

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

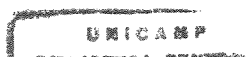
LUCIANE CRISTINA COPPI
CIRURGIÃ-DENTISTA

**AVALIAÇÃO DA CARIOGENICIDADE DE DIFERENTES TIPOS DE
LEITE E EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM FLÚOR.**

Dissertação apresentada à Faculdade
de Odontologia de Piracicaba,
Universidade Estadual de Campinas,
para obtenção do título de Mestre em
Odontologia, área de Farmacologia,
Anestesiologia e Terapêutica.

Piracicaba
2000

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

**LUCIANE CRISTINA COPPI
CIRURGIÃ-DENTISTA**

**AVALIAÇÃO DA CARIOGENICIDADE DE DIFERENTES TIPOS DE
LEITE E EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM FLÚOR.**

**Dissertação apresentada à Faculdade
de Odontologia de Piracicaba,
Universidade Estadual de Campinas,
para obtenção do título de Mestre em
Odontologia, área de Farmacologia,
Anestesiologia e Terapêutica.**

Orientador: Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen

Banca Examinadora:

**Profa. Dra. Odila Pereira da Silva Rosa
Profa. Dra. Maria Cristina Volpato
Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen**

200102367

**Piracicaba
2000**

Ficha Catalográfica

C795a	Coppi, Luciane Cristina. Avaliação da cariogenicidade de diferentes tipos de leite e efeito da suplementação com flúor. / Luciane Cristina Coppi. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2000. 180p. : il. Orientador : Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba. 1. Cáries dentárias. 2. Flúor. 3. Leite. 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.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

**LUCIANE CRISTINA COPPI
CIRURGIÃ-DENTISTA**

**AVALIAÇÃO DA CARIOGENICIDADE DE DIFERENTES TIPOS DE
LEITE E EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM FLÚOR.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica.

Este exemplar foi devidamente corrigido,
de acordo com a Resolução CCPG-036/83
CPG, 29 / 11 / 2000

Assinatura do Orientador

Orientador: Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Odila Pereira da Silva Rosa
Profa. Dra. Maria Cristina Volpato
Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen

**Piracicaba
2000**

Ficha Catalográfica

C795a Coppi, Luciane Cristina.
Avaliação da cariogenicidade de diferentes tipos de leite e efeito da suplementação com flúor. / Luciane Cristina Coppi. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2000.
180p. : il.

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

1. Cáries dentárias. 2. Flúor. 3. Leite. 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 30 de Junho de 2000, considerou a candidata LUCIANE CRISTINA COPPI aprovada.

1. Prof. Dr. PEDRO LUIZ ROSALEN

A handwritten signature in dark ink, appearing to read "Pedro L. Rosalen", written over a horizontal line.

2. Profa. Dra. ODILA PEREIRA DA SILVA ROSA

A handwritten signature in dark ink, appearing to read "Odila Rosa", written over a horizontal line.

3. Profa. Dra. MARIA CRISTINA VOLPATO

A handwritten signature in dark ink, appearing to read "M. C. Volpato", written over a horizontal line.

*Se não houver frutos, valeu a beleza das flores...
Se não houver flores, valeu a sombra das folhas...
Se não houver folhas, valeu a intenção da semente.*

Henfil

DEDICO ESTE TRABALHO

Aos meus queridos pais, ***Eliseu e Maria*** ,
pelo apoio incondicional e amor infinito,
os quais sempre me fizeram seguir em frente.
Pela oportunidade de estudo e, principalmente, pelos ensinamentos que
contribuíram para a minha formação como ser humano.

À minha ***Família***

UNICAMP
BIBLIOTÉCA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Com Carinho.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A ***DEUS***, zeloso protetor
pela onipresença em todos os momentos de
minha vida, que ilumina sempre o meu caminho
e norteia os meus passos numa direção eterna.
A minha devoção.

A ***Alberto Pierrot e Pedro Eugênio***, que há anos me
auxiliam nos momentos de conflitos e dúvidas,
orientando-me e dando forças para
trilhar essa caminhada.
Meu sincero agradecimento.

Ao Prof. Dr. *Pedro Luiz Rosalen*,
pelos valorosos ensinamentos transmitidos.
Pela orientação objetiva, criteriosa
e pela severidade com que luta pelo
engrandecimento da Odontologia.

À *Regina Célia Rocha Peres*,
pela amizade e encorajamento
dispensados por
todo este trabalho.

AGRADECIMENTOS

A todos os *Professores do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia*, que sempre procuraram transmitir seus conhecimentos e experiências. Em especial, ao Prof. Dr. *Francisco Carlos Groppo* e Profa. Dra. *Maria Cristina Volpato*, que me auxiliaram nos períodos experimentais.

Ao Prof. *Ricardo de Oliveira Bozzo*, pelo incentivo e confiança depositados desde o curso da graduação.

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

Ao(s) Sr(s). *José Carlos Gregório, Waldomiro Vieira Filho, Wanderlei Francisco Vieira e Sérgio Amaral Campos*, que me prestaram valiosa ajuda durante os períodos experimentais deste trabalho, fundamental para sua complementação.

Às minhas amigas *Ana Carolina Scavariello e Luciana Sequinato*, pela amizade sincera que persiste há anos, compartilhando comigo todos os momentos de minha vida.

À colega *Ana Paula D. B. Ruenis*, pelo incentivo e orientação dispensados em meu estágio.

Às colegas da Farmacologia *Roberta, Flávia, Rosana, Juliana, Ynara, Fernanda, Aline, Eliane e Simone* por todos os momentos que passamos juntas e que contribuíram para o meu amadurecimento pessoal e profissional.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

A *Júlio César Santaratto e Lúcia H. S. Varuzza*, pela disponibilidade e auxílio técnico prestados.

À bibliotecária *Marilene Girello* e estatística *Gláucia M. B. Ambrosano*, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, pela ajuda recebida.

À *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)*, do Ministério de Educação e Cultura, pelo apoio financeiro durante o Mestrado.

E a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram e auxiliaram para a realização deste trabalho, meu agradecimento.

SUMÁRIO

	página
LISTAS	1
Lista das tabelas	3
Lista das figuras e gráficos	4
Lista das abreviaturas	6
RESUMO	9
ABSTRACT	13
1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DA LITERATURA	23
3. PROPOSIÇÃO	45
4. MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1 Experimento I	51
4.2 Experimento II	63
5. RESULTADOS	75
5.1 Experimento I	77
5.2 Experimento II	93
6. DISCUSSÃO	117
7. CONCLUSÃO	139
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	143
ANEXO	175

LISTAS

LISTA DAS TABELAS

	página
TABELA 1 - Média (erro padrão) do ganho de peso (g) das ratas dessalivadas, após 21 dias experimentais. (Experimento I)	77
TABELA 2 - Média (erro padrão) da quantidade de líquidos (mL) consumidos diariamente pelas ratas. (Experimento I)	81
TABELA 3 - Média (Posto Médio)* da microbiota total, <i>S. sobrinus</i> e porcentagem de <i>S. sobrinus</i> recuperada. (Experimento I)	83
TABELA 4 - Média (Posto Médio) do índice de cárie* do total de superfícies lisas e severidade em ratas dessalivadas. (Experimento I)	87
TABELA 5 – Média (Posto Médio) do índice de cárie* do total de sulco e severidade em ratas dessalivadas. (Experimento I)	89
TABELA 6 – Média (erro padrão) do ganho de peso (g) das ratas dessalivadas, após 21 dias experimentais. (Experimento II)	93
TABELA 7 - Média (erro padrão) da quantidade de líquidos (mL) consumidos diariamente pelas ratas. (Experimento II)	97
TABELA 8 – Média (Posto Médio)* da microbiota total, <i>S. sobrinus</i> e porcentagem De <i>S. sobrinus</i> recuperada. (Experimento II)	99
TABELA 9 – Média (Posto Médio) do índice de cárie* do total de superfícies lisas e severidade em ratas dessalivadas. (Experimento II)	103
TABELA 10 - Média (Posto médio) do índice de cárie* do total de sulco e severidade em ratas dessalivadas. (Experimento II)	107
TABELA 11 - Açúcares (%) presentes nos leites avaliados.	109
TABELA 12 - Flúor iônico (ppm) presente nos leites avaliados.	113
TABELA 13 - Índice de cariogenicidade relativa dos leites.	115

LISTA DAS FIGURAS E GRÁFICOS

FIGURA 1 - Obtenção de esfregaço bucal, na recepção dos animais.	página 53
FIGURA 2 - Ligação do ducto da glândula parótida.	57
FIGURA 3 – Remoção das glândulas sublinguais e submandibulares.	57
FIGURA 4 - Entubação gástrica para administração de dieta líquida NCP#2, duas vezes ao dia (às 9 h e às 14 h).	61
FIGURA 5 - Registro do consumo diário de líquidos e pesagem semanal dos animais.	61
FIGURA 6 - Remoção da hemimandíbula esquerda.	67
FIGURA 7 - Suspensão da hemimandíbula em NaCl a 0,9%.	67
FIGURA 8 - Sonicação das amostras.	67
FIGURA 9 - Inoculação da suspensão em meio de cultura, utilizando máquina <i>Spiral Plater</i> .	67
FIGURA 10 - Dissecção das mandíbulas e maxilas.	69
GRÁFICO 1 - Média do ganho de peso (g) das ratas dessalivadas, após 21 dias experimentais. (Experimento I)	79
GRÁFICO 2 - Média da quantidade de líquidos (mL) consumidos diariamente pelas ratas. (Experimento I)	81
GRÁFICO 3 – Média da porcentagem de <i>S. sobrinus</i> recuperada da cavidade bucal de ratas que receberam diferentes tipos de leites. (Experimento I)	85
GRÁFICO 4 - Média do ganho de peso (g) das ratas dessalivadas, após 21 dias experimentais. (Experimento II)	95

GRÁFICO 5 - Média da quantidade de líquidos (mL) consumidos diariamente pelas ratas. (Experimento II)	97
GRÁFICO 6 - Média da porcentagem de <i>S. sobrinus</i> recuperada da cavidade bucal de ratas que receberam diferentes tipos de leites. (Experimento II)	101

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

LISTA DAS ABREVIATURAS

ADE – água destilada, deionizada e esterilizada

λ - lâmbda

CEEA – Comissão de Ética na Experimentação Animal

CEMIB – Biotério Central da Unicamp

Chem. – Chemistry

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Co. – Corporation

Com. – Comércio

CR – cariogenicidade relativa

Dm – lesão moderada da dentina

Ds – lesão leve da dentina

et al. – e outros (abreviatura de *et alii*)

F – flúor

FIG. – figura

g – grama

GRAF. – gráfico

GTF – glucosiltransferase

h – horas

HF – ácido fluorídrico

IB – Instituto de Biologia

Ind. – Indústria

Kg – quilograma

KJ/mol – quilojoule por mol

Lab. – Laboratório

LMW – *Low Molecular Weight*

Ltda. - Limitada

M – molar

mg – miligrama

mL – mililitro

mM – milimolar

MSA – Ágar Mitis Salivarius

MSB – Ágar Mitis Salivarius mais bacitracina

MSS – Ágar Mitis Salivarius mais estreptomicina

NaCl – cloreto de sódio

NaF – fluoreto de sódio

NCP – nutrição essencial líquida

nm – nanômetro

nº – número

pH – potencial hidrogeniônico

ppm – partes por milhão

S. mutans – *Streptococcus mutans*

S. sobrinus – *Streptococcus sobrinus*

Sac – sacarose

SDW – *sterile dionized distilled water*

seg – segundos

SP – São Paulo

spf – *specific pathogen free*

sup. – superfície

T – total

TAB. – tabela

TISAB – tampão de acetato 1,0 M, pH 5,0, contendo NaCL 1,0 M e 1,2-ciclohexanediaminetetraacético 0,4%

u.f.c. – unidades formadoras de colônias

W – watts

WHO – *World Health Organization*

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

RESUMO

RESUMO

Este trabalho teve como objetivos avaliar a cariogenicidade dos leites bovino, humano, formulados infantis e o efeito anticariogênico do flúor, quando suplementado em uma fórmula infantil, utilizando modelo animal de cárie sujeito a um alto desafio cariogênico. Dois experimentos foram realizados para atingir os objetivos propostos. No primeiro experimento, foram utilizadas sessenta ratas Wistar spf (*specific pathogen free*) infectadas com *Streptococcus sobrinus* e dessalivadas, que receberam dieta 2000 e água destilada, deionizada e esterilizada (ADE) com 10% de sacarose, *ad libitum*, por sete dias. Após estes procedimentos, os animais foram individualmente aleatorizados e colocados em gaiolas suspensas individuais, sendo divididos em seis grupos experimentais: Grupo (1) ADE com 5% de sacarose *ad libitum* e dieta essencial NCP#2, via entubação gástrica, duas vezes ao dia; (2) Leite bovino (Tipo A), *ad libitum*; Leites elaborados em fórmulas infantis: (3) Nan 2[®] reconstituído com ADE, *ad libitum*; (4) Nestogeno 2[®] reconstituído com ADE, *ad libitum*; (5) Ninho[®] coadjuvante de crescimento reconstituído com ADE, *ad libitum*; (6) ADE *ad libitum* e dieta essencial NCP#2, via entubação gástrica, duas vezes ao dia. No segundo experimento, foram testados os leites humano e a formulação industrial mais cariogênica obtida do primeiro experimento a qual foi suplementada com flúor. Desta forma, cinco grupos de dez ratas dessalivadas infectadas com *S. sobrinus* foram divididas em gaiolas suspensas recebendo: Grupo (1) ADE com 5% de sacarose *ad libitum* e dieta essencial NCP#2, via entubação gástrica, duas vezes ao dia; (2) Leite humano, *ad libitum*; Leites elaborados em fórmulas infantis: (3) Ninho[®] coadjuvante de crescimento reconstituído com ADE, *ad libitum*; (4) Ninho[®] coadjuvante de crescimento reconstituído com ADE suplementado com 10 ppm de flúor (NaF), após reconstituição e fornecido *ad libitum*; (5) ADE *ad libitum* e dieta essencial NCP#2, via entubação gástrica, duas vezes ao dia. Ao final de 21 dias experimentais, os animais de ambos experimentos foram sacrificados e avaliados quanto à microbiota oral recuperada e ao índice de cárie pelo método de Keyes

(1958) modificado por Larson (1981). Os resultados foram tratados estatisticamente através dos testes Shapiro-Wilk e Kruskal-Wallis. No experimento I, o leite bovino se apresentou como o menos cariogênico entre os leites, enquanto o Ninho[®] foi o que causou maior índice de cárie. Quanto à porcentagem de *S. sobrinus* recuperada da cavidade oral dos animais, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados, exceto para o grupo ADE. No experimento II, tanto o leite humano quanto o Ninho[®] suplementado com flúor, se apresentaram com menor cariogenicidade, não diferindo estatisticamente do grupo ADE, quanto ao total de cárie de superfície lisa. Quanto à porcentagem de *S. sobrinus* recuperada da cavidade oral, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos que receberam solução com sacarose e leites. Pode-se concluir que os leites bovino e humano não foram cariogênicos e a adição de flúor na reconstituição do leite formulado foi capaz de reduzir sua cariogenicidade de forma significativa. As fórmulas infantis mostraram significativa potencial cariogênico, devendo ser utilizadas com cautela.

PALAVRAS-CHAVE: Cárie, leite, flúor, rata.

ABSTRACT

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the cariogenic potential of cow, human and infant formula milks, and an infant formula milk supplemented with fluoride, using an animal model for caries assessment subjected to a high cariogenic challenge. Two separate animal experiments were performed. In the first, sixty female Wistar spf (specific pathogen free) rats, infected with *Streptococcus sobrinus* and desalivated, received diet 2000, and sterile dionized distilled water (SDW) with 10% sucrose *ad libitum* for seven days. After these procedures the animals were randomly placed in individual suspended cages and divided into six experimental groups. Group (1) SDW with 5% sucrose *ad libitum* and essential diet NCP#2, by gavage twice a day; (2) cow milk, *ad libitum*; infant formula solutions: (3) Nan 2[®] reconstituted with SDW, *ad libitum*; (4) Nestogeno 2[®] reconstituted with SDW, *ad libitum*; (5) Ninho[®] growth supporting reconstituted with SDW, *ad libitum*; (6) SDW *ad libitum* and essential diet NCP#2, by gavage twice a day. In the second experiment, the human milk and the most cariogenic infant formula found in the first experiment, which was supplemented with fluoride, were tested. Therefore, five groups of desalivated female rats infected with *S. sobrinus* were assigned to suspended cages and given: Group (1) SDW with 5% sucrose *ad libitum* and essential diet NCP#2, by gavage twice a day; (2) Human milk, *ad libitum*; infant formulas: (3) Ninho[®] growth supporting reconstituted with SDW, *ad libitum*; (4) Ninho[®] growth supporting reconstituted with SDW with 10 ppm fluoride (NaF), final concentration *ad libitum*; (5) SDW *ad libitum* and essential diet NCP#2, by gavage twice a day. In the end of 21-experimental days the animals from both experiments were killed and evaluated according to recovered oral microbiota and caries score by using Keyes (1958) modified by Larson (1981). The results were statistically assessed through Shapiro-Wilk and Kruskal-Wallis. On experiment I, cow milk was the least cariogenic of all milks examined, whereas Ninho[®] was the most cariogenic. As for the percentage of *S. sobrinus* obtained from the oral cavity of the animals, there were no statistically significant differences between the

groups studied, except for SDW group. In experiment II, both the human milk and Ninho[®] supplemented with fluoride showed less cariogenic potential, showing no difference in some scores when compared to the SDW group. As for the percentage of *S. sobrinus* recovered from the oral cavity, there were no statistically significant differences among the groups that received sucrose and milk solutions. It can be concluded that cow milk and human milk were not cariogenic, and that the addition of fluoride during the reconstitution of infant formula was able to decrease its cariogenicity significantly. The infant formulas showed some cariogenic potential and should be consumed under caution.

Keywords: Caries, milk, fluoride, rat.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Cárie dental é uma doença infecciosa e transmissível, sendo um dos problemas mais freqüentes e antigos na humanidade (**KEYES, 1960; BOWEN *et al.*, 1997**). A etiologia da cárie dental pode ser considerada multifatorial, estando relacionada com as interações entre hospedeiro susceptível, dieta cariogênica, microrganismo e tempo (**TANZER, 1981**).

A cárie de mamadeira tem sido diagnosticada em diversas crianças que fazem uso da amamentação, sendo motivo de preocupação em muitos países (**GARDNER *et al.*, 1977; KOTLOW, 1977; BRAMS & MALONEY, 1983; HACKETT *et al.*, 1984**). A causa deste padrão de cárie se deve ao prolongado e excessivo período de amamentação materna, assim como, dos conteúdos presentes em mamadeiras (**ALALUUSUA *et al.*, 1996a; BOWEN *et al.*, 1997; ARAUJO *et al.*, 1998**).

A utilização do leite na alimentação humana é muito antiga e vem persistindo até os dias atuais, de tal forma que o leite tem sido considerado um dos alimentos mais consumidos pela humanidade (**BOWEN & PEARSON, 1993**).

O leite bovino se destaca em produção e consumo e por isso merece maior atenção quanto aos efeitos na saúde da população. Este produto contém proteínas, glicídeos (lactose), lipídios, protídios (caseína, albumina), sais minerais, vitaminas A e D, além de ser rica fonte de vitamina B e diversos outros elementos como ferro, iodo, cálcio e enzimas (**FLYNN, 1992; ARAUJO *et al.*, 1998; PETTI *et***

al., 2000). Restritamente, em relação à saúde dental, deve ser enfatizado quanto ao leite bovino o potencial antibacteriano de suas enzimas (KOSIKOWSKI, 1970) e anticariogênico de algumas fosfoproteínas (REYNOLDS, 1987), bem como o papel da vitamina D, cálcio e flúor¹ na estrutura do dente (WESTOVER *et al.*, 1989). O leite bovino contém ainda aproximadamente 4% de lactose, que poderia contribuir para o desenvolvimento da cárie dental (STEPHAN, 1966; BOWEN *et al.*, 1991). Com base nesses fatores, muitos trabalhos procuram esclarecer o verdadeiro papel desse tipo de leite na saúde bucal.

