral rinse with eight infant formulas. **Pediatr Dent**, Chicago, v.18, n.3, p.200-204, May/June 1996.
165. SILVA, M., REYNOLDS, E.C. Fluoride content of infant formula in Australia. **Aust Dent J**, St. Leonards, v.41, n.1, p.37-42, Feb. 1996.
166. SPERB, J.P.B.; FIGUEIREDO, M.C. The effect of different types of milk on fissure caries in rats. **J. Dent Res**, Washington, v.76, p.431, 1997 [IADR Abstract]
167. STRACHAN, R.C. *et al.* Teflon chemostat for studies of trace metal metabolism in *Streptococcus mutans* and other bacteria. **Appl Environ Microbiol**, Washington, v.43, n.1, p.257-260, Jan. 1982.
168. SUN, J.W. *et al.* Cloning and DNA sequencing of the dextranas inhibitor gene (dei0 from *Streptococcus sobrinus*. **J Bacteriol**, Washington, v.176, n.23, p.7213-7222, Dec. 1994.
169. SWAISGOOD, H.E. Characteristic of edible fluids of animal origin: milk. In: FENNEMA, O.R. (Ed.) **Food chemistry**, New York: Marcell Dekker, 1985. Vol.2. p.791-828.
170. TANZER, J.M. On designing animal model experiments on caries. In: SYMPOSIUM AND WORKSHOP ON ANIMAL MODELS IN CARIOLOGY, 1980. Sturbridge. **Proceedings...** Washington : Information Retrieval, 1981. p.143-149.

171. TANZER, J.M. Microbiology of dental caries. In: SLOTS, J., TAUBSMAN, M. A. ***Contemporary oral microbiology and immunology***. St. Louis: Mosby Year Book. 1992, p.377-424.
172. TAVES, D.R. ***Separation of fluoride by rapid diffusion using hexamethyldisiloxane***. Talanta, v.15, p.969-974, 1968.
173. THOMSON, M.E., THOMSON, C.W., CHANDLER, N.P. *In vitro* and intra-oral investigations into the cariogenic potential of human milk. ***Caries Res***, Basel, v.30, n.6, p.434-438, 1996.
174. THYLSTRUP, A., FEJERSKOV, O. ***Tratado de cariologia***. Rio de Janeiro : Cultura Médica, 1988. 388p.
175. TOMITA, N.E. *et al.* Prevalência de cárie dentária em crianças da faixa etária de 0 a 6 anos matriculadas em creches: importância de fatores socioeconômicos. ***Rev Saúde Publ***, São Paulo, v.30, n.5, p.414-432, out. 1996.
176. TORRES, M.A.A. ***Estado nutricional e aspectos sócio-econômicos de famílias rurais do Trópico Semi-árido (Nordeste do Brasil)***. Recife, 1982. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.
177. TROWBRIDGE, F.L. *et al.* Coordinated strategies for controlling micronutrient malnutrition: A technical workshop. ***J Nutr***, Bethesda, v.123, n.4, p.775-787, Apr. 1993.
178. TURCONI, S.J. & TURCONI, V.L. Anemia ferropriva: incidência em uma população infantil. ***Pediatr Mod***, São Paulo, v.27, n.2, 1992.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

179. VACCA-SMITH, A.M., BOWEN, W.H. The effect of milk and kappa casein on streptococcal glucosyltransferase. ***Caries Res***, Basel, v.29, n.6, p.498-506, 1995.
180. _____, _____. *In situ* studies of pellicle formation on hydroxyapatite discs. ***Arch Oral Biol***, Oxford, v.45, n.4, p.277-291, Apr. 2000a.
181. _____, _____. The effects of milk and kappa-casein on salivary pellicle formed on hydroxyapatite discs *in situ*. ***Caries Res***, Basel, v.34, n.1, p.88-93, 2000b.
182. _____. *et al.* The effect of milk and casein proteins on the binding of *streptococcus mutans* to saliva-coated hydroxyapatite. ***Arch Oral Biol***, Oxford, v.39, n.12, p.1063-1069, Dec. 1994.
183. VAN HOUTE, J., GIBBS, G., BUTERA, C. Oral flora of children with "nursing bottle caries." ***J Dent Res***, Washington, v.61, n.2, p.382-385, Feb. 1982.
184. _____, LOPMAN, J., KENT, R. The final pH of bacteria comprising predominant flora on sound and carious human root and enamel surfaces. ***J Dent Res***, Washington, v.75, n.4, p.1008-1014, Apr. 1996.
185. _____. *et al.* Mutans streptococci and non-mutans streptococci acidogenic at low pH and *in vitro* acidogenic potential of dental plaque in two different areas of the human dentition. ***J Dent Res***, Washington, v.70, n.12, p.1503-1507, Dec. 1991.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

