UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU
DISCIPLINA DE ODONTOPEDIATRIA

“Avaliação do efeito dos leites materno, de vaca e de cabra sobre a fermentação e síntese de polissacarídeos extracelulares na placa dentária humana - estudo *in vitro*”.

Marcelo Pires Prestes

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Odontologia, área de Odontopediatria.

(Edição Revisada)

BAURU
2003

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU
DISCIPLINA DE ODONTOPEDIATRIA

“Avaliação do efeito dos leites materno, de vaca e de cabra sobre a fermentação e síntese de polissacarídeos extracelulares na placa dentária humana - estudo *in vitro*”.

Marcelo Pires Prestes

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Odontologia, área de Odontopediatria.

(Edição Revisada)

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo de Oliveira Lima

BAURU
2003

P926a Prestes, Marcelo Pires

Avaliação do efeito dos leites materno, de vaca e de cabra sobre a fermentação e síntese de polissacarídeos extracelulares na placa dentária humana – estudo *in vitro* /

Marcelo Pires Prestes – Bauru, 2003.

148 p.: il.; 30,0 cm

Dissertação. (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Bauru. USP.

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo de Oliveira Lima

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura do autor:

Data:

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Bauru - USP, em reunião de 18 de agosto de 2002, como apresentado no Anexo 1.

Dados Curriculares

Marcelo Pires Prestes

FILIAÇÃO: Benedito Generozo Prestes Neto
Marly Pires Prestes

NATURALIDADE: Sorocaba/SP

NASCIMENTO: 30 de abril de 1969

1987 – 1991: Graduação em Odontologia / Universidade Estadual de Londrina

1996 – 1998: Especialização em Dentística Operatória / Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais – HRAC/USP

1998 – 2000: Especialização em Odontopediatria / Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais – HRAC/USP

2001 – 2003: Mestrado em Odontopediatria / Faculdade de Odontologia de Bauru/USP

Dedicatória

“Cada lágrima nos ensina uma verdade”

Ugo Foscolo

À minha mãe que um dia sonhou ser o dia de hoje possível.

Ao meu pai e meus irmãos, que após o sonho de minha mãe acabar
transformaram o dia de hoje em algo possível.

À Simone por me fazer acreditar que era possível o dia de hoje chegar.

À Amanda por estar aqui hoje e ver junto comigo que este dia chegou.

Agradecimentos

Agradeço a Ele, que me fez entender que, duas pegadas na areia realmente significam que tive que ser carregado.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Eduardo de Oliveira Lima, agradeço a forma como conduziu a minha orientação, sempre ameno e mostrando-me o caminho mais correto a seguir.

A Profa. Dra. Olinda Tarzia, pela boa vontade, pela prontidão a colaborar e pela paciência a sempre explicar, re-explicar, e explicar novamente quando foi preciso.

Aos amigos Sra. Rita de Cássia dos Santos Lopes e Sr. Alcides Bonora, pela compreensão, apoio e incentivo desde o começo.

À minha amiga Rose, por cuidar com todo carinho de minha filha quando eu mais precisei.

Aos meus amigos Alexandre, Heitor, Rogério, Glória e Andréia Anzai, por todos os momentos de alegria e descontração juntos.

Aos demais colegas de curso, por terem participado desta etapa tão importante na minha vida.

À Profa. Dra. Salete Moura Bonifácio da Silva, pela boa vontade demonstrada em participar e ajudar com seus conhecimentos sempre oportunos.

Aos professores do Departamento de Odontopediatria da FOB – USP, Prof. Dr. Aymar Pavarini, Prof. Dr. Bernardo Gonzalez Vono, Profa. Dra. Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado, Profa. Dra. Maria Francisca Thereza Borro Bijella e Prof. Dr. Ruy César Camargo Abdo, pelo convívio harmonioso e saudável.

Às funcionárias do Departamento de Odontopediatria, pela atenção, pelo auxílio e carinho dispensados.

Ao Prof. Dr. Mauro Granjeiro pela cessão do laboratório de Bioquímica Oral para realização deste trabalho.

Aos funcionários do laboratório de Bioquímica Oral pela colaboração durante a execução dos experimentos.

À Dra. Patrícia, cirurgiã-dentista do Consórcio Intermunicipal da Promoção Social que colaborou para a coleta de placa dentária.

Aos jovens e adolescentes que foram voluntários, participantes dessa pesquisa.

Aos funcionários da Biblioteca da FOB – USP, Cibele, César, Rita, entre outros e aos funcionários do xerox que sempre estiverem prontos a colaborar.

Aos funcionários da Pós-Graduação, em especial ao Aurélio, por sua imensa boa vontade.

Às mães anônimas do Berçário Leite e Amor, que forneceram de boa vontade seu leite para realização dos experimentos.

À Faculdade de Odontologia de Bauru – USP, na pessoa de sua diretora Profa. Dra. Maria Fidela de Lima Navarro e à Comissão de Pós-Graduação, representada pelo Prof. Dr. José Carlos Pereira, por terem me acolhido.

À Creche e Berçário Leite e Amor pelo carinho todo especial que foi dispensada à minha filha Amanda.

Aos inúmeros obstáculos que surgiram no decorrer destes dois anos e que serviram para incentivar-me a ir cada vez mais fortalecido ao encontro dos meus objetivos.

Enfim, a todos aqueles que de alguma maneira representam parte desta minha história.

MEUS SINCEROS AGRADECIMENTOS A TODOS VOCÊS.

Sumário

LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE SIGLAS.....	xii
RESUMO.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	06
2.1 - Placa Dentária	07
2.2 - Leite.....	29
3. PROPOSIÇÃO.....	65
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	67
4.1 - Coleta da Placa Dentária.....	68
4.2 – Preparo da Placa.....	69
4.2.1- Reagentes.....	69
4.2.2 - Tratamento da Placa.....	71
4.3. – Fermentação da Placa.....	73
4.3.1. – Reagentes.....	73
4.3.2. - Montagem da Bancada.....	76
4.3.3. – Preparo dos Sistemas.....	77
4.3.4. – Titulação.....	79
4.4. – Síntese de Polissacarídeos Extracelulares.....	84
4. 4.1. - Reagentes.....	84
4.4.2 – Montagem da Bancada.....	87
4.4.3. – Preparo dos Sistemas.....	89
4.5. – Dosagem de Carboidratos Totais.....	90
4.6 – Metodologia Estatística.....	94
5. RESULTADOS.....	95
5.1 - Fermentação.....	96
5.2 - Síntese de Polissacarídeos Extracelulares.....	104
6. DISCUSSÃO.....	107

7. CONCLUSÕES.....	120
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	122
ABSTRACT.....	139
ANEXOS.....	142

Lista de Figuras

- FIGURA 1** – Gráfico dos valores médios da fermentação real do controle (glicose 2,5%), dos diferentes tipos de leite e dos leites adoçados com glicose 2,5%.98
- FIGURA 2** – Gráfico da comparação das condições estudadas, fermentação real do leite somada a fermentação real da glicose 2,5% (controle), e do leite adoçado com glicose 2,5%.....101
- FIGURA 3** - Gráfico da comparação da inibição da fermentação apresentada pelos diferentes tipos de leite estudados.....103
- FIGURA 4** - Gráfico das comparação entre os diferentes tipos de leite para a síntese de polissacarídeos extracelulares. (μg de glicose oriunda de polissacarídeos totais hidrolisados).....106