Dos diferentes tipos de leites consumidos pelas crianças, destaca-se o leite humano por possuir vantagens nutricionais, imunológicas e psicológicas (SUZUKI *et al.*, 1976; WESTOVER *et al.*, 1989), além da contribuição no crescimento e desenvolvimento da mandíbula (WESTOVER *et al.*, 1989). O leite humano é composto de proteínas, lipídios, carboidratos (7% lactose), vitaminas lipo e hidrossolúveis, minerais como cálcio, ferro, flúor, iodo e outros, sendo a única fonte de nutrientes nos primeiros meses de vida dos bebês (FLYNN, 1992), apresentando grande importância para a saúde geral e bucal da criança (WESTOVER *et al.*, 1989). Portanto, várias campanhas têm sido desenvolvidas com objetivos de motivar e orientar a população sobre seus benefícios.

Uma grande variedade de leites formulados, líquidos ou em pó, tem sido encontrada nos supermercados e farmácias e vem ganhando espaço na

¹ Termo genérico para definir as formas iônicas (Fluoreto, ionizável e não ionizável) do elemento flúor (CURY, 1990).

suplementação nutricional de bebês e crianças. A composição do leite bovino é em geral alterada pela indústria, que acrescenta ou reduz seus componentes, originando o leite formulado. Exemplos destes, são os leites fortificados ou suplementados, conhecidos pelo teor diferencial de certos componentes, como ferro, algumas vitaminas ou pelo baixo teor de lactose e gordura (**SHEIKH & ERICKSON, 1996**).

Estas fórmulas infantis são reconstituídas a leite geralmente utilizando água de abastecimento público. O índice de redução de cárie pelo flúor presente na água consumida pelos humanos, varia de 10% a 60% (**O'MULLANE, 1990; HARGREAVES, 1992**). Mesmo em baixas concentrações, o flúor atua reduzindo a desmineralização e promovendo a remineralização das lesões iniciais (**SILVERSTONE, 1977; TEN CATE & REMPT, 1986**). Esta água, uma vez fluoretada, é considerada um método efetivo, seguro, econômico e disponível para grandes populações na prevenção da cárie dental (**DIRKS *et al.*, 1978; MURRAY *et al.*, 1991; O'MULLANE, 1994**).

Em decorrência do consumo de leite bovino, humano e formulado, especialmente durante a infância e a correlação com a cárie dental segundo relatos da literatura, justificam-se os objetivos do presente trabalho de avaliar a cariogenicidade dos mesmos e também de verificar o efeito anticárie do flúor, quando suplementado ao leite, em animais expostos a um grande desafio cariogênico.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

2. REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA

Por mais de três décadas, assume-se que a cárie dental é uma doença infecciosa e transmissível (**KEYES, 1960; BOWEN *et al.*, 1997**). Em termos gerais, pode-se considerar sua etiologia como multifatorial considerando as interações entre hospedeiro susceptível, dieta cariogênica, microrganismo e tempo (**TANZER, 1981**). Sua prevalência, em alguns segmentos da população, tem diminuído nos últimos 25 anos, porém, ainda continua significando um problema de saúde pública para alguns grupos sociais (**BOWEN *et al.*, 1997; PAKHOMOV, 2000**).

A cárie de mamadeira tem sido diagnosticada em diversas crianças que fazem uso da amamentação (**GARDNER *et al.*, 1977; KOTLOW, 1977; BRAMS & MALONEY, 1983; HACKETT *et al.*, 1984**). **MILNES (1996)** reportou 80% de prevalência de cárie dental em crianças de até 4 anos de idade, em um grupo de nativos da América. Outros autores estimam que 3% a 6% das crianças, nesta faixa etária, apresentam cárie de mamadeira, sendo que em algumas populações esta relação pode variar de 10% a 13% (**MATTOS-GRANER *et al.*, 1996; ERICKSON *et al.*, 1998**).

O leite humano tem sido considerado por alguns profissionais como o agente responsável pelo aparecimento da cárie dental similar à cárie de mamadeira. Esta condição geralmente se atribui ao fato das mães amamentarem seus filhos por um período prolongado, permitindo que a criança mame e durma

em contato com o seio com alta freqüência. Estes fatores determinam a presença desta típica cárie dental, que se caracteriza pela progressão rápida, com envolvimento pulpar precoce, envolvendo dentes raramente susceptíveis à cárie como os incisivos superiores, apresentando maior predominância na superfície vestibular dos incisivos e lingual dos molares superiores e posteriormente nos molares inferiores (SHELTON *et al.*, 1977; KOTLOW, 1977; ROBERTS, 1982; ALALUUSUA *et al.*, 1996a). A posição do bico do seio ou da mamadeira, entre o palato e a língua, permite um prolongado contato dos dentes superiores com o líquido cariogênico (GARDNER *et al.*, 1977), enquanto a diminuição do fluxo salivar durante o sono favorece ainda mais a utilização do substrato pela bactéria (KOTLOW, 1977). Por outro lado, os incisivos inferiores são pouco afetados, pois estão constantemente envolvidos pela saliva (GARDNER *et al.*, 1977), além de estarem sob a proteção da língua (SHELTON *et al.*, 1977; JOHNSEN, 1984), sendo, portanto, motivo de discussão da saúde bucal por pediatras, dentistas e pesquisadores.

A cárie de mamadeira aparenta estar fortemente associada com a infecção por *Streptococcus mutans* nas superfícies dentais, sendo que aproximadamente 60% da microbiota da placa dental é composta por *S. mutans* (VAN HOUTE *et al.*, 1982; BERKOWITZ *et al.*, 1984). A sacarose é considerada o carboidrato de maior potencial cariogênico (KRASSE, 1988; NEWBRUN, 1988). Segundo KRASSE (1988). Com a presença de sacarose o *S. mutans* sintetiza polissacarídeos extracelulares, que conferem volume e adesividade à placa dental

e grandes quantidades de ácido láctico, que promovem diminuição do pH da placa e conseqüente desmineralização do esmalte. **KOULOURIDES *et al.***, em **1976**, relataram que há variação do pH da placa bacteriana em função de vários açúcares e concluíram que a lactose não reduziu o pH tão bruscamente quanto a sacarose, glicose, frutose e maltose.

Outro fator a ser considerado na cárie de mamadeira é a relação entre o nível de infecção e a prevalência de cárie dental entre os membros de uma mesma família. Estudos em animais concluíram que filhotes provenientes de mães com alta atividade de cárie apresentaram também maior infecção por *S. mutans* e índice de cárie, quando comparados com aqueles provenientes de mães com baixa atividade de cárie e que, portanto, apresentavam menor infecção por *S. mutans* e índice de cárie, mostrando que a virulência do *S. mutans* é um dos fatores que estabelece alto envolvimento da lesão cariosa (**BOWEN *et al.***, **1997**).

A diminuição do fluxo salivar durante o período noturno, quando associada ao uso da mamadeira, estimula o desenvolvimento dos microrganismos. Durante o sono, há a diminuição do fluxo salivar e o acesso da saliva aos dentes pode ser ainda mais restrito quando o bico da mamadeira se interpõe entre os dentes e a língua. Este fato, associado com a estagnação do leite açucarado em volta dos dentes, resulta em um meio altamente cariogênico e nestas circunstâncias favorece o aparecimento da cárie de mamadeira pelo aumento da cariogenicidade dos alimentos, sem a influência fisiológica da saliva (**BOWEN**, **1998**).

O leite apresenta propriedades físicas similares às da saliva (REYNOLDS & STOREY, 1979; BOWEN *et al*, 1991). A presença de cálcio, fósforo, magnésio e vitamina D em sua constituição, assim como nos seus derivados, contribuem na formação e no desenvolvimento dos dentes e ossos (WHITE, 1987). Ainda apresenta substâncias antimicrobianas como lisozima, peroxidase, lactoferrina, imunoglobulinas e possivelmente fatores de agregação bacteriana que podem afetar a microbiota bucal (KOSIKOWSKI, 1970; BOWEN & PEARSON, 1993) sendo, portanto, essencial para a saúde bucal, especialmente da criança (SHELTON *et al.*, 1977), por apresentar propriedades cariostáticas (BOWEN & PEARSON, 1993).

Embora o leite de muitas espécies seja explorado pelo homem, o leite bovino se destaca em produção e consumo. De forma geral, este produto contém proteínas, glicídeos (lactose), lipídios, protídios (caseína, albumina), sais minerais, vitaminas A e D, além de ser rica fonte de vitamina B (riboflavina e cálcio – quatro vezes mais que o leite materno) e diversos outros elementos como ferro, iodo, sódio, potássio, cloro, fósforo e zinco, todos consideravelmente importantes para o organismo (FLYNN, 1992; ARAUJO *et al.*, 1998; PETTI *et al.*, 2000). Restritamente, em relação à saúde dental, deve ser enfatizado o potencial antibacteriano de suas enzimas (KOSIKOWSKI, 1970) e anticariogênico de algumas fosfoproteínas (REYNOLDS, 1987), bem como o papel da vitamina D, cálcio e flúor na estrutura do dente (WESTOVER *et al.*, 1989). O leite bovino contém ainda aproximadamente 4% de lactose, que poderia contribuir para o

desenvolvimento de cárie, tornando esse alimento um dos principais responsáveis pela destruição dental (**STEPHAN, 1966; BOWEN *et al.*, 1991**). Alguns autores sugerem que todo o leite possui potencial cariogênico devido à presença de lactose que, quando fermentada produz um pH em torno de 5,0 favorecendo à desmineralização (**ALBEY, 1980; RUGG-GUNN *et al.*, 1985; BIRKHED, 1990**), diferindo de outros autores que consideram o leite bovino não cariogênico (**REYNOLDS & DEL RIO, 1984; BOWEN *et al.*, 1991; CARBONEL *et al.*, 1995; BOWEN *et al.*, 1997; ARAUJO *et al.*, 1998; PETTI *et al.*, 2000**).

O leite bovino é praticamente o único leite disponível em grande quantidade, com abrangência e consumo mundiais, por isso sua relação com a saúde dental tem sido por muitos anos um tópico de bastante interesse. **MICHAL (1969)** examinou cuidadosamente informações de seus pacientes com cárie de mamadeira e concluiu que o leite bovino pode causar cárie dental. **VIANNA (1971)**, num estudo *in vitro*, concluiu que leite sem adição de carboidratos pode produzir cárie dental se estagnado sobre o dente por determinado período. Por outro lado, pesquisas mais recentes contradizem tais informações colocando em evidência as propriedades cariostáticas do leite bovino (**PETTI *et al.*, 2000**).

As fosfoproteínas presentes no leite, em destaque a caseína, são fortemente adsorvidas no esmalte dental *in vitro* e aparentemente apresentam capacidade de prevenir, mais de 20%, a dissolução do esmalte dental bovino *in situ* (**WEISS & BIBBY, 1966; RUSOFF & KONIKOFF, 1975; REYNOLDS *et al.*, 1982; REYNOLDS & WONG, 1983; REYNOLDS, 1987**). Um estudo *in vitro* de

1995, desenvolvido por **VACCA-SMITH & BOWEN**, demonstrou que a caseína do leite reduz a adsorção e a atividade da enzima glucosiltransferase (GTF), produzida pelos estreptococos, sobre a hidroxiapatita revestida por saliva (película salivar). Muitos componentes da dieta como carboidratos, lipídios e proteínas podem ser incorporados à película adquirida e afetar a atividade da glucosiltransferase sobre a superfície do dente. Segundo esse estudo, a kappa-caseína e o leite bovino são exemplos desses componentes, pois foram capazes de reduzir 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), *Streptococcus 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, estando de acordo com os resultados obtidos por **VACCA-SMITH et al., 1994; GUGGENHEIM et al., 1999**, nos quais observaram redução de 73% a 80% na proporção de *S. sobrinus*, obtendo ainda, inibição do desenvolvimento de cárie dental em superfícies lisas e sulcos. 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**).

Quanto às substâncias antibacterianas como a lactoferrina, a lisozima e a peroxidase, estas também podem afetar a microflora bucal. **ARNOLD et al.**, em **1980**, demonstraram que a lactoferrina pode atuar contra várias cepas bucais,

inclusive *S. mutans*, em pH 5 a 6. O efeito antibacteriano desta enzima foi relacionado à seqüestração do ferro e à conseqüente privação nutricional do microrganismo (**BOWEN & TABAK, 1995**). A lisozima, uma proteína catiônica, é bastante conhecida por sua atividade muramidase, clivando a ligação beta-1,4 glicosídica entre o N-acetil ácido murâmico e a N- acetilglicosamina dos peptidoglicanos bacterianos. Outros trabalhos indicam que a lisozima pode apresentar diversos efeitos antimicrobianos não necessariamente ligados à atividade de muramidase. Esses mecanismos antimicrobianos incluem agregação ou aderência bacteriana, rompimento de membrana na presença de ânions e ativação de autolisinas. Em relação à peroxidase, está bem estabelecido que esta catalisa a oxidação do tiocianeto na presença de peróxido de hidrogênio e gera o ânion hipotiocianeto e o ácido hipotiocianoso, produtos tóxicos que inibem o crescimento e metabolismo bacterianos (**BOWEN & PEARSON, 1993**).

O leite bovino apresenta também aproximadamente 3,5% de gordura (**GARDNER *et al.*, 1977**), que atua formando uma membrana protetora na superfície dental e envolve os carboidratos da dieta, facilitando sua remoção da cavidade bucal. Esse efeito dos lipídios reduz a atividade bacteriana e conseqüentemente colabora para que o leite exerça efeito cariostático (**RUSOFF & KONIKOFF, 1975**). **FLYNN**, em 1992, relatou que a maioria dos minerais e elementos essenciais estão presentes tanto no leite bovino como no humano.

Outros autores sugerem que o leite bovino possui um potencial anticariogênico, devido à presença de cálcio, fosfato e a atividade tamponante da

caseína, que possui ação anti-bacteriana contrapondo à cariogenicidade da lactose; portanto, estes fatores podem interferir nos fenômenos da desmineralização e remineralização dental (**JENKINS & FERGUSON, 1966; WEISS & BIBBY, 1966; VIANNA, 1971; DEVER *et al.*, 1987; BOWEN *et al.*, 1991**).

Outros trabalhos demonstraram que o leite bovino previne a queda dos valores do pH bucal (**MOR & McDOUGALL, 1977**) e tem capacidade de remineralizar o esmalte *in vitro* (**McDOUGALL, 1977**).

Em modelo animal, avaliou-se o leite com 2% de gordura e leite com quantidade reduzida de lactose, assim como soluções contendo 10% de sacarose e 4% de lactose. Os animais que receberam 10% de sacarose e 4% de lactose apresentaram uma população de *S. sobrinus* significativamente maior que outros grupos (**BOWEN *et al.*, 1991**). O grupo 4% de lactose apresentou potencial para promover cárie dental quando comparado com o grupo controle água, sendo que o efeito cariogênico do grupo da lactose 4% pode ser resultado da maior concentração de *S. sobrinus* presente neste grupo em relação aos demais grupos testados, estando de acordo com **GUSTAFSON *et al.*, 1955**. Em contraste, **STEINMAN *et al.* em 1958**, não observaram aumento de cárie em animais que receberam 20% de lactose três vezes ao dia. Quanto ao grupo que recebeu leite com quantidade reduzida de lactose apresentou insignificantes níveis de cáries, sendo provável que a lactose foi convertida em glucose e galactose.

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

Dos diferentes tipos de leites consumidos por crianças, destaca-se o leite humano por possuir vantagens nutricionais, imunológicas e psicológicas, além da contribuição no crescimento e desenvolvimento da mandíbula, pois os músculos da cavidade oral na criança são fortemente exercitados durante a sucção (**WESTOVER *et al.*, 1989**).

Os atos de abertura, protusão, sucção e compressão da gengiva para extrair o leite do seio materno exercitam fortemente os músculos e são responsáveis pelo crescimento fisiológico e posicionamento correto da mandíbula. O músculo digástrico do bebê é duas vezes mais forte que o do adulto, além dos movimentos contribuírem para a abertura e drenagem da faringe e tuba auditiva, ajudando reduzir os riscos de infecções auditivas e respiratórias. Muitos bicos de mamadeiras permitem que o líquido flua muito rapidamente, obrigando o bebê a posicionar sua língua para frente para obstruir o fluido de leite enquanto engole. Esse fator, associado ao baixo esforço muscular requerido para retirar o leite, seria responsável pelo mal posicionamento da língua e pelo pequeno desenvolvimento oral (**WESTOVER *et al.*, 1989**).

O leite humano, assim como o bovino, é composto de proteínas, lipídios, carboidratos (7% lactose), vitaminas lipo e hidrossolúveis, minerais como

cálcio, ferro, flúor, iodo e outros. A composição do leite humano muda significativamente durante o período de lactação como um evento fisiológico do organismo da mãe, além disso, diversos trabalhos tentam esclarecer se a qualidade do leite é afetada por fatores externos como contaminantes e malnutrição (**LÖNNERDAL, 1986**). De maneira geral, o leite humano é um sistema nutricional e imunológico com adequados níveis de vitamina D e flúor para a saúde geral e bucal da criança (**WESTOVER et al., 1989**), sendo considerado um alimento não cariogênico (**ARAUJO et al., 1995**).

A proporção de vitamina D contida no leite humano e sua relação com a nutrição materna ainda é controversa. Trabalhos demonstram que, quando comparados às fórmulas infantis, os níveis de vitamina D lipossolúveis tendem a serem baixos no leite humano, enquanto a proporção de 25-hidroxi-vitamina D é relativamente alta (**WESTOVER et al., 1989**). **HOLLIS et al.**, em **1983**, mostraram que o nível dessa vitamina no leite pode ser aumentado com suplementos oferecidos à mãe, apesar da concentração de hidroxi-vitamina D não ser afetada pela suplementação.

Recentemente, o conteúdo de contaminantes do meio ambiente no leite humano e seu efeito na saúde oral têm merecido interesse (**FURST et al., 1992**). **ALALUUSUA et al.**, em **1996a**, demonstraram que há associação entre a exposição de crianças normais à dioxinas, via leite humano, e a de hipomineralização do primeiro molar permanente. Analisaram também a associação entre a duração da amamentação materna e a ocorrência de defeitos

dentais. Os resultados mostraram que os defeitos foram mais extensos em crianças que passaram por prolongado contato com o leite humano. Logo, um prolongado período de amamentação materna pode aumentar o risco de defeitos de mineralização pela interferência de contaminantes, como as dioxinas, no desenvolvimento dental **ALALUUSUA et al., 1996b**.

O leite humano possui uma concentração de lactose (7%) superior aos demais tipos de leites (**GARDNER et al., 1977**). A hidrólise da lactose [O- β -D-galactopiranosil (1 $\rightarrow$ 4)- β -D-glucapiranosose], dissacarídeo redutor que possui um carbono anomérico livre no resíduo de glucose, produz a D-galactose e a D-glucose e libera 3,3 kJ/mol de energia. A sacarose, em contraste com a maioria dos dissacarídeos, não age como açúcar redutor e não possui átomos de carbono anoméricos livres, pois, os átomos das duas hexoses estão ligados entre si (**LEHENINGER, 1976**). A sacarose é mais facilmente hidrolizada que os demais dissacarídeos, liberando cerca de 6 kJ/mol de energia, que proporciona a produção, pelos microrganismos cariogênicos, de polissacarídeos extracelulares de reserva (frutano, glucano) e uma matriz polissacarídea insolúvel (mutano). A enzima extracelular responsável pela síntese transfere unidades de glicose ou frutose para o polímero em crescimento utilizando a alta energia encontrada na ligação glicosídica entre carbonos anoméricos da glicose e frutose no dissacarídeo sacarose. Estes polissacarídeos extracelulares favorecem a colonização de *S. mutans* e a adesividade da placa e permitem que ela se agregue aos dentes em maior quantidade que os demais açúcares (**NEWBRUN, 1982**).