186. VEHKALAHTI, M.M., SOLAVAARA, L., RYTOMAA, I. An eight year follow up of the occlusal surfaces of first permanent molars. **J Dent Res**, Washington, v.70, n.7, p.1064-1067, July 1991.
187. VIANNA, R. **Cariogenic potential of milk Indiana**. Master These. [Indian]: Indiana University. School of Dentistry, 1971.
188. VITERI, F.E. et al. Iron fortification in developing countries. **Prog Clin Biol Res**, New York, v.77, p.345-354, 1981.
189. WALKER, G.J., PULKOWNIK, A., MORREY-JONES, J.G. Metabolism of the polysaccharides of human dental plaque: Release of dextranase in batch cultures of *Streptococcus mutans*. **J Gen Microbiol**, Reading, v.127, n.1, p.201-208, Nov. 1981.
190. WALTER, L.R.F. et al. Cárie em crianças de 0 a 30 meses de idade e sua relação com hábitos alimentares. **Encicl Bras Odontol**, Rio de Janeiro, v.5, n.12, p.129-136, dez. 1987.
191. WEISS, M.E., BIBBY, B.G. Some protein effects on enamel solubility. **Arch Oral Biol**, Oxford, v.11, n.1, p.49-63, Jan. 1966.
192. WESTOVER, K.M., DILORETO, M.K., SHEARER, T.R. The relationship of breast feeding to oral development and dental concerns. **ASDC J Dent Child**, Chicago, v.56, n.2, p.140-143, Mar./Apr. 1989.
193. WHITE, C.H. Milk, milk products, and dental health. **J Dairy Sci**, Champaign, v.70, n.2, p.392-396, Feb. 1987.

194. WORLD HEALTH ORGANIZATION STUDY GROUP ON DIET, NUTRITION AND PREVENTION OF NONCOMMUNICABLE DISEASES: Diet, nutrition and prevention of chronic diseases: **Report of WHO study group**. WHO technical reports series. Geneva: World Health Organization, 1990.
195. YAMASHITA, Y., BOWEN, W. H., KURAMITSU, H. K. Molecular analysis of a *Streptococcus mutans* strain exhibiting polymorphism in the tandem gtfB and gtfC genes. **Infect Immun**, Washington, v.60, n.4, p.1618-1624, Apr. 1992.
196. _____. *et al.* Role of the *Streptococcus mutans* gtf genes in caries induction in the specific-pathogen-free rat model. **Infect Immun**, Washington, v.61, n.9, p.3811-3817, Sept. 1993.
197. YIP, R. The challenge of controlling iron deficiency: Sweet news from Guatemala. **Am J Clin Nutr**, Bethesda, v.61, n.5, p.1164-1165, May 1995.
198. YOUNG, A., MORTEN, R., RÖLLA, G. Quantitative and qualitative analyses of human salivary micelle-like globules. **Acta Odontol Scand**, Oslo, v.57, n.2, p.105-110, Apr. 1999.
199. _____. *et al.* On the role of human salivary micelle-like globules in bacterial agglutination. **Eur J Oral Sci**, Copenhagen, v.105, n.5 pt.2, p.485-494, Oct. 1997.
200. ZADIK, D., ZUSMAN, S.P., KELMAN, A.M. Caries prevalence in 5 and 12 year-old children in Israel. **Comm Dent Oral Epid**, Copenhagen, v.20, n.1, p.54-55, Feb. 1992.