Lista de Tabelas

TABELA 1 - Fermentação dos substratos testados (valores em µg/mL de NaOH)	96
TABELA 2 - Fermentação real expressa em µg/mL de NaOH	97
TABELA 3 - Fermentação real do leite somado a fermentação real do controle (glicose) (µg/mL de NaOH)	99
TABELA 4 - Análise de variância a 02 critérios para comparação dos diferentes tipos de leite e das condições testadas (leite adoçado com glicose 2,5%; leite somado com glicose 2,5%)	100
TABELA 5 - Teste de Tukey-Kramer para comparações múltiplas.....	102
TABELA 6 - Inibição da fermentação real dos leites testados quando adoçados com glicose 2,5%.....	103
TABELA 7 - Síntese de Polissacarídeos Extracelulares totais em µg de glicose.....	104
TABELA 8 - Análise de variância a 01 critério para comparação dos diferentes tipos de leite utilizados.....	105
TABELA 9 - Teste de Tukey-Kramer para comparações múltiplas.....	105

Lista de Siglas, Símbolos e Palavras de Língua Estrangeira

$\bar{x}$ = média

% = por cento

dp = desvio padrão

g = gramas

In situ (latim) = em sítio, no local (no caso, cavidade bucal)

In vitro (latim) = em laboratório

In natura (latim) = natural, natureza

In vivo (latim) = no ser humano

pH = potencial hidrogeniônico

KOH = hidróxido de potássio

L = litro

M = molar, molaridade

mL = mililitros

PE = polissacarídeos extracelular

mg = miligramas

p = nível de significância

pool = mistura

PM = peso molecular

rpm = rotações por minuto

μL = microlitro

NaOH = hidróxido de sódio

H_2SO_4 = ácido sulfúrico

N = normal, normalidade

nm = nanômetro

μg = micrograma

Resumo

Resumo

Na espécie humana, são usados vários leites, além daquele que lhe é próprio, tais como o leite de vaca e o leite de cabra dentre outros. Em meio a seus diversos componentes encontramos a lactose que é um dissacarídeo que se desdobra em glicose e galactose. A cárie dentária como uma doença multifatorial, necessita de um substrato cariogênico para o seu desenvolvimento além das bactérias presentes na placa dentária, que utilizam carboidratos da dieta para seu metabolismo. Tendo em vista a característica de alto consumo e os relatos clínicos nos quais é sugerida a participação do leite no desenvolvimento da cárie, este trabalho avaliou o efeito “in vitro” de três tipos de leite “in natura”; materno, de vaca e de cabra, sobre o metabolismo da placa dentária humana, com relação à capacidade de fermentação e síntese de polissacarídeos extracelulares. Por meio da coleta de placa dentária de 50 crianças e adolescentes entre 10 e 15 anos de idade, procedente de uma Instituição da cidade de Bauru, um “pool” de placa foi tratado em laboratório, e submetido a estudos bioquímicos específicos para fermentação e síntese de polissacarídeos extracelulares. Os resultados obtidos foram submetidos ao teste de Análise de Variância (ANOVA) a um e dois critérios com nível de significância de 5% e utilizou-se o teste de Tukey-Kramer para comparação entre os diferentes tipos de substratos. Concluiu-se com este estudo que, quando utilizados os leites testados, ocorre, “in vitro”, a fermentação e a síntese de polissacarídeos

extracelulares. O leite de cabra apresentou a menor fermentação seguido pelo leite bovino e depois o leite materno. Para a síntese de polissacarídeos o maior resultado foi obtido pelo leite de cabra, seguido pelo leite de vaca e pelo leite materno.

1. Introdução

Introdução

Numa investigação retrospectiva, nas páginas da história, verifica-se que desde os tempos do Egito antigo, na época do Papiro de Erbs, do Código de Hamurabi, do Talmud, dos famosos livros Vedas, da principal obra antiga chinesa escrita por Ching-Che-Chung-Ching, já se encontram referências às condições em que deve a criança pequena ser amamentada⁶².

O leite materno é o alimento ideal para as crianças no primeiro ano de vida, principalmente nos primeiros meses. A composição do leite humano muda significativamente durante o período de lactação como um mecanismo fisiológico do organismo da mãe. Por esse motivo, alguns trabalhos tentam esclarecer se a qualidade do leite pode ser afetada por fatores externos^{29, 62}. Porém, de maneira geral, o leite humano é um sistema nutricional e imunológico em particular, com adequados níveis de vitamina D e flúor, contendo também cálcio e fósforo necessários para a saúde bucal. A proporção de vitamina D presente no leite humano e sua relação com a nutrição materna são controversas⁵². Ainda que o leite materno possa ser pobre em fluoretos, bem como o leite de vaca, não sendo suficiente para substituir, por exemplo, a água fluoretada⁸³, o efeito do leite pode ser complementar ao efeito dos fluoretos⁸⁹, portanto, não há necessidade de suplementação de flúor durante o período neonatal⁵².

Encontra-se no leite, de maneira geral, a maior fonte dos principais elementos nutritivos essenciais. Na espécie humana são usados vários leites além daquele que lhe é próprio e, depois do leite de vaca, o leite não específico mais usado na alimentação humana é o leite de cabra. Os elementos básicos que integram qualquer leite são semelhantes qualitativamente variando a proporção encontrada no leite das diversas espécies de mamíferos. O leite de vaca, por exemplo, tem o quádruplo de teor de cálcio que o leite humano, e é também mais concentrado em protídios^{5, 20, 26, 52, 62, 76}.

Em sua composição, o leite é constituído principalmente por água, cerca de 86%. Há ainda uma mistura de várias substâncias: lactose e minerais em solução; proteínas em forma coloidal, estando a caseína dispersa e a albumina e globulina em solução; gorduras em forma de emulsão e dispersas no líquido e ainda vitaminas e gases em solução. A cor esbranquiçada do leite deve-se à caseína e aos fosfatos de cálcio nele presentes^{52, 62, 84}.

O leite materno possui uma maior porcentagem de lactose que o leite bovino, causando uma maior queda de pH que o anterior. Assim, pode ser considerado como um alimento potencialmente cariogênico devido à presença da lactose, um dissacarídeo composto de glicose e galactose, que quando fermentado, produz ácido láctico, podendo resultar em queda de pH abaixo de 5,5^{5, 6, 52, 64, 76, 89, 90}.

No entanto, de acordo com JENKINS; FERGUNSON³² (1966), alguns dos constituintes e propriedades do leite podem contar a favor das cáries e outros podem combatê-las. Os constituintes com potencial ação de proteção seriam o cálcio e fosfatos, o quais tendem a reduzir o efeito dos ácidos na dissolução do esmalte.

O leite em geral é considerado não cariogênico ou até mesmo anticariogênico apesar do fato da lactose ser fermentada pela placa dentária. No leite bovino a concentração de lactose é baixa (4%), ao passo que o leite materno contém 6-9%. Por outro lado o leite possui uma combinação de componentes anticariogênicos na forma imediatamente disponível: proteína (caseína), cálcio e fosfato, sendo que no leite materno essas concentrações são um pouco mais baixas que o leite bovino^{19, 82}. Lipídeos e proteínas do leite podem ser adsorvidas pelo esmalte, e assim contribuir contra a desmineralização^{32, 51, 90}. Por fim o conteúdo lipídico do leite pode ainda, alterar a estrutura da película adquirida.