MATEE *et al.*, em **1992**, investigaram a prevalência de estreptococos do grupo mutans e de lactobacilos em crianças com presença e ausência de cáries rampantes, e que se alimentavam de leite humano. A contagem de microrganismos foi mais acentuada na placa e saliva das crianças portadoras de cáries rampantes, com prevalência de lactobacilos. Crianças livres de cáries também tiveram alta prevalência dessas bactérias, demonstrando que, na população estudada, os resultados microbiológicos explicam parcialmente a presença de cáries. A amamentação materna permite a colonização e proliferação de estreptococos do grupo mutans e de lactobacilos nos dentes e a cárie rampante pode ocorrer nesse período mesmo em crianças que não utilizam mamadeiras ou outra forma abusiva de alimentação.

ERONAT & EDEN, em **1992**, indicaram que o bico do seio descansa entre o palato duro e mole e que após a sucção, o leite é depositado na região posterior da língua e da orofaringe, estimulando o reflexo de deglutição. Através da mamadeira, muitas vezes, o infante não extrai leite suficiente para que esse reflexo seja estimulado. Os volumes de leites obtidos da mãe e da mamadeira são semelhantes, mas o seio ocupa maior volume na boca em comparação ao bico artificial da mamadeira. Assim, a amamentação pela mamadeira permite que o leite acumule em torno do dente até que o reflexo da deglutição seja estimulado por um período de tempo maior que no aleitamento materno.

Várias campanhas têm sido desenvolvidas com objetivos de motivar e orientar a população sobre a importância da amamentação materna (**WESTOVER et al., 1989**).

Apesar das vantagens que a amamentação oferece, muitas vezes o leite humano é substituído por leites elaborados em fórmulas infantis. **BOWEN et al.** em **1997**, demonstraram que estas fórmulas infantis apresentam potencial cariogênico, sustentando a infecção por *S. sobrinus*. Ainda, as fórmulas que contêm sacarose são mais cariogênicas quando comparadas com as de lactose.

As fórmulas infantis são uma complexa combinação sintética de nutrientes, incluindo carboidratos fermentáveis como lactose, sacarose e polímeros de glicose. Porém, informações sobre o potencial cariogênico do leite formulado são surpreendentemente esparsas (**BOWEN et al., 1997**).

Polímeros de glicose estão sendo acrescentados em fórmulas infantis como suplemento energético, mas informações sobre o efeito desses componentes na saúde dental são praticamente inexistentes (**MOYNIHAN et al., 1996**). Um estudo recente investigou se os polímeros de glicose a 10% em água, leite bovino e colágeno são acidogênicos e se têm capacidade de reduzir o pH da placa dental para níveis associados à desmineralização do esmalte. Os resultados mostraram que os polímeros de glicose podem reduzir o pH da placa e, portanto, podem estar associados a um aumento da cariogenicidade dos leites formulados, embora sejam menos cariogênicos que a sacarose (**MOYNIHAN et al., 1996**).

SHEIKH & ERICKSON (1996) avaliaram a redução do pH da placa dental com o uso de oito fórmulas infantis e concluíram que todas apresentavam capacidade significativa de redução do pH, sugerindo, portanto, que os leites formulados são acidogênicos e podem ter grande atuação no desenvolvimento da cárie de mamadeira, sendo o valor crítico do pH de 5,7. Esse trabalho está de acordo com **ERICKSON *et al.*, 1998**, que testaram 26 fórmulas infantis, analisando o pH da placa dental, a cultura de *S. sobrinus* e o índice de cárie, em humanos, obtendo resultados clínicos e radiográficos em 18 semanas. Concluíram que a maioria dos leites formulados reduziu o pH significativamente e alguns propiciaram grande crescimento bacteriano. Quanto ao índice de cárie, observaram lesão em dentina em aproximadamente 3 a 4 semanas após o uso do leite formulado, enquanto que envolvimento pulpar se desenvolveu em 7 semanas.

Estas fórmulas infantis são reconstituídas a leite, geralmente utilizando água de abastecimento público. Esta água, uma vez fluoretada, é considerada um método efetivo, seguro, econômico e disponível para grandes populações na prevenção da cárie dental (**DIRKS *et al.*, 1978; MURRAY *et al.*, 1991; O'MULLANE, 1994**), pois o flúor apresenta efeito anticariogênico significativo (**BOWEN, 1973**), sendo que o índice de redução de cárie pelo flúor presente na água consumida pelos humanos varia de 10% a 60% (**O'MULLANE, 1990; HARGREAVES, 1992**).

A adição de pequenas quantidades de flúor não afeta propriedades de aparência, textura e sabor do leite (**FRANK & CHRISTEN, 1985**) e sua

concentração em fórmulas infantis é determinada, comparando a viabilidade deste elemento na água usada em sua preparação (**LATIFAH & RAZAK, 1989; DAMANTE *et al.*, 2000**), além de apresentar o mesmo custo dos leites não fluoretados oferecidos às escolas (**BORROW DENTAL MILK FOUNDATION, 1997**).

Muitos estudos têm surgido nas últimas décadas para avaliar a biodisponibilidade do flúor no leite (**ERICSSON, 1958; EKSTRAND & EHRNEDO, 1979; DUFF, 1981; SPAK *et al.*, 1982; EKSTRAND *et al.*, 1984**).

Uma diminuição significativa da biodisponibilidade do flúor ocorre com o uso de comprimidos (NaF) quando administrados com leite ou outro produto derivado (**EKSTRAND & EHRNEBO, 1979**), assim como, quando estes são adicionados ao leite e fórmulas infantis preparadas com água fluoretada (**SPAK *et al.*, 1982**).

Como explicação para diminuição da biodisponibilidade do flúor, é proposto interações entre o flúor iônico e componentes do leite, formando complexos não solúveis, ou o alto valor do pH gástrico associado com a ingestão de leite, que diminui a proporção relativa da permeabilidade do ácido fluorídrico (HF). A concentração de flúor na sua forma iônica é reduzida no leite por se ligar ao cálcio e outras proteínas, o que pode afetar a atuação efetiva do flúor contra a cárie dentária (**DIRKS *et al.*, 1974; REYNOLDS & STOREY, 1979; DUFF, 1981**).

Por outro lado, estudos clínicos e laboratoriais mostram que o leite fluoretado aumenta a resistência do dente contra a cárie, principalmente durante o seu desenvolvimento (**LIGHTS *et al.*, 1958; POULSEN *et al.*, 1976**) e após erupção (**WIRZ, 1964; ZIEGLER, 1964; POULSEN *et al.*, 1976; REYNOLDS & STOREY, 1979; REYNOLDS & JOHNSON, 1981; STEPHEN *et al.*, 1984; BÁNÓCZY *et al.*, 1985**).

Outros trabalhos (**ERICSSON, 1958; POULSEN *et al.*, 1976; EKSTRAND *et al.*, 1984**) confirmaram a validade do leite fluoretado e seu envolvimento não apenas no esmalte dentário em desenvolvimento, como também nos dentes já erupcionados, pois o flúor age de forma dinâmica (**CURY, 1990**). Acredita-se que a interação do flúor com os componentes do leite, formando complexos, ocorre rapidamente e de forma irreversível (**CURY, 1990**).

O menor índice de cárie encontrado com o uso do leite fluoretado, quando comparado ao da água fluoretada, em experimentos animais, pode ser explicado pela proteção adicional que o leite oferece (**JENKINS & FERGUSON, 1966; MOR & McDOUGALL, 1977; HARPER *et al.*, 1987**). A proteção oferecida na superfície do esmalte evita a produção de ácido na placa dental, retardando assim a dissolução do esmalte e ocorrendo também a remineralização parcial do esmalte dissolvido através do efeito antiplaca propiciado pelo leite (**JENKINS & FERGUSON, 1966; McDOUGALL, 1977; REYNOLDS & JOHNSON, 1981; RAO, 1984**). Estudos clínicos conduzidos por **PETERSSON *et al.* (2000)** concluíram que 5 ppm F, utilizando leite ou água como veículo, resultavam em semelhantes

concentrações na saliva (15 minutos após sua ingestão) e na placa dental (2 horas após sua ingestão).

GYURKOVICS *et al.* (1992), relataram que o leite fluoretado (0,4 mg - 0,75 mg F/200 mL leite/dia) administrado às crianças, reduziu em 10% o índice de cárie dental em relação ao grupo controle, estando de acordo com **BÁNÓCZY *et al.*, 1983, 1985; STEPHEN *et al.*, 1984; VILLA *et al.*, 1989, 1990**. Neste sentido, **O'MULLANE (1994)** demonstrou que a fluoretação do leite em países como Escócia, Hungria e Bulgária foi efetiva na diminuição da cárie dental (**PAKHOMOV *et al.*, 1993**). Estudos conduzidos pela **BORROW DENTAL MILK FOUNDATION (1997)** e Organização Mundial da Saúde, com grupos de crianças, mostraram que a fluoretação do leite (2,65 ppm F) teve resultado satisfatório na redução da cárie em países como: Bulgária (5 anos de suplementação, em determinadas localizações houve redução de 40% a 53%, outros de 89% a 79%), Chile, China, Federação da Rússia, Inglaterra (0,5 mg F/ dia – 200 dias/ano), assim como, em Glasgow (**STEPHEN *et al.*, 1984**) e em Budapeste (**BÁNÓCZY *et al.*, 1985**).

Segundo **DAVIS (1975)**, o leite fluoretado estaria sendo utilizado já em alguns países como forma de prevenir a cárie, como em Saint Poulsen na Áustria, em Kiel na Alemanha Ocidental, em Inamura no Japão e em Winterthur na Suíça, Peru, Bangkok (Tailândia) e África do Sul (**PAKHOMOV, 2000**).

Estudos conduzidos em Codegua (Chile), utilizando leite fluoretado por 4 anos, em crianças que receberam 0,25 mg F (0 a 2 anos de idade), 0,5 mg F (2

a 3 anos), 0,75 mg F (3 a 6 anos) apresentaram redução de 41% a 78% na incidência de cárie, sendo que a proporção de crianças livres de cárie dental após este período foi de 55% a 130% (**MARIÑO *et al.*, 2000**).

Porém, **LARSEN *et al.* (1988)** sugeriram que a fluorose dental ocorrida na infância está relacionada com a alta concentração de flúor usada na diluição do leite em pó (**LATIFAH & RAZAK, 1989; SILVA & REYNOLDS, 1996**). **SILVA & REYNOLDS (1996)** demonstraram ainda, que fórmulas infantis australianas preparadas com água não fluoretada não causam risco de fluorose dental, no entanto, se preparadas com água de abastecimento contendo este íon em concentração adequada (0,7 a 1,0 ppm F), podem resultar em fluorose, devido ao seu excesso durante o desenvolvimento do esmalte dentário. Estando de acordo com os resultados de **DAMANTE *et al.* (2000)**, que avaliaram a concentração final de flúor presente após a preparação de nove fórmulas infantis brasileiras, utilizando água de abastecimento público fluoretada (0,99 ppm F) e água mineral (0,02 a 0,14 ppm F), ressaltando os cuidados quanto à possível ocorrência de fluorose dental.

LATIFAH & DUGUID, em **1986**, analisaram o nível de flúor presente no leite humano e concluíram que quando coletado de áreas fluoretadas, contém significativamente maior quantidade de íon flúor (0,065 ppm), do que leite humano de mães pertencentes a uma área não fluoretada (0,035 ppm).

Os aspectos polêmicos da fluoretação da água e programas de leites fluoretados também têm sido revistos por **LIGHTS *et al.*, 1958**; **SILVA & REYNOLDS, 1996**, que considerando a situação sócioeconômica dos países em desenvolvimento, sugerem que a fluoretação do leite é uma alternativa viável e econômica. Entretanto, as desvantagens relativas às preferências alimentares, influenciando na quantidade de alimento ingerido e a dificuldade no ajuste dos níveis ótimos do flúor no alimento são inconvenientes ponderáveis.

Há evidência que para combater o problema da cárie dental apenas o tratamento curativo não é suficiente, mas a adoção de medidas preventivas é a única maneira de diminuir a prevalência da enfermidade e com ela a magnitude do problema. Desta maneira é importante analisar o melhor aproveitamento dos métodos atuais, sendo também necessário aplicar medidas de prevenção em grande escala (**DEMERS *et al.*, 1990**).

3. PROPOSIÇÃO

3. PROPOSIÇÃO

O presente trabalho tem como objetivos avaliar em animais dessalivados:

5.1 O potencial cariogênico dos leites: bovino (Tipo A), humano e em fórmulas infantis de consumo mais comum no Brasil,

5.2 O potencial cariogênico do leite em fórmula infantil, considerado como o mais cariogênico, suplementado com flúor.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4. Material e Métodos

Foram realizados dois experimentos, utilizando modelo de cárie em animal sujeito a um alto desafio cariogênico, com ratas Wistar, spf (*specific pathogen free*), infectadas com *S. sobrinus* e dessalivadas, onde testou-se a cariogenicidade dos leites bovino, humano e leites em fórmulas infantis.

4.1 Experimento I

Este experimento foi delineado para avaliar o potencial cariogênico dos leites: bovino (Tipo A) e de três leites elaborados em fórmulas infantis, administrados a ratas dessalivadas e infectadas com *S. sobrinus*, por 21 dias experimentais.

4.1.1 Aquisição dos Animais:

Foram utilizadas 60 ratas Wistar spf, com 19 dias de idade, agrupadas por ninhadas provenientes do Biotério Central da UNICAMP (CEMIB). 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 cotonetes esterilizados (FIGURA 1), 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 deste grupo de microrganismo, portanto estavam aptos ao experimento.



FIGURA 1 - Obtenção de esfregaço bucal, na recepção dos animais.

As ratas foram infectadas oralmente em três dias sucessivos com cultura em fase exponencial de crescimento de *S. sobrinus* 6715, 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*), segundo descrito por **SCHILLING & BOWEN (1988)**. A fase exponencial da curva de crescimento do *S. sobrinus* foi estabelecida através de um espectrofotômetro (Spectronic 20, Bausch & Lomb), com $\lambda = 700$ nm. As infecções individuais foram realizadas, utilizando cotonete esterilizado embebido em meio de cultura, seguido de esfregaço nas superfícies dentárias de cada animal. Os animais receberam dieta 2000 com 56% de sacarose (Anexo 1)

(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*.

Aos 23 dias de idade, as ratas foram submetidas a esfregaços nas superfícies dos dentes 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.).

4.1.2 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. 2) e remoção das glândulas sublinguais e submandibulares, após dissecação através de incisão mediana (FIG. 3) (BOWEN *et al.*, 1988b). Neste procedimento, os animais foram anestesiados com hidrato de cloral, via intraperitoneal, na dose de 400 mg/Kg. Todas as incisões foram fechadas com cliques cirúrgicos (Autoclip, Becton & Dickinson), que foram removidos três dias após a dessalivação. A cirurgia procedeu-se normalmente, sem intercorrências e todos os animais recuperaram-se bem.

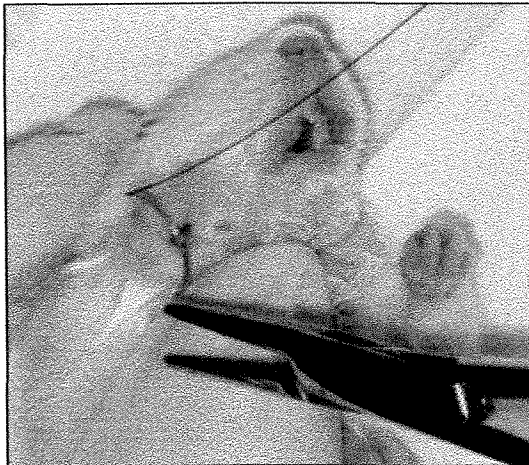


FIGURA 2 – Ligação do ducto da glândula parótida.



FIGURA 3 – Remoção das glândulas sublinguais e submandibulares.

Aos 26 dias de idade, os animais foram aleatoriamente colocados em gaiolas suspensas individuais, sendo divididos em 6 grupos experimentais para tratamento, a saber:

Grupo 1: Solução de água destilada, deionizada e esterilizada contendo 5% de sacarose *ad libitum* (controle positivo) e dieta essencial NCP#2 (Anexo 2), via entubação gástrica (gavage), duas vezes ao dia (3 mL às 9h e 2 mL às 14h), para suprir as necessidades nutricionais (**BOWEN *et al.*, 1997**);

Grupo 2: Leite bovino (Leite da Granja[®] – Tipo A), *ad libitum*;

Grupo 3: Leite elaborado em fórmula infantil Nan 2[®] (Nestlé Ind. e Com. Ltda.), reconstituído com água destilada, deionizada e esterilizada, *ad libitum*;

Grupo 4: Leite elaborado em fórmula infantil Nestogeno 2[®] (Nestlé Ind. e Com. Ltda.), reconstituído com água destilada, deionizada e esterilizada, *ad libitum*;

Grupo 5: Leite elaborado em fórmula infantil Ninho[®] coadjuvante de crescimento (Nestlé Ind. e Com. Ltda.), reconstituído com água destilada, deionizada e esterilizada, *ad libitum*;

Grupo 6: Água destilada, deionizada e esterilizada *ad libitum* (controle negativo) e dieta essencial NCP#2, via entubação gástrica (gavage), duas vezes ao dia (3 mL às 9h e 2 mL às 14h), para suprir as necessidades nutricionais (BOWEN *et al.*, 1997).

A nutrição essencial NCP#2 foi fornecida através de entubação gástrica (FIG. 4), usando uma agulha de alimentação 20G 1x1,5, administrada duas vezes ao dia em quantidades de 3 e 2 mL, às 9h e às 14h respectivamente, de segunda a sexta-feira, e 3 mL, aos sábados e domingos. O experimento foi conduzido de forma cega e o período experimental durou 21 dias. O consumo diário de líquidos foi registrado e ao final de cada semana os animais foram pesados (FIG. 5). Após este período, os animais foram sacrificados através de asfixia por CO₂ e decapitados.



FIGURA 4 - Entubação gástrica para administração de dieta líquida NCP#2, duas vezes ao dia (às 9 h e às 14 h).

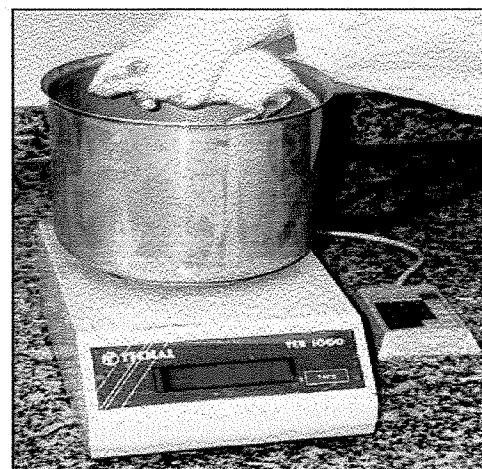
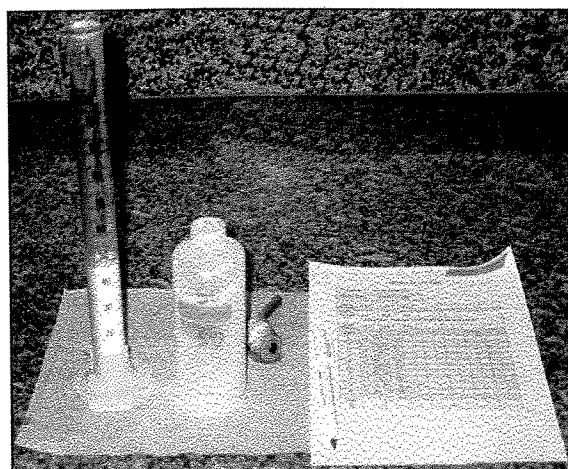


FIGURA 5 - Registro do consumo diário de líquidos e pesagem semanal dos animais.