ANEXOS

ANEXO 01- Formulação da dieta 2000*

Componentes da Fórmula	g/kg
Leite em pó desnatado	280,0
Alfafa (17% proteína)	30,0
Fígado dessecado	10,0
Extrato de levedura (pó)	40,0
Farinha de trigo	60,0
Sacarose pó (Glaçúcar®)	560,0
Sal iodado	20,0

* KEYES & JORDAN, 1964

ANEXO 02 – Dieta Líquida NCP#2*

Componentes da Dieta	Quantidade
Água destilada deionizada esterilizada	60,0 mL
Suplemento protéico ProMod®	67,6 g
Similac Special Care® com baixa concentração de ferro	232,0 mL
Similac® (com ferro)	232,0 mL
Óleo de milho - Mazzola®	276,0 mL
Volume final (aproximado)	900 m L

* BOWEN *et al.*, 1997.

Acrescente ProMod® e todos os componentes em um copo de liquidificador e, usando baixa velocidade, bata até que todos os componentes estejam homogeneizados. Coloque a mistura em uma vasilha plástica e uma barra magnética. Mantenha refrigerado. Homogeneizar a fórmula antes de usar.

Notas:

ProMod® é uma marca registrada de Ross Product Division – Abbot Laboratories (Columbus, Ohio).

Similac® é uma marca registrada de Ross Product Division – Abbot Laboratories (Columbus, Ohio).

Mazola® é uma marca registrada das Refinações de Milho, Brasil Ltda (Pouso Alegre, Minas Gerais)