Assim, a cárie dentária como uma enfermidade bacteriana multifatorial, para sua instalação necessita da interação de três fatores básicos: o hospedeiro, a microflora e o substrato, durante um certo tempo⁸⁸. As bactérias da placa dentária causadoras da cárie, utilizam os açúcares presentes na dieta para seu metabolismo. A glicosiltransferase, uma enzima presente nos estreptococos, age reunindo moléculas de glicose em um grande polímero, genericamente chamado de glucano. Um dos glucanos, o mutano, produzido pelos *Streptococos mutans*, resultante do metabolismo

da sacarose, é altamente insolúvel em água e adesivo^{7, 27}. Essas propriedades favorecem os fenômenos de adesão, aglutinação e colonização bacteriana. Alguns polissacarídeos extracelulares produzidos nesse processo metabólico também são importantes como fonte de energia, e podem ser utilizados como nutrientes para o metabolismo bacteriano.

O aleitamento materno exclusivo, até os seis meses, além de permitir um desenvolvimento facial harmônico, diminui a possibilidade de ingestão de alimentos contendo outro tipo de açúcar²³. No entanto, freqüentemente as crianças são retiradas do seio materno precocemente, e permanecem ingerindo leite por meio da mamadeira, aumentando assim a possibilidade de ingestão de alimentos contendo outros açúcares²³, que não somente a lactose.

É necessário compreender que o leite é um alimento completo, possuindo em sua composição tanto fatores cariogênicos como anticariogênicos. O desmame precoce ou mesmo o aleitamento com outros tipos de leite tem sido uma prática cada vez mais freqüente, bem como a adição de açúcares às mamadeiras. O efeito clínico disto, sobre os dentes decíduos, tem sido amplamente divulgado na literatura. Desse modo, o estudo da influência dessa associação no metabolismo da placa, bem como a ação exercida pelos diferentes tipos de leites utilizados na alimentação infantil, parece pertinente considerando o que foi exposto.

2. Revisão de Literatura

Revisão de Literatura

2.1. PLACA DENTÁRIA

A relação entre cárie dentária e a produção de ácidos pelas bactérias a partir de diferentes carboidratos e suspensão de placa foi estudado por FROSTELL²⁵ (1964), o qual demonstrou que há uma rápida produção de ácido a partir de glicose, sacarose, frutose, e maltose, e também em menor escala a partir de amido e lactose. Com o objetivo de determinar quantitativamente a produção de ácido em suspensões de placa, comparando com diferentes carboidratos, trabalhou com adultos que necessitavam de tratamento dentário, que suspenderam sua higienização por dois dias e, sem ingerir nada sólido ou líquido, realizaram um bochecho para remover resíduos alimentares e tiveram amostras de placa coletadas. As amostras foram suspensas em solução de Ringer ou água destilada, e armazenadas. Procedeu-se o tratamento com 3,0 mL de tampão fosfato 5 mM, 2,0 mL de solução de carboidrato com concentração variada, e 1,0 mL de suspensão de placa. Ao início do experimento o pH era de $6,9 \pm 0,2$, a produção de ácido foi acompanhada por aproximadamente uma hora, e após foi titulada utilizando-se NaOH 0,01 N. Com seus resultados o autor concluiu que os experimentos devem ser realizados em condições anaeróbias, uma vez que há esta condição na placa dentária. Deve ser conduzida em períodos curtos, pois a atividade da suspensão decresce gradativamente. A

diluição da placa dentária diminui a sua atividade com o aumento desta diluição. Por fim, o pH deve ser mantido constante, diminuindo a atividade da placa com a diminuição do pH.

LO; RUSSEL; TAYLOR³⁹ (1970) estudaram um método para determinar glicogênio em pequenas amostras de tecido muscular esquelético, após sua hidrólise ácida com H₂SO₄, medindo a glicose resultante. O método fenol-ácido sulfúrico com reação colorida para analisar açúcares descritos neste trabalho, é uma adaptação da técnica desenvolvida por DUBOIS et al.¹⁶ (1956), que também utilizaram para leitura em espectrofotômetro, uma absorbância de 490 nm de comprimento de onda. Concluíram que o método colorimétrico fenol-ácido sulfúrico é aplicável a todos carboidratos, e que as cores produzidas (amarelo-alaranjada) são estáveis e representam o pico definitivo de absorbância.

Para GIBBONS; van HOUTE²⁷ (1973), o melhor exemplo de adesão interbacteriana mediada pela síntese de polímeros bacterianos, concentra-se no *Streptococcus mutans*. Este organismo é associado com a atividade de cárie dentária em experimentos animais e no homem. Dados indicam que o potencial cariogênico do *Streptococcus mutans* está associado com sua habilidade de formar a placa dentária, que é dependente da síntese de polissacarídeos extracelulares a partir da sacarose. Este organismo sintetiza polissacarídeos, tais como glucanos e frutanos, especificamente a partir da

sacarose, mas não de outros açúcares comuns. Ainda que metabolizem outros açúcares, como glicose, para obtenção de energia tão prontamente quanto a sacarose, é aparente a dependência deste último, que sofre ação da glicosiltransferase que retira energia para conduzir essa síntese, quebrando a ligação entre este dissacarídeo, que resulta em glicose e frutose. Tem-se a formação de glucanos e frutanos, mas em particular, os glucanos são menos solúveis que os frutanos, e conseqüentemente permanecem por períodos mais prolongados misturados à placa.

Uma maior ingestão de carboidratos leva a um aumento da acidez e da síntese de polissacarídeos extracelulares. Dessa maneira são selecionadas bactérias acidogênicas e acidúricas, que aumentam o potencial de queda de pH, favorecendo a desmineralização. Assim, de acordo com van HOUTE⁸⁵ (1980), há uma relação direta entre dieta e composição bacteriológica da placa.

Em geral os dentes póstero-superiores e póstero-inferiores são mais susceptíveis ao ataque das cáries do que os anteriores, superiores ou inferiores. Tem-se demonstrado ainda que a placa dentária obtida dessas áreas é diferente quanto à composição microbiológica e pH. O objetivo do estudo realizado por ACEVEDO² (1984) foi investigar a relação entre a composição química e microbiológica da placa obtida destas regiões e sua susceptibilidade a cáries. Seus resultados demonstraram que a placa dos

dentes anteriores inferiores contém menos bactérias acidogênicas, e particularmente organismos não acidogênicos por unidade de peso do que os superiores. Também foi observado que esta placa continha uma menor concentração de polissacarídeos. De maneira geral os resultados obtidos para as áreas posteriores foram contrários aos apresentados pelos anteriores. A autora conclui neste trabalho que o menor potencial cariogênico da placa dentária presente nos dentes anteriores inferiores se deve, ao menos, a uma combinação de três fatores: menor produção de ácido, maior acesso a saliva e portanto, uma maior capacidade tampão, os quais permitem quedas mínimas de pH, que parecem não conduzir a uma desmineralização e favorecem a precipitação de sais de cálcio.

Para avaliar o efeito de algumas substâncias sobre a fermentação e síntese de polissacarídeos extracelulares insolúveis da placa dentária humana, ABREU¹ (1985) coletou semanalmente amostras de placa das superfícies lisas de dentes de crianças com idades entre 6 e 10 anos. Essas amostras eram pesadas e homogeneizadas, obtendo-se uma suspensão de placa (20 mg/mL), a qual era utilizada para cada frasco contendo as diferentes substâncias testadas e os controles. A avaliação do efeito inibidor das substâncias testadas sobre a fermentação da placa foi baseada no método descrito por FROSTELL²⁵ (1964) e a síntese de polissacarídeos extracelulares insolúveis, realizada pelo método descrito por LO et al³⁹ (1970). Todos os tratamentos com inibidores, em ambas concentrações,

apresentaram médias finais de fermentação menores que as do controle, assim como para a síntese de polissacarídeos extracelulares insolúveis. Concluindo dessa forma que, as substâncias nas concentrações testadas inibiram a fermentação e a síntese de polissacarídeos insolúveis da placa dentária.