4.2 Experimento II²

Este experimento foi delineado para avaliar o potencial cariogênico dos leites: humano e elaborado em fórmula infantil, escolhido como o mais cariogênico, no primeiro experimento, e reconstituído ou não com água fluoretada. À semelhança do experimento I, foi utilizado o modelo de cárie dental em ratas dessalivadas, infectadas com *S. sobrinus* e avaliado durante 21 dias experimentais.

4.2.1 Aquisição dos Animais:

Foram utilizadas 50 ratas Wistar spf, com 19 dias de idade, agrupadas por ninhadas provenientes do Biotério Central da UNICAMP (CEMIB). Todos os procedimentos foram realizados identicamente ao experimento I.

4.2.2 Procedimentos Cirúrgicos:

Aos 25 dias de idade, os animais foram dessalivados cirurgicamente, onde procedeu-se semelhantemente ao experimento I. A cirurgia ocorreu normalmente e todos os animais recuperaram-se bem.

Aos 26 dias de idade, os animais foram aleatoriamente colocados em gaiolas suspensas individuais, sendo divididos em 5 grupos experimentais para tratamento, a saber:

² Realizado após a avaliação dos resultados do Experimento I.

Grupo 1: Solução de água destilada, deionizada e esterilizada contendo 5% de sacarose *ad libitum* (controle positivo) e dieta essencial NCP#2, via entubação gástrica (gavage), duas vezes ao dia (3 mL às 9h e 2 mL às 14h), para suprir as necessidades nutricionais (**BOWEN et al., 1997**);

Grupo 2: Leite humano³, *ad libitum*;

Grupo 3: Leite elaborado em fórmula infantil Ninho[®] coadjuvante de crescimento (Nestlé Ind. e Com. Ltda.), reconstituído com água destilada, deionizada e esterilizada, *ad libitum*;

Grupo 4: Leite elaborado em fórmula infantil Ninho[®] coadjuvante de crescimento (Nestlé Ind. e Com. Ltda.), reconstituído com água destilada, deionizada e esterilizada, contendo 10 ppm de flúor⁴ (NaF), após a reconstituição e fornecido *ad libitum*;

Grupo 5: Água destilada, deionizada e esterilizada *ad libitum* (controle negativo) e dieta essencial NCP#2, via entubação gástrica (gavage), duas vezes ao dia (3 mL às 9h e 2 mL às 14h), para suprir as necessidades nutricionais (**BOWEN et al., 1997**).

³ Leite humano foi fornecido pelo Banco de Leite Materno do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP.

⁴ A biodisponibilidade de 10 ppm F para ratos corresponde a 1,0 ppm F para humanos (**TAVES & GUY, 1979**) e esta concentração é superior ao limite de solubilidade do fluoreto de cálcio, assim todo flúor está solúvel.

COPPI, L. C. Avaliação da cariogenicidade de diferentes tipos de leites e efeitos da suplementação com flúor.

A nutrição essencial NCP#2 foi fornecida semelhantemente ao Experimento I. O consumo diário de líquidos foi registrado e ao final de cada semana os animais foram pesados. O experimento foi conduzido de forma cega e o período experimental durou 21 dias. Após este período, os animais foram sacrificados através de asfixia por CO₂ e decapitados.

4.3 Preparo dos Leites

Os leites em fórmulas infantis foram preparados de acordo com as instruções do fabricante. Mamadeiras autoclavadas, contendo 100 mL de leite preparado, foram oferecidas às ratas, a cada 24 horas, durante o período experimental. Com o leite humano, a fim de se evitar a variabilidade dos resultados devido ao conteúdo de lactose no 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 humano foi homogeneizado mecanicamente a cada 2 horas, após o oferecimento aos animais, exceto no período noturno. Toda medida de volume foi realizada com proveta.

4.4 Análise Microbiológica

Imediatamente após o término dos experimentos I e II, a mandíbula esquerda de cada animal foi removida assepticamente (FIG. 6) e suspensa em 5 mL de solução de NaCl a 0,9% esterilizada (FIG. 7) e sonicada com 3 pulsos de

10 segundos, com intervalos de 5 segundos (FIG. 8), 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 e inoculada em duplicata, em ágar sangue contendo 5% de sangue desfibrinado de carneiro (ágar base, Difco Lab.) para determinar a microbiota total (Fig. 9), e em MSS para determinar a população de *S. sobrinus* recuperada, 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, aerobicamente. A contagem de microrganismos foi expressa em u.f.c./mL (unidades formadoras de colônias por mililitro), sendo contados visualmente, utilizando lupa de aumento com luz e estereomicroscópio (BOWEN *et al.*, 1986).

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE



FIGURA 6 – Remoção da hemimandíbula esquerda.

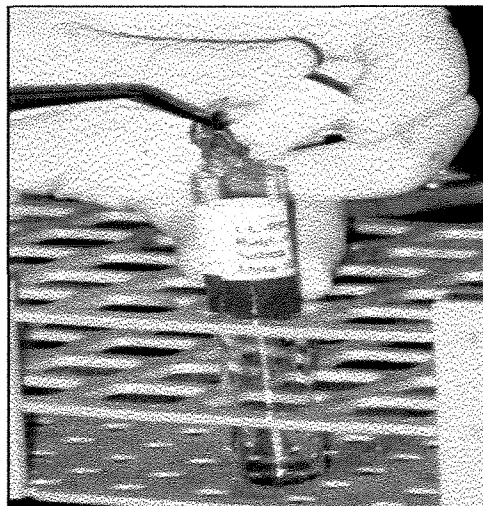


FIGURA 7 – Suspensão da hemimandíbula em NaCl a 0,9%.

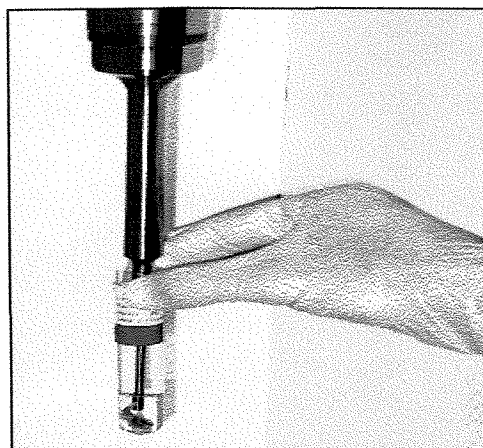


FIGURA 8 – Sonicação das amostras.

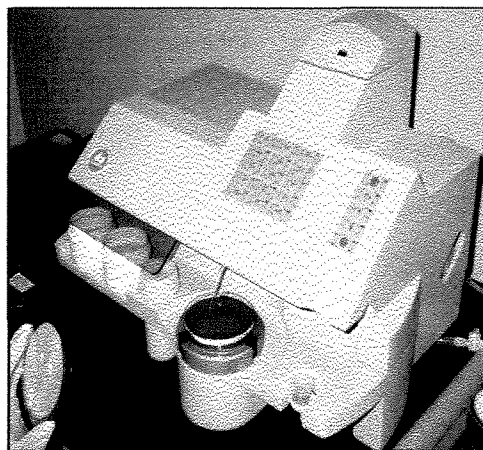


FIGURA 9 – Inoculação da suspensão em meio de cultura, utilizando máquina *Spiral Plater*.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

4.5 Determinação do índice de cárie

As mandíbulas e maxilas foram colocadas em autoclave, 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. 10) (KEYES, 1958; LARSON, 1981).

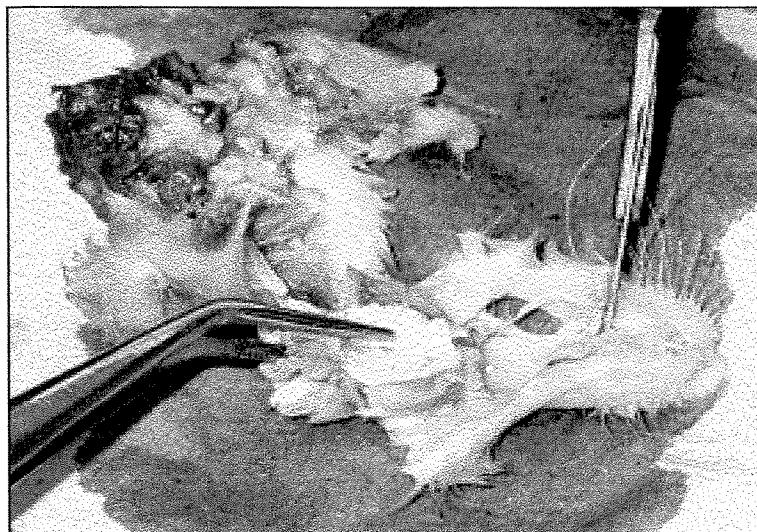


FIGURA 10 - Dissecação das mandíbulas e maxilas.

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

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 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 e registro da profundidade das lesões. 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 amolecida 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. 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 foi 3, 2 e 1, respectivamente; e no 1º, 2º e 3º molares maxilares foi 2, 1 e 1 respectivamente.

4.6 Análise Estatística

Inicialmente foi realizada análise exploratória, observando-se que os dados não apresentavam distribuição normal ou homocedasticidade (Shapiro-Wilk), além de 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.

4.7 Determinação de Açúcares Presentes nos Leites⁵

Foi realizado 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**.

4.8 Determinação da Quantidade de Flúor Iônico Presente nos Leites⁶

As amostras dos leites foram centrifugadas e a concentração de íon flúor no sobrenadante foi determinada utilizando eletrodo específico de íon flúor da Orion (modelo 96-09) e um analisador iônico digital da Orion (modelo EA-940) (Orion Research Inc, Boston, MA 02129). Para análise do íon flúor foram colocados os mesmos volumes das amostras e de TISAB (tampão de acetato 1,0

⁵ A determinação de açúcares nos leites estudados foi realizada no laboratório de referência para América Latina da Nestlé Ind. e Com. Ltda., São Paulo, SP.

⁶ A determinação da quantidade de flúor presente nos leites foi realizada no Laboratório de Bioquímica Oral da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP.

M, pH 5,0, contendo NaCl 1,0 M e 1,2-ciclohexanediáminetetraacético 0,4%) **(CARVALHO & CURY, 1999)**. Este método foi utilizado para a determinação de flúor iônico presente nas soluções utilizadas no experimento, como: soluções controles (solução com 5% de sacarose e ADE); nos leites: bovino, humano, leites em fórmulas infantis suplementados ou não com 10 ppm F, em sua concentração final.

4.9 Determinação do Índice de Cariogenicidade Relativa dos Leites

Este 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 são calculados baseando-se nos trabalhos de **BOWEN et al., 1980, 1997**.

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 pelo total de cárie de sulco e o total de cárie de superfície lisa do grupo ADE (controle negativo). Este resultado é dividido pelo resultado obtido da soma do total de cárie de sulco e total de cárie de superfície lisa do grupo 5% de sacarose (controle positivo), subtraindo a soma do total de cárie de sulco e de superfície lisa do grupo ADE. Devem ser considerados os grupos controles positivo e negativo de cada experimento, com o leite pertencente ao experimento em análise. Este cálculo está expresso na fórmula apresentada, a seguir:

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

Legenda

CR = cariogenicidade relativa

Leite = leite a ser calculada a CR

T lisa = total de cárie de superfície lisa

T sulco = total de cárie de sulco

ADE = água destilada, deionizada e esterilizada

Sac = grupo 5% de sacarose

4.10 Aprovação pela Comissão de Ética na Experimentação Animal

(CEEAA)

Os experimentos descritos neste trabalho foram aprovados pela CEEA /

IB / UNICAMP (Anexo 4).

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 Experimento I

Os animais permaneceram aparentemente saudáveis por todo 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 ganharam mais peso que os grupos controles (TABELA 1 e GRÁFICO 1). A TAB. 2 e GRAF. 2 mostram os menores consumos de líquidos dos grupos 5% de sacarose e ADE, e os maiores consumos dos demais grupos que receberam leite.

TABELA 1 - Média (erro padrão) do ganho de peso (g) das ratas dessalivadas, após 21 dias experimentais. (Experimento I)

GRUPOS						
	5% de Sacarose*	Leite Bovino	Leite Nan2®	Leite Nestogeno2®	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, deionizada e esterilizada

* receberam alimentação essencial via gavagem.

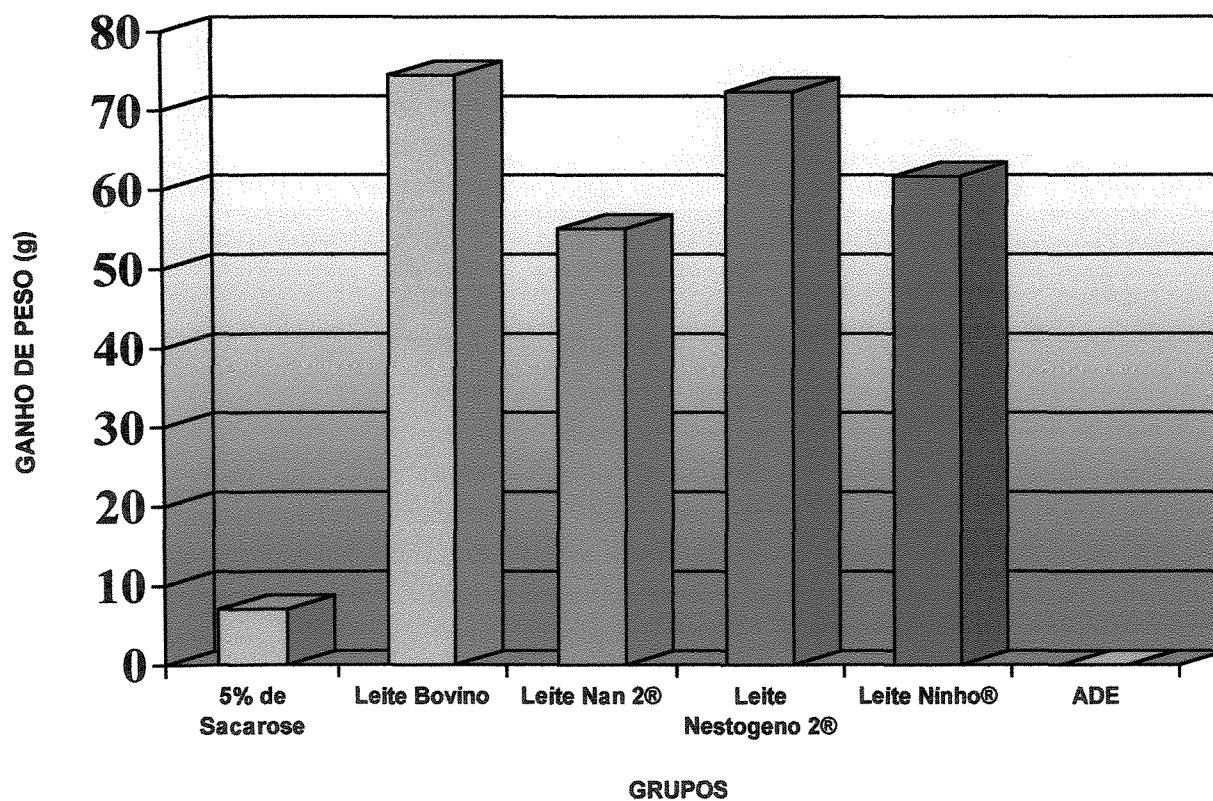


GRÁFICO 1 - Média do ganho de peso (g) das ratas dessalivadas, após 21 dias experimentais. (Experimento I)

TABELA 2 - Média (erro padrão) da quantidade de líquidos (mL) consumidos diariamente pelas ratas. (Experimento I)

	GRUPOS					
	5% de Sacarose*	Leite Bovino	Leite Nan2®	Leite Nestogeno2®	Leite Ninho®	ADE*
Consumo de Líquidos /dia	40,5 (1,9)	76,0 (1,1)	77,7 (3,6)	83,9 (1,0)	84,0 (0,8)	18,5 (1,9)

ADE = água destilada, deionizada e esterilizada

* receberam alimentação essencial via gavagem.

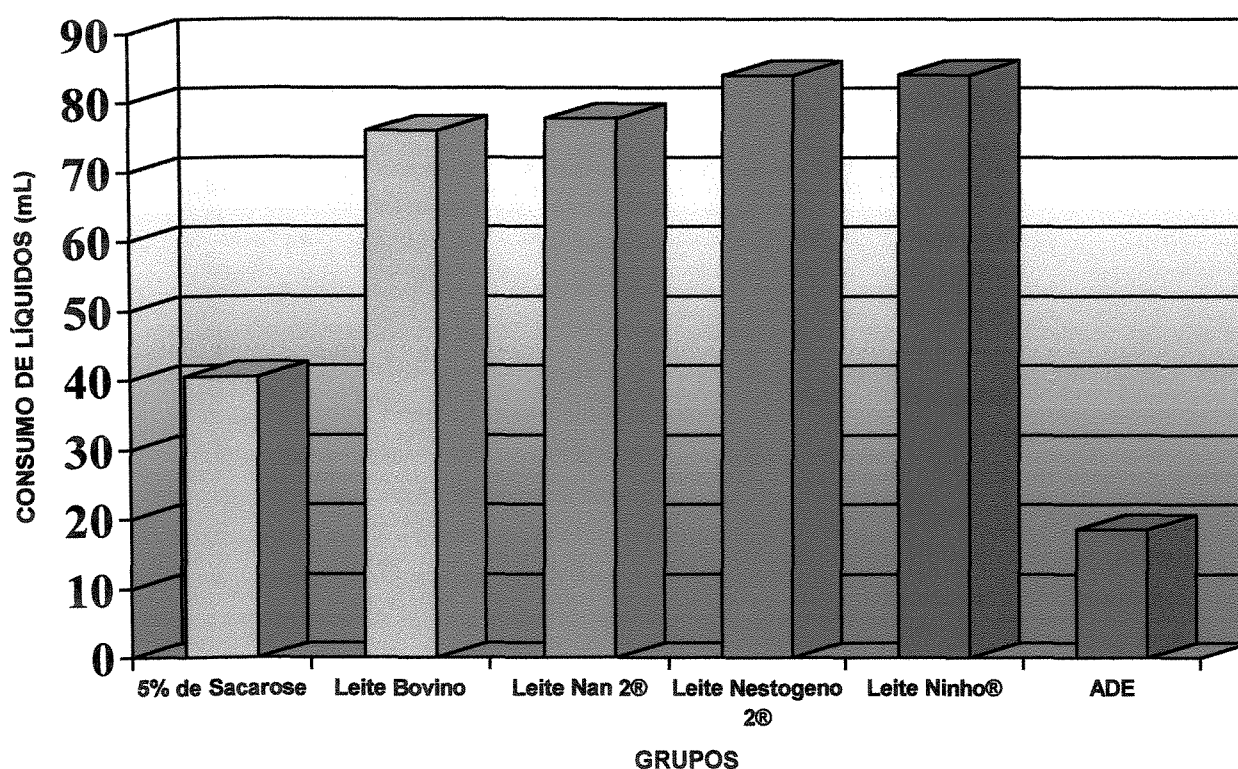


GRÁFICO 2 – Média da quantidade de líquidos (mL) consumidos diariamente pelas ratas. (Experimento I)

Analisando a TAB. 3, observa-se com relação à quantidade total de microrganismos, o grupo do leite Nestogeno 2® apresentou o menor número de microrganismos, que diferiu estatisticamente de todos os outros grupos, exceto do grupo que recebeu leite bovino ($p < 0,05$). A quantidade, bem como a porcentagem de *S. sobrinus* recuperada 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. 3).

TABELA 3 – Média (Posto Médio)* da microbiota total, *S. sobrinus* e porcentagem de *S. sobrinus* recuperada. (Experimento I)

Microbiota	GRUPOS					
	5% de Sacarose	Leite Bovino	Leite Nan2®	Leite Nestogeno2®	Leite Ninho®	ADE
Total (x10 ⁶)	14,4 (40,9) ^a	11,0 (26,6) ^{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 (5,6) ^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 não paramétrica por Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). Valores estatísticos diferentes estão seguidos por letras diferentes na horizontal.