ANEXO 03 – Diagrama de Keyes

EXPERIMENTAL DENTAL CARIES IN RATS										TOTAL CROWN TEETH										MANDIBULAR AND MAXILLARY MOLARS											
REMARKS																															
MAXILLARY MOLARS - Left EXP. CODE ANIMAL NUMBER GROUP NUMBER MAXILLARY MOLARS - Right EXP. CODE ANIMAL NUMBER GROUP NUMBER										BUCCAL		LINGUAL		PROXIMAL		MUSCUL		BUCCAL		LINGUAL		PROXIMAL		MUSCUL		TOTAL		MAXILLARY MOLARS - Left		MAXILLARY MOLARS - Right	
										EXP. CODE		ANIMAL NUMBER		GROUP NUMBER		EXP. CODE		ANIMAL NUMBER		GROUP NUMBER		EXP. CODE		ANIMAL NUMBER		GROUP NUMBER		EXP. CODE		ANIMAL NUMBER	
										1		2		3		4		5		6		7		8							
										9		10		11		12		13		14		15		16							
										17		18		19		20		21		22		23		24							
										25		26		27		28		29		30		31		32							
										33		34		35		36		37		38		39		40							
										41		42		43		44		45		46		47		48							
										49		50		51		52		53		54		55		56							
										57		58		59		60		61		62		63		64							
										65		66		67		68		69		70		71		72							
										73		74		75		76		77		78		79		80							
										81		82		83		84		85		86		87		88							
										89		90		91		92		93		94		95		96							
										97		98		99		100		101		102		103		104							
										105		106		107		108		109		110		111		112							
										113		114		115		116		117		118		119		120							
										121		122		123		124		125		126		127		128							
										129		130		131		132		133		134		135		136							
										137		138		139		140		141		142		143		144							
										145		146		147		148		149		150		151		152							
										153		154		155		156		157		158		159		160							
										161		162		163		164		165		166		167		168							
										169		170		171		172		173		174		175		176							
										177		178		179		180		181		182		183		184							
										185		186		187		188		189		190		191		192							
										193		194		195		196		197		198		199		200							
										201		202		203		204		205		206		207		208							
										209		210		211		212		213		214		215		216							
										217		218		219		220		221		222		223		224							
										225		226		227		228		229		230		231		232							
										233		234		235		236		237		238		239		240							
										241		242		243		244		245		246		247		248							
										249		250		251		252		253		254		255		256							
										257		258		259		260		261		262		263		264							
										265		266		267		268		269		270		271		272							
										273		274		275		276		277		278		279		280							
										281		282		283		284		285		286		287		288							
										289		290		291		292		293		294		295		296							
										297		298		299		300		301		302		303		304							
										305		306		307		308		309		310		311		312							
										313		314		315		316		317		318		319		320							
										321		322		323		324		325		326		327		328							
										329		330		331		332		333		334		335		336							
										337		338		339		340		341		342		343		344							
										345		346		347		348		349		350		351		352							
										353		354		355		356		357		358		359		360							
										361		362		363		364		365		366		367		368							
										369		370		371		372		373		374		375		376							
										377		378		379		380		381		382		383		384							
										385		386		387		388		389		390		391		392							
										393		394		395		396		397		398		399		400							
										401		402		403		404		405		406		407		408							
										409		410		411		412		413		414		415		416							
										417		418		419		420		421		422		423		424							
										425		426		427		428		429		430		431		432							
										433		434		435		436		437		438		439		440							
										441		442		443		444		445		446		447		448							
										449		450		451		452		453		454		455		456							
										457		458		459		460		461		462		463		464							
										465		466		467		468		469		470		471		472							
										473		474		475		476		477		478		479		480							
										481		482		483		484		485		486		487		488							
										489		490		491		492		493		494		495		496							
										497		498		499		500		501		502		503		504							
										505		506		507		508		509		510		511		512							
										513		514		515		516		517		518		519		520							
										521		522		523		524		525		526		527		528							
										529		530		531		532		533		534		535		536							
										537		538		539		540		541		542		543		544							
										545		546		547		548		549		550		551		552							
										553		554		555		556		557		558		559		560							
										561		562		563		564		565		566		567		568							
										569		570		571		572		573		574		575		576							
										577		578		579		580		581		582		583		584							
										585		586		587		588		589		590		591		592							
										593		594		595		596		597		598		599		600							
										601		602		603		604		605		606		607		608							
										609		610		611		612		613		614		615		616							
										617		618		619		620		621		622		623		624							
										625		626		627		628		629		630		631		632							
										633		634		635		636		637		638		639		640							
										641		642		643		644		645		646		647		648							
										649		650		651		652		653		654		655		656							
										657		658		659		660		661		662		663		664							
										665		666		667		668		669		670		671		672							
										673		674		675		676		677		678		679		680							
										681		682		683		684		685		686		687		688							
										689		690		691		692		693		694		695		696							
										697		698		699		700		701		702		703		704							
										705		706		707		708		709		710		711		712							
										713		714		715		716		717		718		719		720							
										721		722		723		724		725		726		727		728							
										729		730		731		732		733		734		735		736							
										737		738		739		740		741		742		743		744							
										745		746		747		748		749		750		751		752							
										753		754		755		756		757		758		759		760							
										761		762		763		764		765		766		767		768							
										769		770		771		772		773		774		775		776							
										777		778		779		780		781		782		783		784							
										785		786		787		788		789		790		791		792							
										793		794		795		796		797		798		799		800							
										801		802		803		804		805		806		807		808							
										809		810		811		812		813		814		815		816							
										817		818		819		820		821		822		823		824							
										825		826		827		828		829		830		831		832							
										833		834		835		836		837		838		839		840							
										841		842		843		844		845		846		847		848							

ANEXO 04 – Aprovação pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) / IB / UNICAMP.



INSTITUTO DE BIOLOGIA
UNICAMP



CEEA-IB-UNICAMP

Comissão de Ética na Experimentação Animal
Instituto de Biologia
Universidade Estadual de Campinas
CEEA-IB-UNICAMP

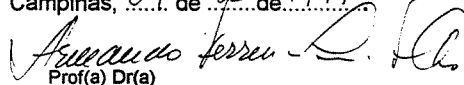
CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 027-1 sobre "Cariogenicidade de diferentes tipos de leite: efeito da suplementação com Ferro" sob a responsabilidade de Pedro Luiz Rosolen está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 04/05/1999. Este certificado expira em 05/05/2000.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº, about ".....", agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the Biological Institute/UNICAMP Ethical Committee for Animal Research (CEEA) in/...../..... Expiration date/...../.....


Prof(a)/Dr(a)
Presidente – CEEA/IB/UNICAMP

Campinas, 04 de 05 de 1999

Prof(a) Dr(a)
Secretário(a) – CEEA/IB/UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CIDADE UNIVERSITÁRIA, ZEFERINO VAZ
CEP -13.081-970 - CAMPINAS - SP - BRASIL

TELEFONE (019) 788.7116
FAX (019) 289.3124