Em seu artigo LOESCH⁴⁰ (1986) relata que o metabolismo da sacarose pelo *Streptococos mutans* é complexo, mas é sem dúvida o principal caminho para o metabolismo energético e resulta, quando a sacarose está em excesso, na produção de ácido láctico. Entretanto, antes da sacarose penetrar nas células, uma pequena porcentagem, menor que 10%, é transformada por uma variedade de hexotransferases em glucanos ou frutanos que se difundem no ambiente vizinho ou permanecem associados às células. Na presença de sacarose o *Streptococos mutans* forma colônias adesivas por ação de um homopolímero de glicose, o glucano, um rico polímero insolúvel em água. A hipótese da placa não específica atribui aos microrganismos da placa o papel da produção de ácido quando exposto aos carboidratos da dieta. Uma rápida queda de pH, indica que os carboidratos são rapidamente convertidos em ácidos, principalmente ácido láctico, persistindo em níveis abaixo de pH 5,0 por períodos de 20 a 50 minutos.

Estudando o efeito dos extratos de guaraná, Stévia Rabaudiana Bertoni e do Esteviosídeo sobre a fermentação e síntese de polissacarídeos extracelulares insolúveis da placa dentária, PINHEIRO et al.⁶⁶ (1987), coletaram placa de escolares de Bauru após bochecho para remoção de restos alimentares, utilizando curetas de dentina, pesaram-na e a homogeneizaram em tampão fosfato 0,01 M pH 6,8. Foram realizados testes de fermentação incubando este “pool” de placa tratado no seguinte sistema: tampão fosfato 0,01 M pH 6,8 (2,0 mL), solução de glicose 0,2 M (0,2 mL), água destilada + substância teste (2,8 mL) e suspensão de placa 10 mg/mL (1,0 mL), após incubação a 37°C por 90 minutos o sistema era titulado utilizando para dosagem de ácidos formados NaOH 0,01 N. O meio de incubação para a síntese de polissacarídeos insolúveis consistia de: tampão fosfato 0,1 M pH 5,8 (0,5 mL), sacarose 0,5 M (0,5 mL), água destilada + substância teste (0,6 mL) e placa dentária 10 mg/mL (1,0 mL). Após incubação por 18 horas a 37°C sofria centrifugação a 12.000 g por 30 minutos em centrífuga refrigerada, os sobrenadantes eram desprezados e o precipitado era tratado com KOH 1N e dosados os carboidratos totais pelo método de DUBOIS et al.¹⁶ (1956). Com os resultados obtidos concluíram que muitos produtos naturais, incluindo os três estudados, apresentam propriedades anticariogênicas e antiplaca que os indicam como auxiliares de medidas preventivas da cárie dentária.

MARTIN⁴⁶ (1988) avaliou o efeito do cloreto de cetilperidínio (Cepacol) sobre a formação “in situ” e metabolismo (fermentação e síntese de polissacarídeos extracelulares insolúveis – PEI) “in vitro” da placa dentária humana e o metabolismo (fermentação) da placa produzida “in vitro” pelo *Streptococos mutans*. Para os testes de formação e o metabolismo da placa dentária humana, 33 crianças realizaram bochechos supervisionados com 10 mL de Cepacol, na diluição 1:2, por 1 minuto, 3 vezes ao dia, durante 15 dias. Os procedimentos habituais de higiene bucal foram mantidos nos 12 primeiros dias. No 16º dia, a placa das crianças foi coletada e avaliada quanto à formação, por meio do peso, quanto à fermentação, segundo o sistema de FROSTELL²⁵ (1964) e quanto à síntese de PEI, pelo método de DUBOIS et al.¹⁶ (1956). Houve um grupo controle que realizou bochecho com placebo. Também pelos métodos acima testados, amostras de placa dentária de 19 crianças foram tratadas com Cepacol nas diluições 1:10 e 1:20, e avaliados quanto à fermentação e síntese. Com seus resultados, concluíram que a substância testada diminuiu a formação de placa dentária “in situ”, porém não estatisticamente, assim como a fermentação e síntese de polissacarídeos extracelulares. Porém, “in vitro”, houve diminuição da fermentação e síntese com todas as concentrações testadas.

Para determinar a composição do fluido de um “pool” de placa em jejum, MORENO; MARGOLIS⁵⁶ (1988), examinaram 4 grupos de 50

estudantes entre 18 e 22 anos, que suspenderam sua higienização por 36 horas e não fizeram ingestão de nenhum tipo de alimento ou bebida por pelo menos 1 hora antes da coleta. As amostras de placa obtidas foram misturadas em óleo mineral e centrifugadas a 37.000 g por 1 hora a 4º C. O sobrenadante, novamente combinado com óleo mineral, foi centrifugado a 5.000 g por mais 15 minutos. Dentre outros achados foram encontrados nas amostras analisadas, acetato, propionato, succinato, butirato, lactato e fomato, onde o acetato e o propionato destacam-se como os principais ácidos encontrados.

MARGOLIS; DUCKWORTH; MORENO⁴² (1988) estudaram a composição do fluido da placa dentária em jejum de 10 amostras de populações de acordo com a idade (8-11, 14-17 e 18-25 anos) e com relação ao estado de cárie (cáries-free - CF, CPO = 0; cáries-susceptíveis – CS, CPO >10). Todos indivíduos receberam profilaxia dentária uma semana antes da coleta, suspenderam a higienização por 48 horas e não ingeriram nenhum tipo de alimento ou bebida pelo menos por 1 hora antes da coleta das amostras. As amostras de cada grupo foram misturadas em óleo mineral e centrifugadas a 15.000 g por 45 minutos à temperatura ambiente. Os sobrenadantes foram analisados para ácidos orgânicos e inorgânicos, ânions, cátions e pH. Seus resultados demonstraram que o ácido acético e propiônico estavam predominantes, compreendendo mais de 75% dos ácidos nas condições de jejum estudadas. Encontraram ainda, ácidos

succínico, láctico, fórmico e butírico em baixas concentrações. Por fim, dentro de cada idade estudada, foram encontrados maiores valores para pH e NH_4^+ em indivíduos CF, porém sem significância estatística. Estes resultados, segundo os autores refletem diferenças metabólicas, assim como diferentes espécies bacterianas na placa dentária, as quais tornam-se evidentes na presença de fontes limitadas de energia.

MOROMI et al.⁵⁷ (1988), com o objetivo de estabelecer a frequência da presença de estreptococos cariogênicos grupo I (*Streptococos sanguis*) e grupo II (*Streptococos mutans*) na placa dentária e cárie dentária de um mesmo dente, obtiveram amostras de crianças entre 4 e 10 anos de idade com cáries ativas. A metodologia utilizada foi cultivar em Agar *Mitis salivarius* e fermentação em manitol, sorbitol, rafinose e sacarose a 5%. Processaram-se 20 amostras de placa e 20 de cárie. Tanto o grupo I quanto o grupo II, foram mais frequentes em placa dentária (60% e 85% respectivamente). Em cárie dentária os resultados encontrados foram 40% e 60% respectivamente. Concluíram dessa forma que, os estreptococos do grupo II estão mais presentes na placa dentária assim como na cárie.