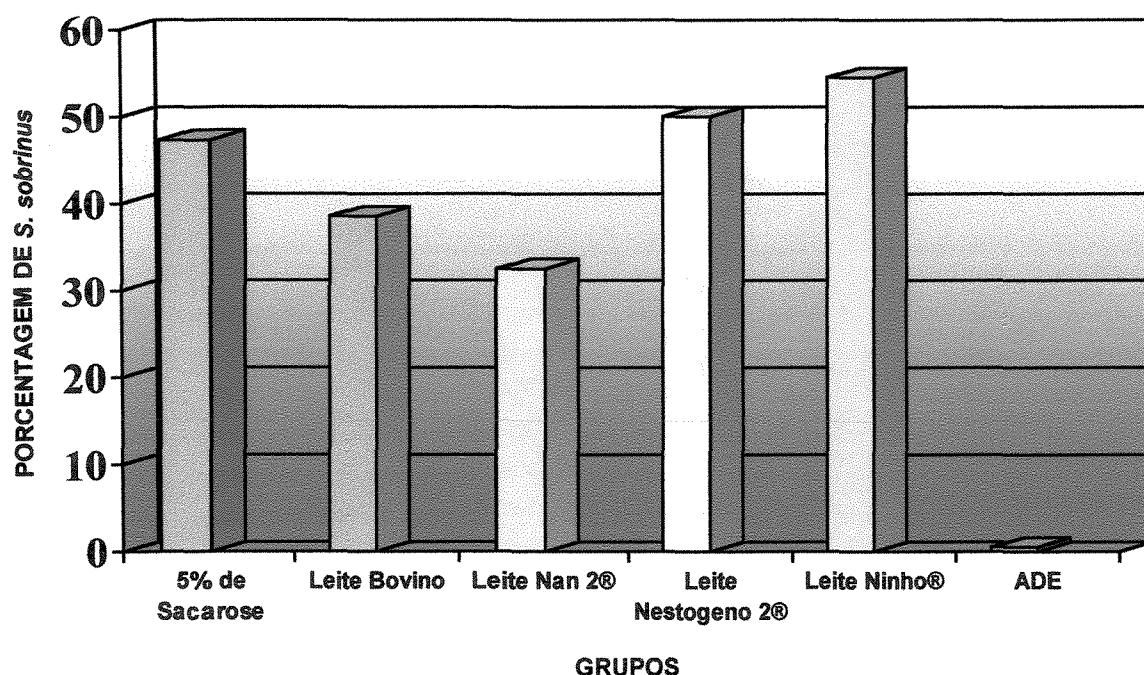


GRÁFICO 03 – Média da porcentagem de *S. sobrinus* recuperada da cavidade bucal de ratas que receberam diferentes tipos de leites. (Experimento I)

Analisando a TAB. 4, 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. 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 4 – Média (Posto Médio) do índice de cárie* do total de superfícies lisas e severidade em ratas dessalivadas. (Experimento I)

Índice de Cárie	GRUPOS					ADE
	5% de Sacarose	Leite Bovino	Leite Nan2®	Leite Nestogeno2®	Leite Ninho®	
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 KEYES (1958) modificado por LARSON (1981).

Análise estatística não paramétrica pelo método 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 do leite Nan 2® e Nestogeno 2®, 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), o grupo Ninho® apresentou alto índice de cárie quando comparado com os demais leites testados, diferindo estatisticamente do grupo ADE. Os grupos

bovino, Nan 2[®] e Nestogeno 2[®] não diferiram significativamente entre si e nem do grupo ADE.

A TAB. 5 mostra 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 2[®] e Nestogeno 2[®] não diferiram do leite bovino, o qual foi o único que não diferiu estatisticamente do grupo ADE.

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

Índice de Cárie	GRUPOS					ADE
	5% de Sacarose	Leite Bovino	Leite Nan2 [®]	Leite Nestogeno2 [®]	Leite Ninho [®]	
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	1,1 (16,9) ^{bd}	2,8 (28,6) ^{bcd}	3,0 (31,7) ^{bc}	3,8 (35,8) ^{ac}	3,1 (15,0) ^d

* Método de **KEYES (1958)** modificado por **LARSON (1981)**.

Análise estatística não paramétrica pelo método 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

Analizando a profundidade da cárie de sulco (Ds), os grupos 5% de sacarose e leite Ninho[®], apresentaram os maiores índices de cáries não diferindo estatisticamente entre si. O leite bovino apresentou o menor índice de cárie, não diferindo estatisticamente do grupo ADE. Os leites formulados Nan 2[®] e Nestogeno 2[®] 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 não diferindo estatisticamente do grupo ADE. Os leites formulados não diferiram entre si estatisticamente, sendo que o grupo Nan 2[®] também não diferiu estatisticamente do grupo ADE.

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

5.2 Experimento II

À semelhança do Experimento I, os animais permaneceram aparentemente saudáveis por todo 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. 6 e GRÁF. 4). Os animais pertencentes aos grupos dos leites em fórmulas infantis ganharam mais peso que os grupos controles. A TAB. 7 e GRAF. 5 mostram os menores consumos de líquidos dos grupos 5% de sacarose, ADE e leite humano, e os maiores consumos dos demais grupos.

TABELA 6 - Média (erro padrão) do ganho de peso (g) das ratas dessalivadas, após 21 dias experimentais. (Experimento II)

	GRUPOS				
	<i>5% de Sacarose*</i>	<i>Leite Humano</i>	<i>Leite Ninho®</i>	<i>Leite Ninho® F</i>	<i>ADE*</i>
<i>Ganho de Peso (g)</i>	12,6 (1,2)	15,1 (2,4)	73,7 (2,1)	75,0 (2,7)	2,6 (1,4)

ADE = água destilada, deionizada e esterilizada

* receberam alimentação essencial via gavagem.

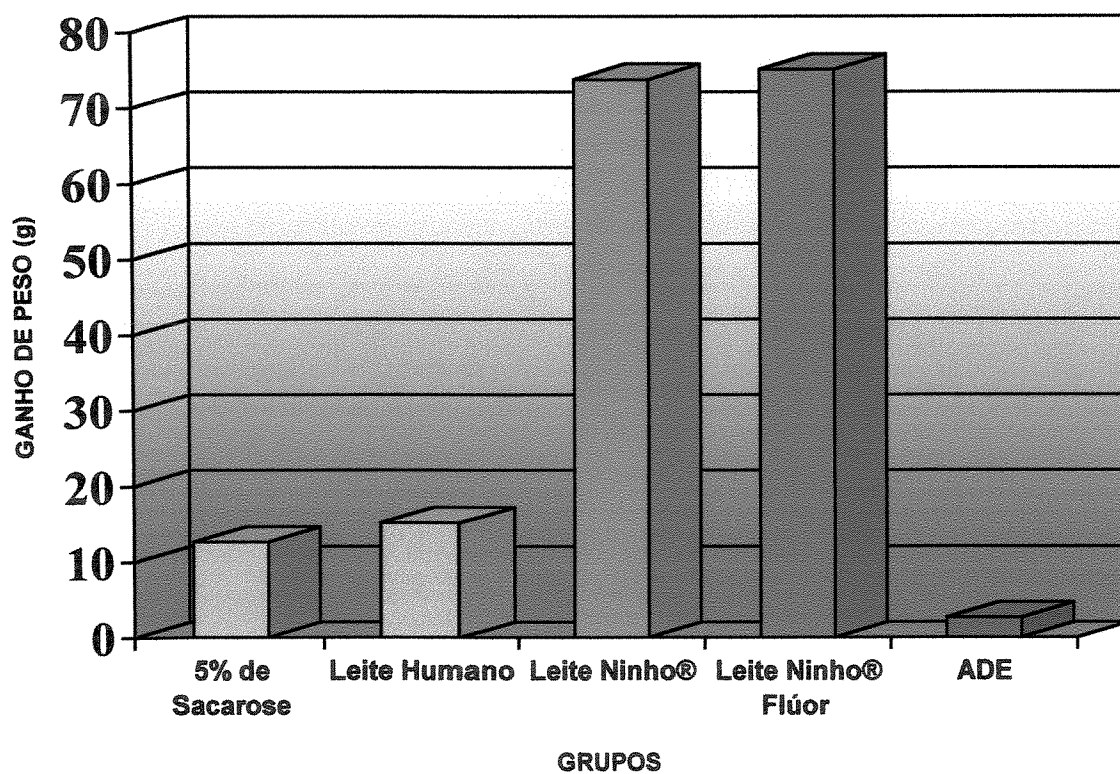


GRÁFICO 4 - Média do ganho de peso (g) das ratas dessalivadas, após 21 dias experimentais. (Experimento II)

TABELA 7 - Média (erro padrão) da quantidade de líquidos (mL) consumidos diariamente pelas ratas. (Experimento II)

	GRUPOS				
	5% de Sacarose*	Leite Humano	Leite Ninho®	Leite Ninho® F	ADE*
Consumo de Líquidos /dia	33,8 (1,4)	23,4 (1,7)	71,6 (1,7)	72,8 (1,6)	14,1 (0,7)

ADE = água destilada, deionizada e esterilizada

* receberam alimentação essencial via gavagem.

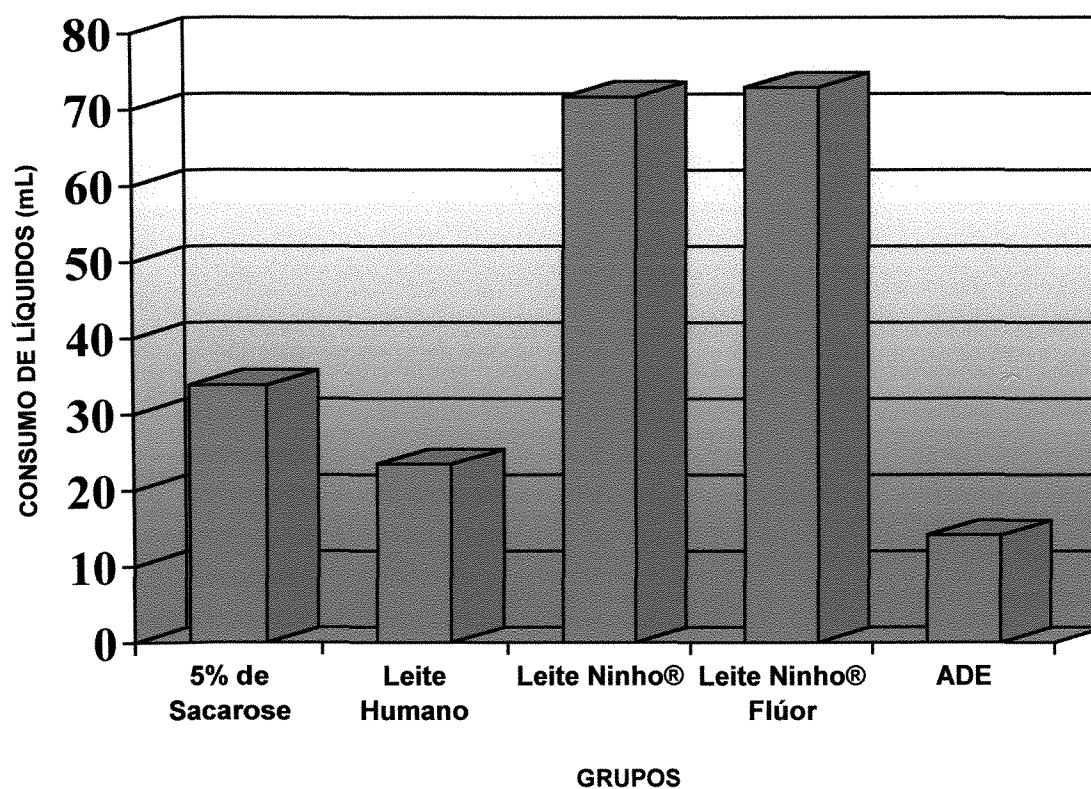


GRÁFICO 5 - Média da quantidade de líquidos (mL) consumidos diariamente pelas ratas. (Experimento II)

Analisando a TAB. 8, observa-se com relação à quantidade total de microrganismos que os grupos dos leites e solução contendo 5% de sacarose não diferiram estatisticamente entre si, porém diferiram estatisticamente do grupo ADE ($p < 0,05$). A quantidade, bem como a porcentagem de *S. sobrinus* recuperada 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. 6).

TABELA 08 – Média (Posto Médio)* da microbiota total, *S. sobrinus* e porcentagem de *S. sobrinus* recuperada. (Experimento II)

Microbiota	GRUPOS				
	5% de Sacarose	Leite Humano	Leite Ninho®	Leite Ninho® F	ADE
Total (x10⁶)	38,0 (25,6) ^a	36,0 (20,0) ^a	28,2 (18,3) ^a	31,2 (20,6) ^a	78,0 (42,1) ^b
<i>S. sobrinus</i> (x10⁶)	7,0 (29,3) ^a	6,5 (28,3) ^a	6,8 (28,9) ^a	8,6 (31,3) ^a	0,05 (5,2) ^b
<i>S. sobrinus</i> (%)	22,3 (27,1) ^a	27,1 (29,3) ^a	26,7 (30,1) ^a	30,1 (31,5) ^a	0,04 (5,0) ^b

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

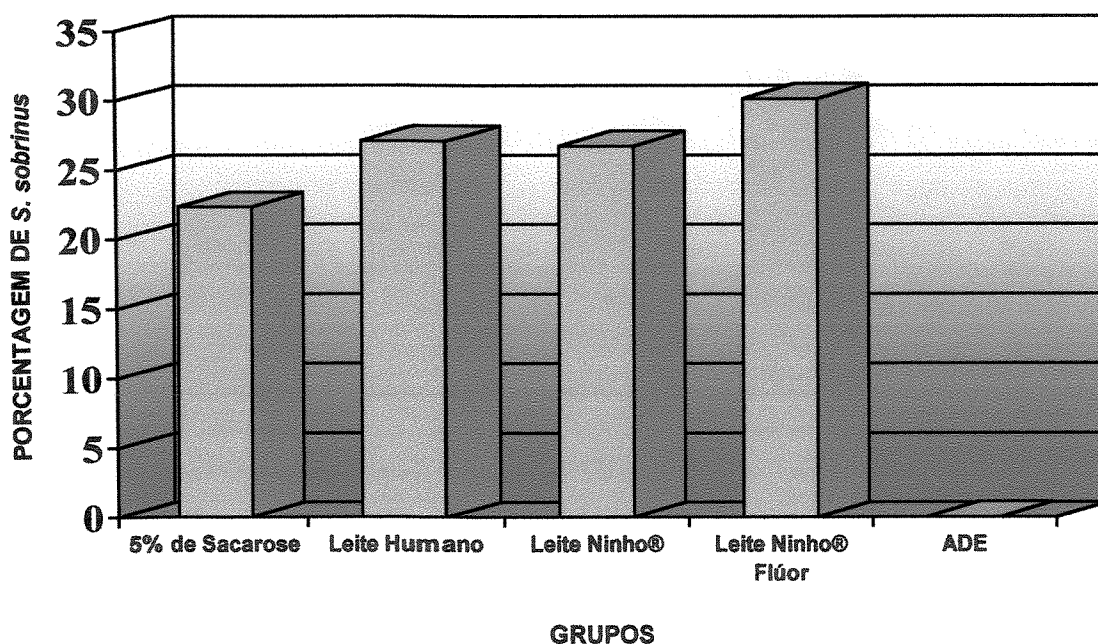


GRÁFICO 6 – Média da porcentagem de *S. sobrinus* recuperada da cavidade bucal de ratas que receberam diferentes tipos de leites. (Experimento II)

Analisando a TAB. 9, podemos observar com relação ao total de cárie de superfície lisa, os animais que receberam solução contendo 5% de sacarose e Ninho® apresentaram os maiores índices de cáries, diferindo estatisticamente dos demais grupos ($p < 0,05$). O leite humano obteve o menor índice de cárie quando comparado com os grupos dos leites em fórmulas infantis, não diferindo estatisticamente dos grupos que receberam ADE e Ninho® suplementado com flúor.

TABELA 9 – Média (Posto Médio) do índice de cárie* do total de superfícies lisas e severidade em ratas dessalivadas. (Experimento II)

Índice de Cárie	GRUPOS				ADE
	5% de Sacarose	Leite Humano	Leite Ninho®	Leite Ninho® F	
Total Sup. Lisa	91,6 (44,8) ^a	18,7 (17,8) ^b	54,1 (35,4) ^a	21,3 (20,2) ^b	7,5 (9,2) ^b
Ds	64,4 (44,1) ^a	9,1 (22,3) ^b	38,3 (36,3) ^a	6,0 (16,1) ^{bc}	1,9 (8,6) ^c
Dm	29,8 (45,2) ^a	0,9 (19,3) ^{bc}	6,7 (31,7) ^b	0,2 (15,7) ^c	0,1 (15,5) ^c

* Método de KEYES (1958) modificado por LARSON (1981).

Análise estatística não paramétrica pelo método 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 leite Ninho® F apresentou um baixo índice de cárie, não diferindo estatisticamente do grupo ADE. O leite humano apresentou um índice intermediário de cárie diferindo estatisticamente da ADE, mas não do leite Ninho® F. O grupo Ninho®, apresentou o índice mais alto dentre os leites avaliados, diferindo estatisticamente do grupo ADE, mas não diferindo do grupo 5% de sacarose. Analisando a severidade da lesão na superfície lisa (Dm), o grupo Ninho® F apresentou o índice de cárie mais baixo quando comparado com os demais leites avaliados, não diferindo estatisticamente do grupo ADE. O leite humano apresentou um índice intermediário de cárie não diferindo estatisticamente da ADE e do grupo Ninho®

com flúor. O grupo Ninho[®], apresentou o índice mais alto dentre os leites avaliados, diferindo estatisticamente do grupo ADE e do Ninho[®] F.

A TAB. 10 mostra índices de cáries de sulco e sua severidade. Os maiores índices de cáries de sulco e severidade foram observados novamente nos animais que receberam solução contendo 5% de sacarose e leite Ninho[®], os quais diferiram estatisticamente do grupo ADE. Quanto ao total de cárie de sulco, os leites humano e Ninho[®] F apresentaram os menores índices de cáries diferindo estatisticamente do grupo ADE. Quanto à severidade da lesão, o leite humano também apresentou o menor índice de cárie quando comparado com os demais leites avaliados, não diferindo estatisticamente do grupo ADE. O leite Ninho[®] F apresentou, por sua vez, índice de cárie intermediário diferindo estatisticamente do grupo ADE. Quanto à severidade (Dm), os leites humano e Ninho[®] F não diferiram estatisticamente da ADE.

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

Índice de Cárie	GRUPOS				ADE
	5% de Sacarose	Leite Humano	Leite Ninho®	Leite Ninho® F	
Total Sulco	71,6 (43,8) ^a	20,3 (18,6) ^b	63,3 (37,2) ^a	26,7 (22,3) ^b	2,3 (5,6) ^c
Ds	36,5 (43,2) ^a	6,9 (18,6) ^{bc}	27,1 (37,7) ^a	8,2 (22,0) ^b	1,0 (6,0) ^c
Dm	19,8 (45,1) ^a	0,5 (14,2) ^b	10,4 (35,9) ^a	1,0 (21,3) ^b	0,0 (11,0) ^b

* Método de KEYES (1958) modificado por LARSON (1981).

Análise estatística não paramétrica pelo método 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

5.3 Determinação de Açúcares Presentes nos Leites

Os leites bovino, humano e em fórmulas infantis foram analisados quanto à presença de açúcares, sendo os resultados expressos na TABELA 11.

TABELA 11 - Açúcares (%) presentes nos leites avaliados em % (p/v).

LEITES	Malto- dextrina (%)	Lactose (%)	Sacarose (%)	Glicose (%)	Frutose (%)
Bovino Tipo A	-	4,9	-	-	-
Humano	-	8,3	-	-	-
Ninho [®]	-	29	9,3	1,5	2,1
Nestogeno 2 [®]	8	29	14	-	-
Nan 2 [®]	13	44	-	-	-

Método usado para determinação de Açúcares - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) baseado no trabalho de **ALPENFELS et al., 1982**.

De acordo com os resultados, observamos que os leites bovino e humano possuem apenas lactose, como açúcar, e em concentrações inferiores aos leites formulados. Entretanto, o leite humano possui 1,7 vezes mais lactose que o bovino.

Os leites em fórmulas infantis, além da lactose, apresentaram outros açúcares em suas formulações, como a malto-dextrina (Nestogeno 2[®] e Nan 2[®]), sacarose (Ninho[®] e Nestogeno 2[®]), glicose (Ninho[®]) e frutose (Ninho[®]). O leite Ninho[®] apresentou uma maior variabilidade de açúcares com relação aos demais.

5.4 Determinação da Quantidade de Flúor Iônico Presente nos Leites

Em seus estados originais os leites bovino, humano e Ninho[®] praticamente não apresentaram flúor em sua composição, entretanto os leites Nan 2[®] e Nestogeno 2[®] apresentaram concentrações de flúor de aproximadamente 0,5 ppm (TAB. 12). O leite Ninho[®] suplementado com 10 ppm F (NaF) em nosso laboratório, demonstrou uma concentração de 10,6 ppm de flúor livre, o qual foi utilizado no experimento II.

TABELA 12 - Flúor iônico (ppm) presente nos leites avaliados.

Leites Utilizados	Quantidade de Flúor Iônico nos Leites (Média) ppm F
Bovino	0,02
Humano	0,00
Nan 2 [®]	0,53
Nestogeno 2 [®]	0,51
Ninho [®]	0,02
Ninho [®] Suplementado com Flúor (10 ppm)	10,6

Método: Flúor iônico utilizando TISAB (1:1), segundo **CARVALHO & CURY, 1999**.

5.5 Determinação do Índice de Cariogenicidade Relativa dos Leites

- Classificação dos Fluidos

A TAB. 13 mostra a cariogenicidade relativa dos leites avaliados (**BOWEN *et al.*, 1980, 1997**), na qual é possível observar os menores índices de cariogenicidade representados pelos leites bovino e humano, assim como, uma cariogenicidade moderada do leite Ninho[®] suplementado com flúor. Os leites em fórmulas infantis Nestogeno 2[®], Nan 2[®] e Ninho[®] apresentaram índices mais significantes quanto ao potencial cariogênico.

TABELA 13 - Índice de cariogenicidade relativa dos leites.

<i>Cariogenicidade Relativa dos Leites</i>				
Líquidos Testados	Total Sup. Lisa	Total Sulco	Total Sup. Lisa + Total Sulco	Cariogenicidade Relativa
Sacarose exp. I	74,0	57,9	131,9	1
Sacarose exp. II	91,6	71,6	163,2	1
Ninho [®] exp. I	30,6	38,3	68,9	0,50
Ninho [®] exp. II	54,1	63,3	117,4	0,70
				} 0.60
Nan 2 [®]	33,8	35,7	69,5	0,50
Nestogeno 2 [®]	30,4	34,1	64,5	0,43
Ninho [®] + F	21,3	26,7	48,0	0,24
Leite Humano	18,7	20,3	39,0	0,19
Leite Bovino	4,0	24,0	28,0	0,12

Cálculos baseados segundo **BOWEN et al., 1980, 1997.**

Total Sup. Lisa: total de cárie de superfície lisa. Total Sulco: total de cárie de sulco

Total Sup. Lisa + Total Sulco: total de cárie de superfície lisa + total de cárie de sulco

6. DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

O modelo de cárie dental em ratas dessalivadas utilizado nos experimentos promove um dos mais severos desafios cariogênicos (**BOWEN et al., 1988b**). Ao mesmo tempo, este método mimetiza o processo que ocorre na cavidade bucal durante o sono, caracterizado pela diminuição do fluxo salivar. Apesar de diferirem em alguns detalhes dos dentes humanos, o modelo animal oferece vantagens por ser capaz de estabelecer o processo de cárie à semelhança do humano. Microrganismos cariogênicos isolados de humanos foram capazes de induzirem cárie dental em ratos, assim como, o flúor, em várias formas, preveniu cárie em roedores (**LARSON et al., 1976**) e açúcares promoveram cárie dental em animais (**BOWEN et al., 1986**).

BOWEN et al., 1988b; MADISON et al., 1989 admitem que animais dessalivados tiveram maior estabelecimento da infecção por *S. sobrinus* que aqueles não dessalivados. Estudos conduzidos em ratas (**BOWEN et al., 1986, 1988a**) e em macacos (**BOWEN, 1973; EDGAR et al., 1981**) mostraram que a redução do fluxo salivar ocasionou aumento da microbiota acidogênica, incluindo a colonização por *S. mutans*, e provocou alta susceptibilidade à cárie dental (**DREIZEN & BROWN, 1976; BOWEN et al., 1978; BOWEN et al., 1986; KITAMURA et al., 1986**).

Enquanto vários métodos têm sido empregados para testar a natureza cariogênica dos alimentos (**MUHLEMANN & IMFELD, 1981; HARPER et al.,**

1986), não há ainda um modelo aceitável para investigar o processo de cárie nas condições em que ocorre a cárie de mamadeira. O modelo de animal dessalivado utilizado neste experimento, pode melhor simular o desenvolvimento de cárie de mamadeira e avaliar o papel dos leites em fórmulas infantis (**BOWEN et al., 1997**).

Entretanto, qualquer afirmativa relacionada à associação de microrganismos com a cárie dentária em humanos, deve basear-se em análises de dados experimentais e epidemiológicos coletados de estudos em humanos (**THYLSTRUP & FEJERSKOV, 1988**).

Neste experimento, utilizando modelo de cárie em animal dessalivado, os animais permaneceram aparentemente saudáveis tendo, em sua maioria, ganho de peso especialmente nos grupos que consumiram leite bovino e em fórmulas infantis *ad libitum*, estando de acordo com **BOWEN et al., 1997**. Entretanto, os grupos controles apresentaram menor ou nenhum ganho de peso, em ambos experimentos, sendo talvez explicado pelo consumo limitado de alimentação essencial via gavagem, ou seja, 5 mL ao dia, quando comparado aos demais grupos que receberam leite de forma *ad libitum*. Este modelo também comprovou sua eficácia quanto à produção de cárie dental nos animais, apresentando resultados distintos e estatisticamente diferentes quanto aos grupos caracterizados como controle positivo e negativo, bem como os grupos dos leites em testes (**BOWEN et al., 1997**).

Ao comparar o consumo dos líquidos ingeridos, deve-se ressaltar que diferentes quantidades puderam ser adquiridas nos grupos experimentais, uma vez que a frequência e a ingestão de líquidos foram *ad libitum* e não se estabeleceu controle sobre estes parâmetros. Entretanto, **BOWEN *et al.* (1990a)** explicam que para experimentos com este tipo de delineamento, se houver consumo da quantidade de líquidos testados igual ou superior quando comparados ao grupo sacarose (controle positivo), as comparações são consideradas válidas; por outro lado, se mais solução de sacarose é consumida quando comparada aos líquidos testados, faz-se necessária a utilização de alimentação programada para atingir dados significativos. No presente experimento, que teve o consumo de líquidos medido diariamente, somente o grupo do leite humano apresentou menor consumo que o grupo da sacarose, ao contrário de outros relatos em que o consumo de leite foi significativamente maior do que qualquer outra solução (**BOWEN *et al.*, 1991; BOWEN & PEARSON, 1993**) devendo, porém, registrar que estes autores não avaliaram o leite humano. Neste experimento, observou-se que as ratas não consumiram o leite humano da mesma forma que a solução de sacarose e os demais leites, provavelmente devido 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, além do que, a ingestão do leite humano pode ter satisfeito mais os animais desse grupo de forma a não consumir demasiadamente este líquido, determinando um padrão de ingestão inferior aos demais grupos. Esta diferença no consumo do leite humano,

no entanto, não põe em dúvida os presentes resultados, pois existe pouca relação entre a quantidade de líquido consumido e a capacidade de indução de cárie, sendo importante considerar a freqüência de ingestão dos alimentos avaliados (**BOWEN *et al.*, 1991, BOWEN & PEARSON, 1993**).

Evidências em humanos (**ZINNER & JABLON, 1969**) e em animais (**CORNICK & BOWEN, 1971**) mostram que o *S. sobrinus* necessita da presença de uma superfície sólida para colonizar a cavidade bucal.

Todos os leites utilizados, no presente experimento permitiram a manutenção da infecção por *S. sobrinus*, o que está de acordo com trabalhos anteriores que mostraram que a sacarose não é o único açúcar que pode manter infecção (**BOWEN & PEARSON, 1993; BOWEN *et al.*, 1997**). Ao observar o perfil de açúcares (TAB. 11), salienta-se que o leite bovino e humano apresentaram qualitativa e quantitativamente menos açúcares fermentáveis por microrganismos que os leites em fórmulas infantis, cerca de 6,0 e 3,5 vezes menos lactose, respectivamente, que os leites Ninho[®] e Nestogeno 2[®]. No entanto, quanto às análises microbiológicas, verificou-se que esta diferença apresentada na tabela de açúcares não influenciou em um menor crescimento bacteriano. Em geral, os mais altos índices de infecção foram observados nos animais que receberam solução contendo 5% de sacarose, estando de acordo com os encontrados da literatura, segundo os autores **BOWEN & PEARSON, 1993**. A colonização por *S. sobrinus* do grupo contendo 5% de sacarose não diferenciou dos demais grupos testes, à

exceção do grupo ADE, 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 do leite, interferiram de forma que o potencial cariogênico dos leites tenha sido diferente. Entretanto, os dados enfatizam a importância da interação entre bactéria e dieta na patogênese da cárie, porque os níveis de infecção por *S. sobrinus* nos animais que receberam ADE foram insignificantes (**TANZER, 1981**).

Resultados de estudos prévios (**BOWEN et al., 1991**), mostraram que ratos dessalivados que receberam leite bovino com 4% de lactose, *ad libitum*, apresentaram alta população de *S. sobrinus* na cavidade bucal, não diferindo do grupo controle que recebeu apenas sacarose como dieta. Este resultado está de acordo com o encontrado em nosso experimento, onde o leite bovino não afetou a população de *S. sobrinus*.

Ao relacionar os resultados microbiológicos com os índices de cáries apresentados neste trabalho, analisou-se que não houve uma relação direta com os grupos que apresentaram menores índices de cáries em relação à quantidade e porcentagem de *S. sobrinus*, sendo que todos os grupos em testes não diferiram entre si, exceto o grupo que recebeu ADE.

Estudos relataram que o leite bovino teria algum efeito sobre a população bacteriana devido ao conteúdo de substâncias antibacterianas (**KOSIKOWSKI, 1970**). Entretanto, neste experimento, não foi observada

diferença estatisticamente significativa na microbiota total ou na população de *S. sobrinus* em relação a este tipo de leite.

As fórmulas infantis permitem um significativo crescimento bacteriano (ERICKSON *et al.*, 1998), tendo importância no estabelecimento de microrganismos cariogênicos dentro da cavidade oral, os quais, podem metabolizar os açúcares disponíveis nos leites (SHEIKH e ERYCKSON, 1996; ERICKSON *et al.*, 1998).

Os leites Ninho® e Nestogeno 2® apresentaram maior quantidade de sacarose em suas fórmulas (TAB. 11) que o grupo controle positivo, não se diferenciando estatisticamente, quanto à quantidade e porcentagem de *S. sobrinus*, do grupo controle positivo, comprovando que outros fatores presentes no leite, que não apenas a sacarose, estão mantendo o controle da população de *S. sobrinus*.

O leite é um complexo de fluidos orgânicos e inorgânicos, podendo oferecer proteção ao esmalte (LARSEN *et al.*, 1988, GEDALIA *et al.*, 1991; KASHKER & TASKELL, 1992; NYVAD & JOHANSEN, 1995). O leite bovino geralmente é reconhecido pelo seu potencial anticariogênico (WEISS & BIBBY, 1966; JENKINS & FERGUSON, 1966; FROSTELL, 1970; VIANNA, 1971; MOR & McDOUGALL, 1977; SHELTON *et al.*, 1977; BIBBY *et al.*, 1980; REYNOLDS & DEL RIO, 1984; DEVER *et al.*, 1987; BOWEN & PEARSON, 1993; BOWEN *et al.*, 1991; CARBONEL *et al.*, 1995; BOWEN *et al.*, 1997) devido ao conteúdo de

cálcio, fósforo e a atividade de tamponamento da caseína (**VACCA-SMITH & BOWEN, 1995; ARAUJO *et al.*, 1998**). Os resultados deste trabalho confirmam os achados com relação ao potencial anticariogênico do leite bovino, no que se refere à sua constituição, confirmando os dados de outros trabalhos realizados por **SHAW *et al.*, 1959**. A presença de proteínas e gorduras pode exercer papel cariostático neste tipo de leite (**RUSOFF & KONIKOFF, 1975; REYNOLDS & WONG, 1983; REYNOLDS, 1987**). A caseína reduz a solubilidade do esmalte pela adsorção na sua superfície e a gordura forma um filme protetor na superfície dentária, prevenindo a ação microbiológica. O efeito anticariogênico não é atribuído ao menor consumo do leite bovino, pois o consumo foi semelhante aos demais leites utilizados e superior ao do controle positivo (**BOWEN *et al.*, 1990a**). Assim, não existe razão para acreditar que a diferença no crescimento do animal, por si só, entre os animais que consumiram leite e ADE ou 5% de sacarose, poderia estar associada com uma grande diferença na incidência de cárie observada, pois fatores como a composição do leite bovino podem interferir no processo de cárie dental (**REYNOLDS & JOHNSON, 1981**).

KOULOURIDES *et al.* (1976) estudaram a cariogenicidade de nove tipos de açúcares e concluíram que a lactose, manitol e sorbitol são significativamente menos cariogênicos que a sacarose, estando de acordo com os trabalhos de **TAMURA *et al.*, 1980; SCHEMMEL *et al.*, 1982; BOWEN *et al.*, 1990b**. Porém, estes resultados diferem dos achados de **BIRKHED *et al.* (1981)**, que mostraram que em humanos a produção de ácido na placa dental aumentou

após freqüente ingestão de leite ou lactose. Outros estudos laboratoriais em animais mostraram que a lactose aumenta a implantação da bactéria oral, produzindo cárie e ocasionando a desmineralização do esmalte (**KRASSE, 1965; RIPA, 1978; SCHEMEL *et al.*, 1982**).

A lactose é metabolizada lentamente pelos microrganismos orais, não sendo observada sua metabolização em pH de 5,5. Em contraste, a sacarose é rapidamente metabolizada, quando o valor do pH se aproxima de 4, formando polímeros de glucano e frutano que aumentam a aderência dos microrganismos (**WOOD & CRITCHLEY, 1966**).

BOWEN & PEARSON, 1993 relataram que a adição de sacarose ao leite bovino aumentou a severidade da cárie. No entanto, o leite bovino com sacarose foi significativamente menos cariogênico que solução de água contendo sacarose, sugerindo modesta propriedade anticariogênica do leite. Em nosso experimento, não é possível concluir se o leite bovino apresenta propriedade anticárie, mas sim que ele demonstrou insignificante cariogenicidade quando submetido a um modelo de alto desafio cariogênico, estando de acordo com o trabalho de **BOWEN *et al.*, 1997**.

O leite humano tem sido relatado como responsável pelo aparecimento da cárie dental similar à cárie de mamadeira (**KOTLOW, 1977; ROBERTS, 1982; ALALUUSUA *et al.*, 1996a**). **MATEE *et al.*, 1992** observaram, nas crianças da Tanzânia, com cárie rampante, que a microbiota oral apresentava 100 vezes mais

S. mutans e Lactobacilos, quando comparada com placa dental de crianças livres de cárie.

Pelos resultados de cárie obtidos neste experimento, o leite humano apresentou pequeno potencial cariogênico, estando de acordo com **TANK & STORVICK, 1965; ARAUJO *et al.*, 1995**, porém, diferindo dos achados de **RUGG-GUNN *et al.*, 1985; ALALUUSUA *et al.*, 1996a**.

ERICKSON & MAZHARI, 1999 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, suportando um crescimento bacteriano moderado além de apresentar ativos depósitos de cálcio e fosfato, considerando que o leite humano sozinho não causa a descalcificação do esmalte, pelo menos, até 12 semanas de exposição, não sendo portanto considerado cariogênico.

Porém, quando o leite humano é comparado com o leite bovino, observa-se que este último exibiu menor cariogenicidade (TAB. 13), estando 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 (**PAUL & SOUTHGATE, 1978**).

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTR
SEÇÃO CIRCULANT

Os resultados deste trabalho mostram que, 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; ARAUJO *et al.*, 1995**).

Observa-se, na tabela de perfil de açúcares dos leites (TAB. 11), que os leites bovino e humano não apresentam diversidades de açúcares, enquanto que os demais leites diferem destes tanto na diversidade quanto na quantidade de açúcares, o que poderia explicar os baixos índices de cáries 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 flúor, pois segundo os autores **KRASSE, 1988; NEWBRUN, 1988**, a presença de outros açúcares, como a sacarose, pode conferir maior cariogenicidade ao produto avaliado.

Vários pesquisadores têm encontrado uma 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.*, 1980**, relataram que a sacarose e a frutose foram igualmente causadoras de cárie, enquanto que a frutose em solução pode aumentar o desenvolvimento de cárie de

superfície lisa em animais (**BOWEN *et al.*, 1990b**). Estudos mostraram que a lactose do leite é menos cariogênica que a sacarose (**RUSOFF, 1975; BIRKHED *et al.*, 1981; SCHEMMEL *et al.*, 1982; BOWEN *et al.*, 1990b, 1997**).

Independentemente da possível diferença no potencial causador de cárie da sacarose e 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.

A utilização de fórmulas infantis na mamadeira tem sido relacionada com o desenvolvimento de cárie de mamadeira (**ERICKSON *et al.*, 1998**). As fórmulas infantis são uma combinação sintética complexa de nutrientes, incluindo carboidratos fermentáveis (**BOWEN *et al.*, 1997**).

Existem muitas fórmulas com diferentes origens de carboidratos como: lactose, xaropes de milho, sacarose e polímeros de glicose que podem ser utilizados pelos microrganismos orais, especialmente estreptococos do grupo mutans, para formar uma placa aderida ao esmalte que possibilite a adesão dos microrganismos aos dentes, além de servir como metabólitos na produção de ácidos orgânicos que podem desmineralizar o esmalte dental (**SHEIKH & ERICKSON, 1996**). O leite em fórmula infantil contendo sacarose na formulação, amplamente disponível, tem o potencial cariogênico aumentado (**DEVER *et al.*, 1987**).

Quanto aos leites em fórmulas infantis testados, todos induziram cárie, estando de acordo com os trabalhos de **BROWN et al., 1977; BIRKHED et al., 1981**. Entre estes leites testados, o Ninho® foi considerado o mais cariogênico por diferir do grupo ADE (controle negativo) em todos os índices analisados e por não diferir estatisticamente em Ds (superfície lisa), Ds e Dm (sulco) do grupo que recebeu solução contendo 5% de sacarose. A cariogenicidade dos leites em fórmulas infantis não pode ser baseada apenas no conteúdo de açúcares, pois, minerais como cálcio, fósforo, flúor, ferro e peptídeos presentes nestes leites podem modificar a cariogenicidade dos açúcares (**BOWEN et al., 1980**).

Estudos demonstraram que a maioria das fórmulas infantis promove desenvolvimento de cárie dental *in vitro* (**SHEIKH & ERICKSON, 1996; ERICKSON et al., 1998**) e *in vivo* (**SHEIKH & ERICKSON, 1996**). Estes resultados são similares àqueles relatados, utilizando modelo de rata dessalivada (**SHIH et al., 1995; BOWEN et al., 1996**).

Embora os leites em fórmulas infantis testados nos experimentos sejam menos cariogênicos que a solução contendo 5% de sacarose, eles apresentam algum potencial cariogênico e por isso merecem cuidado na sua utilização.