PINHEIRO et al.⁶⁷ (1989) avaliaram o tempo de incubação, força iônica, pH e inibidores, em sua capacidade de influenciar a síntese “in vitro” de polissacarídeos insolúveis da placa dentária humana. O tempo de incubação que produziu maior quantidade de polissacarídeos insolúveis foi

aproximadamente 16 horas. A força iônica exerceu um efeito marcante sobre a síntese de polissacarídeos insolúveis. Uma inibição de 50% foi obtida com uma solução de NaCl 0,25 M. O pH ótimo obtido nesta experiência foi próximo de 6,8. Todos os inibidores avaliados (etanol 10%, clorexidina 0,1%, cloreto de cetilpiridínio 0,05% e iodo 0,1%) inibiram totalmente a síntese “in vitro” de polissacarídeos insolúveis da suspensão de placa. Concluindo assim que, os dados apresentados nesta investigação oferecem informações úteis para a melhoria de métodos empregados no controle de placa.

VILLAVICENCIO⁸⁷ (1989) estudando o efeito inibidor de substâncias contendo fluoreto de sódio a 0,05% e a influência do pré-tratamento com fluoreto estânico e fluoreto de sódio, sobre o metabolismo da placa dentária humana, coletou placa de crianças entre 7 e 12 anos, preparou esta placa em tampão fosfato 0,01 M pH 6,8, e realizou testes de fermentação e síntese de polissacarídeos extracelulares. Para fermentação utilizou 1,0 mL de tampão fosfato 0,01 M pH 6,8, 1,0 mL de suspensão de placa, 0,5 mL de glicose 2,5% e 2,5 mL das soluções fluoretadas. Após incubação a 37°C por 120 minutos, titulou-se com NaOH 0,01 N. Para a síntese de polissacarídeos extracelulares utilizou 0,5 mL de suspensão de placa, 0,1 mL de sacarose 1 M, 0,6 mL das soluções fluoretadas, incubou-as a 37°C por 18 horas, centrifugou-as a 10.000 rpm, desprezou os sobrenadantes, nova centrifugação e suspendeu o precipitado em KOH 1 N, realizando a dosagem de carboidratos totais pelo método de DUBOIS et al.¹⁶ (1956).

Concluindo que as substâncias testadas inibiram a fermentação e a síntese de polissacarídeos extracelulares da placa dentária.

Considerando-se que a composição do fluido da placa dentária é sensível aos processos de isolamento e estocagem, e que para avaliar o seu potencial cariogênico é necessário preservar as propriedades de ambos, o fluido da placa e a placa na sua totalidade em conjunto, MARGOLIS⁴³ (1990), conclui que, o uso de um “pool” de amostras de placa dentária obtido de indivíduos com diferentes experiências de cárie, resultam em uma composição de placa dentária e fluido da placa consistente com as diferenças observadas na susceptibilidade a cáries.

Para BARROS⁷ (1990) os carboidratos constituem as substâncias básicas para o fornecimento de energia e matriz intercelular às bactérias da placa, além de originarem a produção de ácidos e adesivos, que se traduzem em potencial cariogênico. Assim, o desenvolvimento da cárie dentária ocorre através das atividades bioquímicas das bactérias que compõem a placa dentária cariogênica. Essas reações são a produção de polissacarídeos extracelulares, polissacarídeos intracelulares e a formação de ácidos. Esses fenômenos metabólicos podem ser, didaticamente, classificados em extra e intracelulares. No plano extracelular tem-se ações prévias junto à mastigação e saliva e formação de polissacarídeos extracelulares pelas bactérias com ações de adesão, aglutinação e

colonização bacteriana. Neste processo a ação de uma enzima, a glicosiltransferase, utiliza a sacarose como substrato para a formação de glicano, um composto extracelular de alta adesividade. Além desta propriedade, os polissacarídeos extracelulares ainda funcionam como fonte de reserva de carboidratos para utilização celular e participam de mecanismos de difusão que ocorrem na placa e concentram elementos traço e minerais. As atividades intracelulares relacionadas resultam na formação de polissacarídeos intracelulares e ácidos. Essa fermentação resulta em queda de pH e desmineralização do esmalte. Dessa forma, essas atividades bioquímicas podem ser consideradas como o agente básico para o desenvolvimento da cárie dentária.

Para avaliar a eficácia de dentifrícios comerciais, ditos antiplaca, considerando-se como parâmetro a fermentação e a síntese de polissacarídeos extracelulares insolúveis pela placa dentária humana “in vitro”, BIJELLA et al.⁸ (1992) coletaram placa de crianças entre 7 e 11 anos residentes em Bauru após bochecho com água para remoção de detritos. A placa foi pesada e homogeneizada em tampão fosfato 0,01 M pH 6,8, na proporção 20 mg/mL, e a seguir foram tratadas com os dentifrícios testados. Para a avaliação da fermentação da placa tratada com os dentifrícios foi utilizado 0,5 mL de glicose 2,5%, 2,5 mL de água destilada, 1,0 mL de tampão fosfato 0,01 M pH 6,8 e 1,0 mL de placa previamente tratada, incubados a 37°C por 120 minutos e titulados com NaOH 0,01 N. Para a

síntese de polissacarídeos extracelulares utilizou-se 0,2 mL de sacarose 1 M, 0,25 mL de água destilada, 0,5 mL de tampão fosfato 0,5 M pH 6,5 e 0,5 mL de suspensão de placa tratada. Incubada a 37°C por 18 horas, sofreu centrifugação a 12.000 g por 15 minutos, e após desprezar o sobrenadante o precipitado foi tratado com KOH 1 N, retirando-se uma alíquota de 0,1 mL para dosagem de carboidratos totais pelo método de DUBOIS et al.¹⁶ (1956). Com os resultados obtidos os autores concluíram que dentifrícios comuns são suficientes para o controle mecânico da placa a um custo menor.

Para investigar a prevalência de estreptococos do grupo mutans e de *Lactobacilos* em crianças com presença e ausência de cáries rampantes, alimentadas com leite materno e sem outra forma de consumo abusivo de alimentação ou uso de mamadeiras, MATEE et al.⁴⁷ (1992), realizaram a contagem destes microrganismos e encontraram ser esta mais acentuada na placa e saliva de crianças portadoras de cáries rampantes, com prevalência de lactobacilos. No entanto, crianças livres de cáries também tiveram alta prevalência destas bactérias, e concluíram assim que, a amamentação materna permite a colonização e proliferação de estreptococos do grupo mutans e *Lactobacilos*, podendo levar a ocorrência de cárie rampante.

MARGOLIS et al.⁴⁴ (1993), estudando a composição do fluido de um pool de placa dentária de 05 amostras de populações, determinadas antes e após bochechos com 5 e 10% de sacarose em 3, 7 e 15 min., sem história

de cáries (caries-free CF) e com história positiva de cáries (CP), observaram que antes da exposição à sacarose todos os grupos tinham composição iônica semelhante. Após a exposição à sacarose, uma rápida queda de pH era observada, devido inicialmente à formação de ácido láctico. Para todos os tempos avaliados o grau de saturação do fluido da placa, em relação aos minerais dentários, assim como o pH foi menor, e a concentração de ácido láctico foi maior em indivíduos CP. A concentração de cálcio também aumentou significativamente em todas as amostras após a exposição à sacarose, apesar da menor produção de ácido láctico em CF, no entanto, pode não estar refletindo nada mais do que um achado, uma vez que a placa integralmente do grupo CF continha mais cálcio do que o grupo CP. Assim, a presença e disponibilidade de íons minerais, como o cálcio, na placa pode desempenhar um papel importante no controle da desmineralização do esmalte.

van HOUTE⁸⁶ (1994), estudando a relação dinâmica entre a placa dentária, microbiota, dieta rica em carboidratos, saliva e queda de pH, e o potencial cariogênico da placa dentária, defendia a evidência do conceito de cárie como uma doença infecto-bacteriana modificada por uma dieta rica em carboidratos. Sua principal característica é uma dieta ricamente induzida de carboidratos para uma microbiota da placa com organismos tais como os *Streptococos mutans* e os *Lactobacilos*, os quais causam um aumento na queda do pH da placa e do seu potencial cariogênico.