Os leites Ninho® e Nestogeno 2®, apesar de apresentarem em sua constituição de açúcares uma maior porcentagem de sacarose que o controle positivo (5% de sacarose) (TAB. 11), 9,3% e 14% respectivamente, desenvolveram menor incidência de cárie dental. Isto provavelmente se deve ao

fato dos leites apresentarem outros componentes em sua formulação, como caseína, cálcio, flúor (somente para o Nestogeno 2[®]), 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 2[®] apresentou quantidades de açúcares superiores ao Ninho[®]; no entanto, no que se refere à cárie dental houve menor índice no grupo do Nestogeno 2[®], indicando possivelmente a diferença entre os açúcares, assim como, a presença de flúor (TAB. 12) observada em sua constituição.

Os leites Nestogeno 2[®] e Nan 2[®], apresentaram aproximadamente 0,5 ppm de flúor em sua constituição, que pode contribuir na diminuição do potencial cariogênico dos leites, estando de acordo com o trabalho de **BÁNÓCZY *et al.*, 1985**, no qual a presença de flúor no leite contribuiu para a diminuição de sua cariogenicidade.

A fluoretação do leite foi primeiramente mencionada por **ZIEGLER (1956)**, sendo que o flúor adicionado ao leite não altera o sabor ou outras características do mesmo. O leite se apresenta como o primeiro alimento a ser oferecido para os bebês devido ao seu valor nutricional, portanto, sua fluoretação para crianças pré-escolares vem sendo defendida por muitos pesquisadores (**STEPHEN *et al.*, 1984; BÁNÓCZY *et al.*, 1985, VILLA *et al.*, 1989**).

Os resultados do experimento II confirmam e acrescentam que flúor, quando presente em ótimos níveis no ambiente bucal, é um agente anticariogênico eficaz, mesmo na presença de um desafio cariogênico severo. **LARSON *et al.*, 1974; BOWEN, 1973**, mostraram maior proteção quando pequenas concentrações de flúor foram administradas constantemente na cavidade bucal. De acordo com os resultados dos índices de cáries do experimento I, determinou-se que o leite Ninho® foi o produto mais cariogênico dentre os leites testados, no qual seria feita a suplementação com flúor para se avaliar a possível diminuição de sua cariogenicidade. Conforme os achados do experimento II, o grupo do leite Ninho® suplementado com flúor foi semelhante ao grupo ADE e ao leite humano, apresentando menor cariogenicidade, estando de acordo com os relatos de **RUSOFF *et al.*, 1962; ZIEGLER, 1964; WIRZ, 1964; STEPHEN *et al.*, 1981; BÁNÓCZY *et al.*, 1983; STÖSSER *et al.*, 1995**.

POULSEN *et al.*, 1976, mostraram que a administração pós-eruptiva do flúor resultou em redução significativa dos níveis de cárie bucal e lingual, porém, com menores efeitos nas superfícies proximais e sulco, estando de acordo com os nossos resultados. As superfícies de fossas e fissuras são as menos protegidas pelo flúor devido ao maior acúmulo de placa e maior quantidade de apatita carbonatada nestas regiões, sendo consistente com outros estudos (**POULSEN *et al.*, 1976; DIRKS *et al.*, 1978; HOROWITZ, 1980; MIRTH *et al.*, 1985; CAHEN *et al.*, 1993; TABCHOURY, 1997**).

UNICAMP

BIBLIOTECA CENTRAL

SEÇÃO CIRCULANTE

A cárie dentária resulta de um processo de desmineralização e inicia-se com a dissolução dos minerais mais solúveis como, por exemplo, apatita carbonatada (**GRÖN *et al.*, 1963; HALLSWORTH *et al.*, 1973**). Carbonato é encontrado em maiores quantidades, em certas regiões dos dentes, como os sulcos (**ROBINSON *et al.*, 1982**). Quando o dente se forma na presença de flúor, isto é, através da ingestão de água fluoretada ou suplementos, há a formação dental contendo uma menor quantidade de minerais solúveis, como o carbonato (**WEATHERELL, 1975**). Este fato pode explicar o menor efeito do flúor nas cáries de sulco neste estudo, já que o flúor somente foi oferecido aos animais após a erupção dos dentes. Além disso, nas regiões de sulco, existe um maior acúmulo de placa do que nas outras regiões do dente, devido à própria anatomia desta superfície (**ÖGAARD, 1990**). Desta forma, apesar da presença de flúor, não haveria um efeito protetor nas regiões de sulco, à semelhança do observado na região de superfície lisa (**LARSEN, 1990**).

O efeito preventivo da cárie pelo leite fluoretado tem sido reportado em vários estudos, assim como em modelos experimentais (**BORROW DENTAL MILK FOUNDATION, 1997**). Foi provada sua eficácia recentemente em estudos *in vitro* por **PHILLIPS, 1991**, e *in vivo* por **CUTRESS *et al.*, 1995**. **MARIÑO**, em **1996**, sugeriu a fluoretação do leite como uma alternativa quando a da água não é possível, sendo a eficácia do flúor comprovada quando administrado junto com alimentos contendo alta concentração de cálcio. A adição de NaF ao leite resulta, quanto ao índice de cárie, numa diminuição de 50% a 70% em relação ao grupo

controle água; e diminuição das lesões cariosas de 30% a 40%, em relação ao grupo do leite sem suplementação de flúor (**STÖSSER *et al.*, 1995**). Em nosso experimento ao suplementar flúor ao leite houve redução de 60,6% em relação ao total de superfície lisa e 57,8% em relação ao total de cárie de sulco quando comparado ao leite não suplementado.

BÁNÓCZY *et al.*, 1990 testaram em modelo animal o efeito anticariogênico do NaF quando administrado em leite e em água. O grupo que recebeu NaF (15 ppm) em água não mostrou redução de cárie significativa quando comparado ao grupo controle, enquanto que o grupo que recebeu leite com a mesma concentração de flúor apresentou o menor índice de cárie quando comparado com todos os outros grupos. Portanto, os resultados sugerem que o efeito anticariogênico do NaF é mais pronunciado quando o veículo é leite do que água.

Em **1958**, **ERICSSON** demonstrou que embora a absorção do flúor em leite por ratos seja mais lenta que quando em água, as quantidades totais finalmente absorvidas são praticamente iguais. Segundo o autor, a absorção mais lenta seria devido a uma menor difusibilidade do flúor, provavelmente ocasionada pela coagulação do leite, podendo ser vantajoso por manter uma concentração elevada de flúor no sangue por mais tempo. **KONIKOFF**, em **1974**, sugeriu que mesmo na presença de grande quantidade de cálcio no leite, ainda ocorre absorção do flúor.

Embora o alto conteúdo de cálcio no leite (geralmente 1200 ppm) possa interagir com o flúor, no leite fluoretado, resultando na precipitação do cálcio e flúor, isto não acontece com o leite fluoretado contendo 2-5 ppm de F como usado na prática. A razão para isto é que boa parte do cálcio no leite está complexado com constituintes na matriz do leite (como citrato e caseína). Apenas uma pequena fração de cálcio no leite 80 ppm (2,0 mM) está na forma livre de íon (HOLT *et al.*, 1981; TÓTH *et al.*, 1997), sendo insuficiente para causar precipitação do cálcio e do flúor. Podemos concluir assim, que a disponibilidade do F (NaF), com leite ou água, apresenta metabolismo similar, tendo 20% a 30% de ionização no leite e 100% de ionização na água, estando de acordo com CUTRESS *et al.*, 1996.

ROSALEN *et al.*, em 1997, concluíram que o flúor reduz a susceptibilidade do esmalte à dissolução ácida e promove a remineralização de pequenas lesões de cárie. O flúor na sua forma HF (que ocorre em baixo pH), se incorpora ao esmalte na forma de fluorapatita, podendo promover a remineralização e estas lesões remineralizadas, na presença de flúor, apresentam maior resistência ao ataque subsequente de cárie (BOWEN, 1991). A diminuição da solubilidade pelo ácido deve ser pela redução de carbonato no esmalte, e/ou pelo acúmulo de flúor em volta da lesão, sendo alto suficiente para reduzir a solubilidade (TÓTH *et al.*, 1989; MURRAY *et al.*, 1991).

Porém, estudo clínico realizado por LOPES *et al.*, 1984, em que testaram a capacidade anticariogênica do leite fluoretado (200 mL de leite com

2,21 mg de NaF) servido a escolares na faixa etária de 6 a 12 anos de idade, em duas escolas públicas estaduais da cidade de Agudos, estado de São Paulo, não verificou eficácia do flúor na suplementação do leite; no entanto, os autores acreditam que 16 meses de estudo não foram suficientes para demonstrar a eficácia do método.

Ainda vários conceitos indicam que o leite não serviria como veículo para o flúor, em termos de comunidade, pelo fato do seu consumo ser bastante irregular. A variação individual na ingestão do leite é muito grande, mas praticamente todas as crianças pequenas ingerem alguma quantidade dele, embora o seu consumo diminua com o aumento da idade. Trata-se de um alimento relativamente caro, inacessível às camadas mais pobres da população. Para programas escolares, este problema fica eliminado, pois uma quantidade predeterminada pode ser distribuída diariamente para as crianças **(MARIÑO, 1995)**.

Outro fator que deve ser observado com cautela são os relatos de fluorose com o consumo de leite formulado reconstituído com água fluoretada, estudado por vários autores **(FORSMAN, 1974; MYERS, 1978; SINGER & OPHAUG, 1979; BECKER & BRUCE, 1981; LARSEN *et al.*, 1988; EKSTRAND, 1989; LATIFAH & RAZAK, 1989; LEVY *et al.*, 1995)**. **SILVA & REYNOLDS (1996)** demonstraram que fórmulas infantis australianas preparadas com água não fluoretada não causam risco de fluorose dental, no entanto, se preparadas com água de abastecimento contendo este 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, estando de acordo com os resultados de **DAMANTE *et al.*, 2000.**

Os resultados do presente trabalho contribuem positivamente no processo de conhecimento e informação para prevenção da doença cárie dental, principalmente quanto à orientação dos profissionais e familiares quando da utilização de mamadeira noturna contendo carboidratos fermentáveis.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

7. CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

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

9.1 Não é observado efeito antibacteriano dos leites bovino, humano e também das fórmulas infantis sobre a microbiota bucal;

9.2 Os leites bovino e humano não são cariogênicos quando utilizados de forma racional ou mesmo sob um elevado desafio cariogênico;

9.3 Os leites Ninho[®] e Nestogeno 2[®] são cariogênicos, exibindo, porém algum efeito cariostático protetor pois, embora possuindo mais sacarose em suas formulações originais que o controle (5% de sacarose), provocaram menor índice de cárie que o próprio controle positivo;

9.4 A adição de flúor na reconstituição do leite formulado é capaz de reduzir satisfatoriamente sua cariogenicidade, sendo eficaz na redução da progressão das lesões cariosas;

9.5 Os leites em fórmulas infantis apresentam maior potencial cariogênico, quando comparados com os leites bovino e humano, devendo ser utilizados com cautela.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS⁷

1. ALALUUSUA, S. *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.
2. _____. *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, 1996b.
3. 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.
4. 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.
5. ARAUJO, D.R. *et al.* An *in situ* evaluation of cariogenic potential of human breast milk. ***J Dent Res***, Washington, v.74, p.48, 1995. [Abstract, 294]

⁷ 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.

COPPI, L. C. Avaliação da cariogenicidade de diferentes tipos de leites e efeitos da suplementação com flúor.

6. ARAUJO, 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.
7. ARNOLD, R.R., BREWER, M., GAUTHIER, J.J. Bactericidal activity of human lactoferrin: sensitivity of a variety of microorganism. **Infect Immun**, Washington, v.28, n.3, p.893-898, June 1980.
8. BÁNÓCZY, J. *et al.* Anticariogenic effect of fluoridated milk and water in rats. **Acta Physiol Hung**, Budapest, v.76, n.4, p.341-346, 1990.
9. _____. *et al.* Effect of fluoridated milk on caries: 5 year results. **J R Soc Health**, London, v.105, n.3, p.99-103, June 1985.
10. _____. *et al.* Effect of fluoridated milk on caries; 3 year results. **Community Dent Oral Epidemiol**, Copenhagen, v.11, n.2, p.81-85, Apr. 1983.
11. BECKER, W., BRUCE, A. Fluoride intake from food. **Var Foda**, Stockholm, v.33, p.198-261, 1981. [Supplement, 3]
12. BERKOWITZ, R.G., TURNER, 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.

13. BIBBY, B.G. *et al.* Protective effect of milk against *in vitro* caries. **J Dent Res**, Washington, v.59, n.10, p.1565-1570, Oct. 1980.
14. BIRKHED, D. Behavioural aspects of dietary habits and dental caries. **Caries Res**, Basel, v.24, p.27-35, Sept. 1990. [Supplement, 1]
15. _____. *et al.* Cariogenicity of glucose, sucrose and amylopectin in rats and hamsters infected and noninfected with *Streptococcus mutans*. **Caries Res**, Basel, v.14, n.6, p.441-447, 1980.
16. _____. *et al.* Milk and lactose acid production in human dental plaque. **J Dent Res**, Washington, v.60, p.1245, 1981. [Abstract, 6]
17. BORROW DENTAL MILK FOUNDATION. **Advances in milk fluoridation**. [s.l. : s.n.], 1997. p.1-7.
18. BOWEN, W.H. Caries prevention-fluoride; reaction paper. **Adv Dent Res**, Washington, v.5, p.46-49, Dec. 1991.
19. _____. Response to Seow: biological mechanisms of early childhood caries. **Community Dent Oral Epidemiol**, Copenhagen, v.26, p.8-27, 1998. [Supplement, 1]

20. 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.
21. _____, PEARSON, S.K. Effect of milk on cariogenesis. **Caries Res**, Basel, v.27, p.461-466, 1993.
22. _____, TABAK, L.A. **Cariologia para a década de 90**. São Paulo : Santos, 1995. p.118-122.
23. _____, 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.
24. _____, 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, 1990a.
25. _____, _____, 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.
26. _____, YOUNG, D.A., PEARSON, S.K. The effects of sucralose on coronal and root-surface caries. **J Dent Res**, Washington, v.69, n.8, p.1485-1487, Aug. 1990b.

27. BOWEN, W.H. *et al.* A method to assess cariogenic potential of foodstuffs. **J Am Dent Assoc**, Chicago, v.100, n.5, p.677-681, May 1980.
28. _____. *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.
29. _____. *et al.* Cariogenic potential of additional infant formulas. **J Dent Res**, Washington, v.75, p.2605, 1996. [Special Issue]
30. _____. *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.
31. _____. *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 remineralisation of the teeth**. Oxford : IRL Press, 1986. p.243-250.
32. _____. *et al.* The effects of irradiation on dental caries in primates. **Caries Res**, Basel, v.12, n.2, p.112, 1978. [Abstract]
33. BRAMS, M., MALONEY, J. Nursing bottle caries in breast-fed children. **J Pediatr**, Saint Louis, v.103, n.3, p.415-416, Sept. 1983.

34. BROWN, C.R. *et al.* Effect of milk and fluoridated milk on bacterial enamel demineralization. **J Dent Res**, Washington, v.56, p.B210, 1977. [Abstract, 632]
35. CAHEN, A.M. *et al.* Caries prevalence in 6-to 15-year-old French children based on the 1987 and 1991 national surveys. **J Dent Res**, Washington, v.72, n.12, p.1581-1587, Dec. 1993.
36. CARBONEL, V.V. *et al.* An *in situ* study of cariogenesis of bovine milk. **J Dent Res**, Washington, v.74, n.3, p.811, 1995. [Abstract, 299]
37. CARVALHO, A.S., CURY, J.A. Fluoride release from some dental materials in different solutions. **Oper Dent**, Seattle, v.24, p.14-19, 1999.
38. 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.
39. CORNICK, D.E., BOWEN, W.H. Development of the oral flora in new born monkeys [Macaca irus]. **Br Dent J**, London, v.130, n.6, p.231-234, Mar. 1971.

40. CURY, J.A. Uso do flúor. *In*: BARATIERI, L.N. *et al.* **Dentística** : procedimentos preventivos e restauradores. São Paulo : Santos, 1990. Cap.2, p.43-67.
41. CUTRESS, T. *et al.* Uptake of dietary F from milk into the developing teeth of sheep. **J Dent Res**, Washington, v.74, p.564, 1995. [Abstract, 1306]
42. CUTRESS, T. *et al.* Fluoride uptake into the developing enamel and dentine of sheep incisors following daily ingestion of fluoridated milk or water. **N Z Dent J**, Dunedin, v.92, n.409, p.68-72, Sept. 1996.
43. 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]
44. DAVIS, J.C. Fluoridised milk for children. **Dairy Ind**, London, v.40, p.7-10,48-51, 1975.
45. DEMERS, M. *et al.* Caries predictors switable for mass screenings in children : a literature review. **Community Dent Health**, London, v.7, n.1, p.11-21, Mar. 1990.

46. 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**, Dunedin, v.83, n.371, p.7-10, Jan. 1987.
47. DIRKS, O.B., KÜNZEL, W., CARLOS, J.P. Caries-preventive water fluoridation. **Caries Res**, Basel, v.12, p.7-14, 1978. [Supplement, 1]
48. _____. *et al.* Total and free ionic fluoride in human and cows milk as determined by gas-liquid chromatography and the fluoride electrode. **Caries Res**, Basel, v.8, n.2, p.181-186, 1974.
49. DREIZEN, S., BROWN, L.R. Xerostomia and dental caries. *In*: STILES, H.M., LOESCHE, W.J., O'BRIEN, T. (Ed.) **Microbial aspects of dental caries**. Washington : IRL Press, 1976. p.263-273.
50. DUFF, E.J. Total and ionic fluoride in milk. **Caries Res**, Basel, v.15, n.5, p.406-408, 1981.
51. EDGAR, W.M., BOWEN, W.H., COLE, M.F. Development of rampant dental caries, and composition of plaque fluid and saliva in irradiated primates. **J Oral Pathol**, Copenhagen, v.10, n.4, p.284-295, Aug. 1981.
52. EKSTRAND, J. Fluoride intake in early infancy. **J Nutr**, Bethesda, v.119, p.1856-1860, 1989. [Supplement, 12]

53. EKSTRAND, J., EHRNEBO, M. Influence of milk products on fluoride bioavailability in man. **Eur J Clin Pharmacol**, Berlin, v.16, n.3, p.211-215, Sept. 1979.
54. _____, HARDELL, L.I., SPAK, C.J. Fluoride balance studies on infants in a 1 ppm water fluoride area. **Caries Res**, Basel, v.18, n.1, p.87-92, 1984.
55. 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.
56. _____. *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.
57. ERICSSON, Y. The state of fluoride in milk and its absorption and retention when administered in milk. **Acta Odontol Scand**, Oslo, v.16, p.51-57, 1958.
58. ERONAT, N., EDEN, E. A comparative study of some influencing factors of rampant or nursing caries in preschool children. **J Clin Pediatr Dent**, Birmingham, v.15, n.4, p.275-279, 1992 .

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

59. FLYNN, A. Minerals and trace elements in milk. **Adv Food Nutr Res**, San Diego, v.36, p.209-252, 1992.
60. FORSMAN, B. Dental fluorosis and caries in high-fluoride districts in Sweden. **Community Dent Oral Epidemiol**, Copenhagen, v.2, n.3, p.132-148, 1974.
61. FRANK, J.F., CHRISTEN, G.L. Microbiological and flavor evaluation of fluoridated milk. **J Food Prot**, Ames, v.48, p.799-802, 1985.
62. FROSTELL, G. Effects of milk, fruit juices, and sweetened beverages on the pH of dental plaques. **Acta Odontol Scand**, Oslo, v.28, p.609-622, 1970.
63. FURST, P., FURST, C., WILMERS, K. PCDDs and PCDFs in human milk statistical evaluation of a 6-years survey. **Chemosphere**, Oxford, v.25, p.1029-1038, 1992.
64. 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.
65. GEDALIA, 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.

66. 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.
67. GRÖN, P. *et al.* The effect of carbonate on the solubility of hydroxylapatite. **Arch Oral Biol**, Oxford, v.8, p.251-263, May/June 1963.
68. 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.
69. GUSTAFSON, G. *et al.* The cariogenic effect of different carbohydrates in dry and moist diets. Experimental dental caries in golden hamsters. **Odontol Tidskr**, Stockholm, v.63, p.506-523, 1955.
70. GYURKOVICS, C. *et al.* Effect of fluoridated milk on caries: 10-year results. **J Clin Dent**, Yardley, v.3, n.4, p.121-124, 1992.
71. 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.
72. HALLSWORTH, A.S., WEATHERELL, J.A, ROBINSON, C. Loss of carbonate during the first stages of enamel caries. **Caries Res**, Basel, v.7, n.4, p.345-348, 1973.

73. HARGREAVES, J.A. The level and timing of systemic exposure to fluoride with respect to caries resistance. **J Dent Res**, Washington, v.71, n.5, p.1244-1248, May 1992.

74. HARPER, D.S., ABELSON, D.C., JENSEN, M.E. Human plaque acidity models. **J Dent Res**, Washington, v.66, p.1503-1510, 1986. [Special Issue]

75. _____. *et al.* Modification of food cariogenicity in rats by mineral-rich concentrates from milk. **J Dent Res**, Washington, v.66, n.1, p.42-45, Jan. 1987.

76. HOLLIS, B.W., LAMBERT, P.W., HORST, R.L. Factors affecting the antirachitic sterol content of native milk. *In*: HOLICK, M.F., GRAY, T.K., ANAST, C.S. (Ed.) **Perinatal calcium and phosphorus metabolism**. New York : Elsevier Science, 1983. p.157-182. *Apud* LÖNNERDAL, B. *Op. cit.* Ref. 102.

77. HOLT, C., DALGLEISH, D.G., JENNES, R. Calculation of the ionic equilibria in milk diffusate and comparison with experiment. **Anal Biochem**, Washington, v.113, n.1, p.154-163, May 1981.

78. HOROWITZ, H.S. Combinations of caries-preventive agents and procedures. **J Dent Res**, Washington, v.59, p.2183-2189, 1980.

79. JENKINS, G.N., FERGUSON, D.B. Milk and dental caries. **Br Dent J**, London, v.120, n.10, p.472-477, May 1966.
80. JOHNSEN, D.C. Dental caries patterns in preschool children. **Dent Clin North Am**, Philadelphia, v.28, n.1, p.3-20, Jan. 1984.
81. 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]
82. 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.
83. _____. The infectious and transmissible nature of experimental dental caries: findings and implications. **Arch Oral Biol**, Oxford, v.1, p.304-320, Mar. 1960.
84. _____, 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.
85. KITAMURA, M., KIYAK, H.A., MULLIGAN, K. Predictors of root caries in the elderly. **Communiy Dent Oral Epidemiol**, Copenhagen, v.14, n.1, p.34-38, Feb. 1986.

UNICAMP

BIBLIOTECA CENTRAL

SEÇÃO CIRCULANTE

86. KONIKOFF, B.S. The bioavailability of fluoride in milk. **J La Dent Assoc**, Shreveport, v.22, n.2, p.7-12, Fall 1974.
87. KOSIKOWSKI, F. **Cheese and fermented milk foods**. Ann Arbor : Edward Brothers, 1970. p.330.
88. 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.
89. 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.
90. KRASSE, B. **Risco de cárie: guia prático para controle e assessoramento**. 2.ed. São Paulo: Quintessence, 1988. Cap.1, p.15-26.
91. _____. The effect of the diet on the implantation of caries-inducing streptococci in hamsters. **Arch Oral Biol**, Oxford, v.10, p.215-221, 1965.
92. LARSEN, M.J. Chemical events during tooth dissolution. **J Dent Res**, Washington, v.69, p.575-580, Feb. 1990. [Special Issue]

93. LARSEN, M.J. *et al.* Dental fluoroses in the primary and the permanent dentition in fluoridated areas with consumption of either powdered milk or natural cow's milk. **J Dent Res**, Washington, v.67, n.5, p.822-825, May 1988.
94. LARSON, R.H. *et al.* Caries inhibition in the by water-borne and enamel-bound fluoride. **Caries Res**, Basel, v.10, n.10, p.321-331, 1976.
95. _____. *et al.* Relation of ambient and enamel fluoride [F] to rat caries. **J Dent Res**, Washington, v.53, p.270, Feb. 1974. [Abstract, 864]
96. 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.
97. LATIFAH, R., DUGUID, R. Measurements of ionic fluoride in milk. **Ann Acad Med Singapore**, Singapore, v.15, n.3, p.299-304, July 1986.
98. _____, RAZAK, I.A. Fluoride levels in infant formulas. **J Pedod**, Boston, v.13, n.4, p.323-327, Summer 1989.
99. LEHNINGER, A.L. **Bioquímica**: componentes moleculares das células. São Paulo : E. Blücher, 1976. v.1

100. LEVY, S.M., KIRITSY, M.C., WARREN, J.J. Sources of fluoride intake in children. **J Public Health Dent**, Richmond, v.55, n.1, p.39-52, Winter 1995.
101. LIGHTS, A.E. *et al.* Effect of fluoridated milk on deciduous teeth. **J Am Dent Assoc**, Chicago, v.56, p.249-250, 1958.
102. LÖNNERDAL, B. Effects of maternal dietary intake on human milk composition. **J Nutr**, Bethesda, v.116, n.4, p.499-513, Apr. 1986.
103. LOPES, E.S., BASTOS, J.R.M., ZANIRATTO, J.E. Prevenção da cárie dentária através da fluoretação do leite servido a escolares de Agudos – SP, durante 16 meses. **Rev Assoc Paul Cir Dent**, São Paulo, v.38, n.6, nov./dez. 1984.
104. MADISON, K.M. *et al.* Effect of desalivation and age on susceptibility to infection by *Streptococcus sobrinus*. **Caries Res**, Basel, v.23, n.2, p.70-74, 1989.
105. MARIÑO, R. Se debe fluorar la leche? **Bol Oficina Sanit Panam**, Washington, v.120, n.2, p.98-109, feb. 1996.
106. _____. Should we use milk fluoridation? A review. **Bull Pan Am Health Organ**, Washington, v.29, n.4, p.287-298, Dec. 1995.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIÊNCIAS

107. MARINÓ, R., VILLA, A.E., GUERRERO, S. Caries prevention through fluoridated milk in Codegua, Chile. **J Dent Res**, Washington, v.79, p.330, 2000. [Abstract, 1495]
108. MATEE, M.I.N. *et al.* Streptococci mutans and Lactobacilli in breast-fed children with rampant caries. **Caries Res**, v.26, n.3, p.183-187, 1992.
109. MATTOS-GRANER, R.O. *et al.* Caries prevalence in 6-36-month-old Brazilian children. **Community Dent Health**, London, v.13, n.2, p.96-98, June 1996.
110. McDOUGALL, W.A. Effect of milk on enamel demineralization and remineralization *in vitro*. **Caries Res**, Basel, v.11, n.3, p.166-172, 1977.
111. MICHAL, B.C. Bottle mouth caries. **J La Dent Assoc**, Shreveport, v.27, p.10-13, 1969. *Apud* GARDNER, D.E., NORWOOD, J.R., EISENSEN, J.E. *Op. cit.* Ref. 64.
112. MILNES, A.R. Description and epidemiology of nursing caries. **J Public Health Dent**, Raleigh, v.56, n.1, p.38-50, Winter 1996.
113. MIRTH, D.B. *et al.* Comparison of the cariostatic effect of topically and systemically administered controlled-release fluoride in the rat. **Caries Res**, Basel, v.19, n.5, p.466-474, 1985.

114. 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.
115. MOYNIHAN, P.J. *et al.* Effect of glucose polymers in water, milk and milk substitute on plaque pH *in vitro*. **Int J Paediatr Dent**, Oxford, v.6, n.1, p.19-24, 1996.
116. MUHLEMANN, H.R., IMFELD, T. Evaluation of food cariogenicity by plaque pH telemetry. *In*: HEFFEREN, J.J., KOEHLER, H.M. (Ed.) **Foods, nutrition and dental health**. Chicago : Pathotox, 1981. p.151-154. v.1
117. MURRAY, J.J., RUGG-GUNN, A.J., JENKINS, H.N. 3rd ed. **Fluorides in caries prevention**. Oxford : Wright, 1991. p.295-323.
118. MYERS, H.M. **Fluorides and dental fluorosis**. Basel : Karger, 1978.
119. NEESER, 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.
120. NEWBRUN, E. **Cariologia**. 2.ed. São Paulo : Santos, 1988. Cap.2, p.17-49.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

121. NEWBRUN, E. Sucrose in the dynamics of the carious process. *Int Dent J*, London, v.32, n.1, p.13-23, Mar. 1982.
122. NYVAD, B., JOHANSEN, J.W. The effect of sweetened milk on the pH response of dental plaque. *Caries Res*, Basel, v.29, n.4, p.321, July/Aug. 1995. [Abstract, 100]
123. O'MULLANE, D.M. Systemic fluorides. *Adv Dent Res*, Washington, v.8, n.2, p.181-184, July 1994.
124. _____. The future of water fluoridation. *J Dent Res*, Washington, v.69, p.756-759, Feb. 1990. [Special Issue]
125. ÖGAARD, B. Effects of fluoride on caries development and progression *in vivo*. *J Dent Res*, Washington, v.69, p.831-819, Feb. 1990. [Special Issue]
126. PAKHOMOV, G. International experience of milk fluoridation for dental caries prevention. *J Dent Res*, Washington, v.79, p.159, 2000. [Abstract, 122]
127. PAKHOMOV, G. *et al.* The caries reducing effect of a community based milk fluoridation project in Bulgaria. *J Dent Res*, Washington, v.72, p.109, 1993. [Abstract, 45]

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

128. PAUL, A.A., SOUTHGATE, D.A.T. *The composition of foods*. 4th ed. London : HMSO, 1978.
129. PETERSSON, L.G., LYNCH, E., TWETMAN, S. Saliva and plaque fluoride concentrations after rinsing with fluoridated milk. *J Dent Res*, Washington, v.79, p.330, 2000. [Abstract, 1494]
130. 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, 1920]
131. PHILLIPS, P.C. Fluoride availability in fluoridated milk systems. *Caries Res*, Basel, v.25, p.237, 1991.
132. POULSEN, S., LARSEN, M.J., LARSON, R.H. Effect of fluoridated milk and water on enamel fluoride content and dental caries in the rat. *Caries Res*, Basel, v.10, n.3, p.227-233, 1976.
133. RAO, G.S. Dietary intake and bioavailability of fluoride. *Ann Rev Nutr*, Palo Alto, v.4, p.115-136, 1984.
134. 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.

135. 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.
136. _____, 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.
137. _____, STOREY, E. A review of the effect of milk on dental caries. **Aust J Dairy Technol**, Highett, p.175-179, 1979.
138. _____, 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.
139. _____, RILEY, P.F., STOREY, E. Phosphoprotein inhibition of hydroxyapatite dissolution. **Calcif Tissue Int**, New York, v.34, p.52-56, 1982. [Supplement, 2]
140. RIPA, L.W. Nursing habits and dental decay in infants: "Nursing bottle caries". **ASDC J Dent Child**, Chicago, v.45, n.4, p.274-275, July/Aug. 1978.
141. 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.

142. ROBINSON, C., NANCOLLAS, G.H., TEN CATE, J.M. Alterations in the composition of permanent human enamel during carious attack. *In*: LEACH, S.A., EDGAR, W.M. (Ed.) ***Demineralisation and remineralisation of the teeth***. Oxford : IRL Press, 1982. p.209-223.
143. 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, 1997.
144. 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.
145. RUSOFF, L.L. The nutritional value of fluoridized milk. ***Dairy Ind***, London, v.40, p.471-477, 1975.
146. _____, KONIKOFF, B.S. Fluoridation of milk and dairy products. *In*: INTERNATIONAL CONGRESS ON NUTRITION, 10., 1975, Kyoto, Japan. *Apud* WHITE, C.H. *Op. cit.* Ref. 182.
147. _____. *et al.* Fluoride addition to milk and its effect on dental caries in school children. ***Am J Clin Nutr***, Bethesda, v.11, p.94-101, 1962.

148. 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.
149. 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.
150. 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.
151. 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.
152. SHELTON, P.G., BENKOWITZ, R.J., FORRESTER, D.J. Nursing bottle caries. **Pediatrics**, Evanston, v.59, n.5, p.777-778, May 1977.
153. SHIH, A.Y., PEARSON, S.K., BOWEN, W.H. Cariogenic potential of some infant formulas. **J Dent Res**, Washington, v.74, p.48, 1995. [Abstract, 292]
154. SILVA, M., REYNOLDS, E.C. Fluoride content of infant formulae in Australia. **Aust Dent J**, St. Leonards, v.41, n.1, p.37-42, Feb. 1996.

155. SILVERSTONE, L.M. Remineralization phenomena. **Caries Res**, Basel, v.11, p.59-84, 1977. [Supplement, 1]
156. SINGER, L., OPHAUG, R.H. Total fluoride intake of infants. **Pediatrics**, Evanston, v.63, n.3, p.460-466, Mar. 1979.
157. SPAK, C.J., EKSTRAND, J., ZYLBERSTEIN, D. Bioavailability of fluoride added by baby formula and milk. **Caries Res**, Basel, v.16, n.3, p.249-256, 1982.
158. STEINMAN, P.R., HALEY, M.I., O'DAY, P. Intraperitoneal injections of carbohydrates to suckling rats and subsequent dental caries. **J Dent Res**, Washington, v.37, p.719-721, 1958.
159. STEPHAN, R.M. Effects of different types of human foods on dental health in experimental animals. **J Dent Res**, Washington, v.45, n.5, p.1551-1561, Sept./Oct. 1966.
160. STEPHEN, K.W. *et al.* A five-year doubleblind fluoridated milk study in Scottish school-children. **Community Dent Oral Epidemiol**, Copenhagen, v.12, n.4, p.223-229, Aug. 1984.
161. _____. *et al.* A 4-year double-blind fluoridated school milk study in a vitamin-D deficient area. **Br Dent J**, London, v.151, n.9, p.287-292, Nov. 1981.

162. STÖSSER, L., KNEIST, S., GROSSER, W. The effects of non-fluoridated and fluoridated milk on experimental caries in rats. **Adv Dent Res**, Washington, v.9, n.2, p.122-124, July 1995.
163. SUZUKI, Y. *et al.* Relation between incidence of caries and feeding in young children. **Jpn J Ped Dent**, Tokyo, v.14, p.308-314, 1976.
164. TABCHOURY, C.P.M. **Efeito de diferentes concentrações de flúor e diferentes níveis de desafio cariogênico no desenvolvimento de cárie dental em ratos dessalivados**. Piracicaba, 1997. 83p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.
165. TAMURA, S., MATSUMOTO, Y., HATTORI, K. A study of control of experimental dental caries development by alteration of sugar composition in milk formula. **Bull Tokyo Dent Coll**, Tokyo, v.21, n.1, p.35-40, Feb. 1980.
166. TANK, G., STORVICK, C. Caries experience in children one to six years old in two Oregon communities (Corvallis and Albany) III. Relation of diet to variation of dental caries. **J Am Dent Assoc**, Chicago, v.70, n.2, p.394, 1965.

167. 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.
168. TAVES, D.R., GUY, W.S. Distribution of fluoride among body compartments. *In*: JOHANSEN E., TAVES D.R., OLSEN, T.O. **Continuing evaluation of the use of fluoride.** Boulder : Westview Press, 1979. Cap.7.
169. TEN CATE, J.M., REMPT, H.E. Comparison of the *in vivo* effect of a 0 and 1,500 ppm F MFP toothpaste on fluoride uptake, acid resistance and lesion remineralization. **Caries Res**, Basel, v.20, n.3, p.193-201, 1986.
170. 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.
171. THYLSTRUP, A., FEJERSKOV, O. **Tratado de cariologia.** Rio de Janeiro : Cultura Médica, 1988. 388p.
172. TÓTH, Z. *et al.* Changes of acid solubility and fluoride content of the enamel surface in children consuming fluoridated milk. **Acta Physiol Hung**, Budapest, v.74, n.2, p.135-140, 1989.

173. 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.
174. _____. *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, p.1063-1069, 1994.
175. 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, 1982.
176. VIANNA, R. **Cariogenic potential of milk Indiana**. Master Thesis. [Indian] : Indiana University. School of Dentistry, 1971.
177. VILLA, A. *et al.* Fluoride bioavailability from disodium monofluorophosphate fluoridated milk in children and rats. **Caries Res**, Basel, v.23, n.3, p.179-183, 1989.
178. _____. *et al.* La prevención de caries através de un vehículo nutricional. **Arch Latinoam Nutr**, Caracas, v.40, n.2, p.197-208, June 1990.

179. WEATHERELL, J.A. Composition of dental enamel. **Br Med Bull**, Edinburgh, v.31, n.2, p.115-119, May 1975. *Apud* JENKINS, G.N., FERGUSON, D.B. *Op. cit.* Ref. 79.
180. 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.
181. 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.
182. WHITE, C.H. Milk, milk products, and dental health. **J Dairy Sci**, Champaign, v.70, n.2, p.392-396, 1987.
183. WIRZ, R. Ergebnisse des grossversuches mit fluoridierter milch in winterthur von 1958 bis 1964. **SSO Schweiz Monatsschr Zahnheilkd**, Zurich, v.74, p.767-784, 1964.
184. WOOD, J.M., CRITCHLEY, P. The extracellular polysaccharide produced from sucrose by a cariogenic streptococcus. **Arch Oral Biol**, Oxford, v.11, n.10, p.1039-1062, Oct. 1966.
185. ZIEGLER, E. Untersuchung über die fluoridierung der milch zur kariesprophylaxe. **Mitt Naturw Ges Winterthur**, Winterthur, v.28, p.1-9, 1956.

186. ZIEGLER, V.E. Bericht über den Winterthurer Grossversuch mit Fluorzugabe zur Haushaltmilch. **Helv Paediatr Acta**, Basel, v.19, p.343-354, 1964.
187. ZINNER, D.D., JABLON, J.M. Cariogenic streptococci in infants. **Arch Oral Biol**, Oxford, v.14, n.12, p.1429-1431, Dec. 1969.

ANEXO

ANEXO 1 – 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 integral	60,0
Sacarose pó (Glaçúcar®)	560,0
Sal iodado	20,0

Segundo **KEYES & JORDAN, 1964.**

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

ANEXO 2 – Dieta Líquida NCP#2

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

Segundo **BOWEN *et al.*, 1997.**

Todos os componentes foram colocados 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. Esta fórmula é geralmente suficiente para fornecer alimento através de intubação gástrica para 48 animais por 2 dias.

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[®] foi a marca de óleo de milho utilizada, sendo marca registrada das Refinações de Milho, Brasil Ltda. (Pouso Alegre, Minas Gerais).

ANEXO 3 – Diagrama de Keyes

	Bucal			Lingual			Proximal			Sulco		
maxila esquerda												
maxila direita												
mandíbula esquerda												
mandíbula direita												
	L	E	Ds	Dm								
Bucal												
Lingual												
Proximal												
Sulco												
Morsal												

ANEXO 4 - Aprovação pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)

/ IB / UNICAMP



INSTITUTO DE BIOLOGIA
UNICAMP



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

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 006-1, sobre "Avaliação da
Cariogenidade de diferentes tipos de leite, utilizando
modelo experimental de cánceres animais",
sob a responsabilidade de PEDRO LUIZ BERALEN

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
04/05/2019. Este certificado expira em 04/05/2020.

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(s) Dr(a)

Presidente - CEEA/IB/UNICAMP

Campinas, 4 de 5 de 19.

Prof(s) Dr(a)

Secretaria - CEEA/IB/UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
RUA DAS ESTRELAS, 1512 - 13084-900
CAMPINAS - SP - BRASIL

TELEFONE: 3100-9100 FAX: 3100-9900