De acordo com THYLSTRUP; FEJERSKOV⁸² (1995), todos os açúcares comuns da dieta alimentar (sacarose, glicose, frutose e lactose) são utilizados no metabolismo de energia de muitas bactérias da placa. Tais carboidratos podem ser fermentados diretamente ou após o armazenamento na placa como polissacarídeos intra ou extracelulares. Esta fermentação, durante o metabolismo anaeróbico das bactérias, provoca um aumento na concentração de ácidos orgânicos, principalmente de ácido láctico, na placa e nas lesões cariosas. Assim se forem freqüentes ou de longa duração, o resultados final será uma lesão cariiosa.

Para WALTER; FERELLE; ISSAO⁸⁸ (1996), a placa dentária origina-se de uma matriz glicoprotéica na qual o componente bacteriano se fixa, coloniza e, quando cariogênico e organizado, pode se tornar a fonte geradora da cárie dentária. Os *Streptococos mutans* estão relacionados com as cáries ou lesões que ocorrem em pontos, cicatrículas e fissuras, como também nas de superfície lisa e nas de colo e de raiz, pela ação formativa de glucanos (dextran) que os habilita a aderir em qualquer superfície. Os *Lactobacilos* acidófilos são também geradores de ácidos e de polímeros tipo frutanos (levan) e são os responsáveis pela maioria das cáries de sulcos e fissuras.

FRAIZ²³ (1996) considera que, em bebês, a microbiota está sendo definida e a implantação de estreptococos do grupo mutans é facilitada pela

presença de sacarose na dieta, e diferentes níveis de consumo desta podem ser suficientes para alterar a contagem destes microrganismos. O consumo de sacarose freqüente garante aos estreptococos do grupo mutans, substrato para a produção de glicanos extracelulares e para diminuição do pH da placa dentária à um nível em que sua capacidade acidúrica represente uma significativa vantagem ecológica.

Um estudo realizado por KASHKET; YASKELL³⁴ (1997), por meio da suplementação de alimentos com lactato de cálcio, demonstrou que a adição de sais solúvel de cálcio poderia reduzir a desmineralização induzida pela sacarose. Este efeito poderia estar relacionado à habilidade dos alimentos manterem altos níveis de cálcio na placa durante o período de atividade da acidogênese.

Em seu artigo, STRAETEMANS; van LOVEREN⁸⁰ (1997) relatam que os *Streptococos mutans* são fatores importantes na etiologia da cárie dentária. Novos caminhos para o combate destas bactérias têm se tornado disponíveis com o desenvolvimento de técnicas utilizando a biologia molecular. Uma destas estratégias envolve a modificação genética do *Streptococos mutans* para desenvolver cepas mutantes menos cariogênicas, eliminando a produção de ácido e polissacarídeos intracelulares. Porém ainda não está claro se estes organismos modificados são capazes de substituir a microbiota estreptocócica normal. Anticorpos

contra proteínas envolvidas na aderência do *Streptococcus mutans* têm sido cultivados para imunização ativa. Também é possível cultivar anticorpos em leite ou soro bovino que, depois de isolados, são aplicados topicamente.

Para SLAVKIN⁷⁸ (1997) as bactérias têm uma notável capacidade de se ajustar às condições de fartura e miséria, adaptando-se a ambientes diversos. Entre as diferentes formas de adaptação estão as possibilidades de formar e manter biofilmes. Biofilme é a forma comunitária na qual as bactérias preferem viver, aderindo a superfície, no caso dentária, ou mesmo em peças protéticas. Em tal meio, há uma modificação em sua seqüência de genes que produzem uma camada grossa e pegajosa que dá a característica de “comunidade”. Esta camada dá proteção às bactérias, tornando-as protegidas de predadores e 500 vezes mais resistentes a antibióticos do que se tivessem livres no ambiente bucal. Esta resistência à antibióticos, antifúngicos e mesmo imunoglobulinas do hospedeiro é devida a dispersão que ocorre através dos complexos bactérias-polissacarídeos extracelulares produzidos por estes organismos e que dão suporte ao biofilme.

Para ISMAIL³¹ (1998), os hábitos dietéticos são formulados precocemente na vida, e a escolha da alimentação pela mãe é um poderoso fator determinante dos hábitos a serem desenvolvidos por seus filhos. Para prevenir o desenvolvimento de cáries precoces, mães, em áreas de alta

prevalência de cárie deveriam ser alvo de programas de saúde pré e pós-natal.

Em sua revisão SEERIG et al.⁷⁶ (1998), sugerem que no leite, uma vez que não é de tão alto risco para desenvolver cáries, devem existir fatores desencadeantes que provoquem um padrão de desmineralização. Assim, os carboidratos associados ao leite, achocolatados e cereais, influenciam no tipo, na quantidade de placa dentária e na composição da microbiota bucal. Certos carboidratos são utilizados pelas bactérias bucais, especialmente pelo *Streptococos mutans*, formando placa espessa e pegajosa que favorece a adesão de microrganismos ao dente.

Um estudo realizado por MATTOS-GRANER et al.⁴⁸ (1998) avaliou a associação entre a prevalência de cáries e variáveis clínicas (presença de placa visível na superfície vestibular de incisivos superiores), microbiológicas (níveis salivares de *Streptococos mutans*) e dietéticas em 142 crianças entre 1 e 2,5 anos de creches públicas da cidade de Piracicaba/SP. Um número significativo na prevalência de cáries foi notado entre elas com ou sem placa visível. *Streptococos mutans* foram notados em 80,3% das crianças estudadas, apresentando um número significativamente maior de cárie em crianças com níveis mais altos destes microrganismos. Crianças que não foram amamentadas ou que receberam amamentação materna até os 3 meses exibiram uma prevalência significativamente maior do que

aquelas que receberam alimentação materna por um longo período de tempo. Um número maior na prevalência de cárie foi observado em crianças que utilizaram mamadeiras contendo leite com sacarose e cereais quando comparadas com leite, com ou sem sacarose, sem cereais. Por fim crianças que começaram a alimentação salgada após os 7 meses demonstraram maior prevalência de cáries do que aquelas que iniciaram mais cedo. Demonstrando, dessa forma, que há uma associação entre os fatores estudados e a prevalência de cáries.

PATTO et al.⁶³ (1999) realizaram um estudo para comparar a produção de ácido por cepas de *Streptococcus mutans* isoladas de crianças livres de cáries e de crianças que apresentavam CPOD maior ou igual a 1,0. Coletou-se saliva de cada criança e a partir dela realizou-se a contagem de estreptococos do grupo mutans e a seguir o isolamento de *Streptococcus mutans*. Em 45 amostras de *Streptococcus mutans* isoladas nas crianças dos dois grupos, verificou-se a produção de ácidos pela fermentação da sacarose, após incubação pelo período de 24 horas a 37°C. Os resultados foram expressos em mM de ácido e os dados foram analisados estatisticamente, não apresentando diferença significativa para a produção de ácido pelas cepas de *Streptococcus mutans* isoladas dos dois grupos.

Para MARSH⁴⁵ (1999), a cárie dentária é a destruição localizada de tecidos dentários por ácidos, particularmente ácido láctico, produzidos através

da fermentação de carboidratos da dieta por bactérias de um complexo biofilme depositado sobre a superfície dentária, denominado de placa dentária, e que em um estágio mais avançado, envolve o colapso proteolítico da matriz de colágeno de tecidos mais profundos, como a dentina.

De acordo com JENSEN³³ (1999), a importância da dieta na produção de cáries tem sido reconhecida desde a antiguidade, como apontado por Aristóteles em seus escritos, “Porque figos, quando são tão macios e doces, produzem danos aos dentes? Talvez porque essa suavidade viscosa do figo resulte em pequenas partículas que aderem às gengivas e insinuam-se entre elas e entre os espaços dentários, onde podem facilmente causar processos de putrefação”. A dieta, dessa forma, era reconhecida já na antiguidade, como um primeiro elemento de prevenção a cáries.

Polissacarídeos extracelulares (PE) sintetizados por bactérias orais constituem um dos maiores fatores de virulência dessas bactérias. Os PE, sintetizados a partir da sacarose, facilitam a adesão e colonização das superfícies dentária por estas bactérias. Um estudo conduzido por STEINBERG; PORAN; SHAPIRA⁷⁹ (1999) testou, “in situ”, o efeito da produção de PE por *Streptococcus mutans* sobre a ação bactericida de neutrófilos, em humanos. Estes efeitos foram observados em bactérias pré-expostas a sacarose e bactérias não expostas a sacarose. Os resultados indicaram que a produção “in situ” de PE pelas bactérias, talvez seja o maior

fator de virulência dos *Streptococcus mutans*, capacitando estas bactérias presentes na placa dentária, após a exposição à sacarose, a esquivar-se dos efeitos nocivos dos neutrófilos humanos.

A infecção precoce por *Streptococcus mutans* tem sido associada com a alta atividade de cáries em crianças. Porém, nem sempre a colonização com esta bactéria conduz a atividade de cáries, sugerindo que outros fatores possam estar envolvidos em sua cariogenicidade. A virulência pode diferir em seu potencial para sintetizar glucanos a partir da sacarose. MATTOS-GRANER et al.⁴⁹ (2000), testaram a hipótese de que a atividade de cárie esteja associada a variações em fatores relacionado à virulência de cepas de *Streptococcus mutans*. Inicialmente, os níveis de *Streptococcus mutans* foram levantados por meio de lâminas obtidas da língua, e presença de placa visível nos incisivos superiores, que foi medida em 101 crianças entre 12 e 30 meses. As lesões de cárie foram diagnosticadas no início e após 1 ano. Os dados sobre a incidência de cárie foram usados para selecionar 10 crianças cáries-free e 9 cáries-ativas de um total de 20 estudadas em função dos *Streptococcus mutans* isolados. A síntese de glucanos insolúveis, pH final, e a aderência, sacarose-dependente, em superfícies de vidro foram medidas nestes *Streptococcus mutans* isolados. O sobrenadante da cultura concentrada foi separado em duplicata por meio de géis SDS-PAGE, os quais foram marcados para proteína ou encubados com 5% de sacarose. A intensidade das bandas para glucanos insolúveis

desenvolvidas em gel para 5% de sacarose, assim como as bandas correspondentes a marcação para proteínas (glicosiltransferase) foram medidas através de densiometria de varredura. Altos níveis de *Streptococcus mutans* foram associados a alta incidência de cáries. A presença de placa visível não foi relacionada a incidência de cáries. A intensidade das bandas para glucanos insolúveis foi positivamente relacionada com a incidência de cáries e com a habilidade do *Streptococcus mutans* em aderir às superfícies de vidro. A análise desses dados permitiu os autores sugerirem que a habilidade de sintetizar glucanos insolúveis é um importante fator de virulência no desenvolvimento de cáries pelo aumento da aderência dos *Streptococcus mutans* e do acúmulo de placa em crianças.

O antígeno protéico da superfície celular (PAC) e as glicosiltransferases (GTF) dos *Streptococcus mutans* são os maiores fatores destes organismos envolvidos na colonização bacteriana. MITOMA et al.⁵⁴ (2002), prepararam leite bovino contendo anticorpos contra uma fusão de sítios salivares de união do PAC e sítios de união da GTF-I. Por este estudo, examinaram o efeito do leite imunizado sobre a cariogenicidade do *Streptococcus mutans* em ratos, alimentando-os com este concentrado por 55 dias, uma vez por dia. Concluíram que o grupo que recebeu o leite teste apresentou significativamente menos desenvolvimento de cáries que o grupo controle.

2.2. LEITE

Em seu artigo, FASS²⁰ (1962) já chamava a atenção sobre o leite oferecido em mamadeira e sua provável relação com as cáries apresentadas por crianças. Com o poder de acalmá-las e ao mesmo tempo induzir ao sono, a mamadeira tornou-se a principal forma de alimentação da criança. Aliado a isto, o leite representa uma fonte de muitos nutrientes essenciais como minerais, vitaminas, gordura, proteína e carboidratos. Ainda que possua um pequeno conteúdo de carboidrato, a diminuição na salivação que ocorre durante o sono pode contribuir para a sua fermentação por microrganismos e originar a formação de ácidos ao longo do tempo em contato com os dentes. Assim a pequena quantidade de carboidratos presentes no leite pode gerar um efeito cariogênico.

Trabalhando com leite cru, pasteurizado integral e pasteurizado desnatado, WEISS; BIBBY⁸⁹ (1966), compararam o efeito do tratamento com produtos do leite na solubilidade do esmalte. Dessa forma, encontraram resultados que permitiram afirmar que o leite de vaca pode reduzir em 20%, ou mais, essa solubilidade. O leite reconstituído, integral ou desnatado, também oferece resultados similares. Encontrou-se a mesma queda de solubilidade para a nata ou soro, apresentando uma redução de solubilidade levemente maior que para os diferentes tipos de leite, e a manteiga, um produto do leite avaliado neste estudo, apresentou baixas ou inconsistentes

reduções. Os testes demonstraram ainda que, os agentes de proteção presentes no leite atuam rapidamente, não aumentam ao longo do tratamento e resistem ao enxágüe. A alta concentração de proteínas naturais presentes no leite, como a caseína, parece estar associada com a redução da solubilidade através da união da caseína ao esmalte. Concluindo dessa forma que as fosfoproteínas do leite são fortemente adsorvidas pelo esmalte “in vitro”, prevenindo a dissolução ácida.

JENKINS; FERGUNSON³² (1966) por meio de três experimentos utilizando leite bovino fresco, investigaram (1) as mudanças de pH em 4 mL de saliva estimulada encubada com 2 mL de leite ou 4% de lactose; (2) o efeito do leite na solubilidade do dente, estimando fósforo e cálcio, testando esmalte em pó e dentes em tampões (pH 5,0 ou 7,0) ou em saliva encubada com leite ou igual volume de 4% de solução de lactose; (3) e mediram as mudanças de pH “in vivo” em indivíduos sem higienização por três dias após utilizar por 30 segundos leite, 4% de lactose e 4% de glicose. Os resultados dos experimentos da encubação “in vitro” demonstraram que os valores do pH encontrados após 04 e 24 horas são, discretos, mas significativamente maiores para o leite do que para 4% de lactose. Os experimentos sobre a solubilidade do esmalte e do dente demonstraram que, apesar da formação de ácido, a quantidade de cálcio e fosfato dissolvidos apresentavam-se muito menor na presença de leite. A queda de pH na placa “in vivo”, após o bochecho com leite comparado com 4% de lactose e 4% de glicose,

demonstrou que a ação do leite foi insignificante comparado com o *baseline*, de maneira geral, o efeito da glicose foi maior que a lactose e da lactose maior que o leite. Dessa forma, a respeito da importância dos efeitos anticariogênicos do leite, concluíram ser pouco provável que este apresente um efeito local nos dentes favorecendo a formação de cáries.

Experimentos realizados por WEISS; BIBBY⁸⁰ (1966) demonstraram que o esmalte bovino, quando pré-tratado com caseína, pode apresentar uma maior redução na solubilidade ácida quando comparado com outros concentrados de proteínas do leite, no entanto, essas outras proteínas também produzem esse efeito. Demonstraram ainda que outros meios testados, entre eles a saliva, apresentaram-se menos efetivos sob este aspecto. Seus estudos também revelaram que a inclusão de proteínas nos tampões para descalcificação produzem igual ou maiores mudanças na dissolução do esmalte, e que o leite não interfere, mas suplementa a ação dos fluoretos na redução da solubilidade.

Realizando estudos para verificar o efeito dos açúcares contidos na dieta de ratos albinos e sua relação com cárie dentária, GREN; HARTLES²⁸ (1969) concluíram ser a sacarose aquele que apresenta o maior poder cariogênico comparado com a glicose. Este trabalho demonstrou ainda que, outros açúcares presentes na dieta como frutose, galactose, maltose e

lactose produzem efeitos menores, mas não significativamente diferente quando comparados com a glicose.

ORNELLAS; ORNELLAS⁶² (1970), relatam que o substituto do leite humano, habitualmente usado, é o leite de vaca, diferente em suas propriedades, comparado com aquele, pois destina-se à cria de outra espécie animal. O leite humano tem menos da metade de protídios e de sais minerais que o leite de vaca, tendo, por outro lado, mais glicídios, por exemplo. A diferença entre os leites é de ordem quantitativa e qualitativa.

Para avaliar o efeito de nove tipos de açúcares e açúcares álcoois em um teste intraoral de cariogenicidade, KOULOURIDES et al.³⁶ (1976), submeteram amostras de esmalte bovino a condições que estimulavam a cárie em humanos. Após uma semana de uso do dispositivo intraoral, por voluntários edentados ou parcialmente dentados, foi testada a microdureza das amostras. Cada açúcar testado foi comparado com um controle de sacarose, e não foi evidenciada diferença significativa entre glicose, frutose e rafinose em sua cariogenicidade. Lactose, manitol, melibiose e sorbitol foram significativamente menos cariogênicos que sacarose; xilose e xilitol não foram cariogênicos.

McDOUGALL⁵¹ (1977) estudou o efeito do leite na desmineralização do esmalte “in vitro”, utilizando tampão lactato pH 5,0 em 4 experimentos. No primeiro utilizou esmalte em pó dissolvido em leite com pH 6,2, 5,8, 5,4, 5,2 e 5,0, um grupo teste que era submetido a tampão lactato e leite, e o grupo controle somente ao tampão lactato, o qual promovia a desmineralização por 60 min. a 37° C. Os resultados demonstraram que o pH do leite não influencia na quantidade de esmalte perdido, tendo apresentado a aproximadamente a mesma quantidade de esmalte dissolvido no leite conforme a pH diminuiu de 6,2 para 5,0, ao passo que, o tampão lactato causava uma perda mineral marcante quando comparado ao leite. A encubação com pH menor que 5,0 fazia o leite coagular. No segundo experimento a superfície oclusal da coroa de dentes extraídos era exposta por 12 horas a 37° C ao tampão lactato e depois imersas em leite por 1 hora e medido o conteúdo de cálcio deste leite, este procedimento foi repetido por 3 vezes. Ocorria dessa forma, uma redução no conteúdo de cálcio do leite onde eram imersas as coroas desmineralizadas. Essa redução apresentava-se maior na primeira hora e tornava-se menor nas horas seguintes. Em todas as situações a perda de cálcio apresentada pelo leite, associada com a desmineralização das coroas, era muito maior comparada com o grupo controle não desmineralizado. Outro experimento foi realizado com as superfícies proximais, intactas, do dente. Uma superfície recebeu somente 50 períodos de desmineralização em lactato por 1 hora e foram lavados em água, a outra recebeu 50 períodos de desmineralização alternados com 50

períodos de tratamento com leite por 2 horas. O conteúdo de cálcio era estimado ao início e ao final das exposições. Para cada dente testado a desmineralização apresentada pelo tampão era maior do que a apresentada pelo tampão mais leite. Por fim, o último grupo de dentes teve suas superfícies proximais submetidas de um lado, por 48 horas, ao tampão lactato, e de outro além da utilização do tampão foram imersas, por 50 períodos de 1 hora, em leite. As alterações foram calculadas observando a birrefringência apresentada. Um valor maior da birrefringência negativa do esmalte exposto ao leite indicou um maior conteúdo mineral. Dessa forma concluiu que o leite pode contribuir para a remineralização do esmalte, “in vitro”.

RIPA⁷¹ (1978) escreveu em seu artigo que, o leite bovino e fórmulas lácteas contém lactose, um dissacarídeo composto de glicose e galactose que pode elevar a implantação de bactérias cariogênicas e originar cáries. No entanto, o leite provavelmente não é fator determinante para a instalação da doença cárie, pois sendo líquido é rapidamente removido da cavidade bucal, além de seu contato com os dentes ser mínimo. O leite bovino contém, ainda, substâncias que podem agir prevenindo a cárie dentária. O leite materno contém uma porcentagem maior de lactose do que o leite bovino ou fórmulas lácteas, porém o hábito de amamentar sob livre demanda, adormecer mamando e outros maus hábitos dietéticos são pré-requisitos para o aparecimento de cáries de mamadeira. De acordo com o

autor qual o modo alimentar, apesar de tudo, é mais natural e conduz ao bem estar do bebê do que a amamentação? E dessa forma conclui que, não devemos condenar tão apressadamente um dos principais alimentos tão necessário para o crescimento e desenvolvimento do ser humano.

Através da suplementação de uma dieta cariogênica com leite bovino pasteurizado, REYNOLDS; JOHNSON⁶⁹ (1981) reduziram substancialmente a incidência de cáries em ratos. Essa redução não estava associada ao menor consumo de dieta cariogênica e mais leite, nem tampouco com o fato dos animais apresentarem uma alteração significativa da composição bacteriana em sua placa dentária. Com os resultados obtidos os autores levantaram a hipótese de que o efeito anticariogênico do leite é atribuído diretamente à influência química sobre o processo carioso no ambiente bucal do rato.

AWAD; GLEISER⁶ (1984) em relato de caso clínico de cárie provocada pelo aleitamento materno, consideraram que, sendo a lactose o menos cariogênico dos açúcares e o único carboidrato contido no leite, este tipo de cárie seja provocado por uma interação de fatores como duração do contato do fluido com os dentes, microbiota e redução do fluxo salivar. Durante a amamentação, a passagem do leite pela boca é rápida, porém ao adormecer o número de deglutições diminui, assim como o fluxo salivar,

dessa forma permitindo que a substância fique em contato com os dentes na presença de microorganismos por um longo período de tempo.

Em seu artigo, EDGAR; DODDS¹⁷ (1985), relatam que um aspecto extremamente importante na pesquisa da cariogenicidade de substitutos do açúcar concentra-se em seu efeito na produção de ácidos e no pH da placa. Dessa forma, demonstram que a lactose (e galactose) estimulam uma queda menor no pH quando comparado com glicose ou sacarose. O leite também provoca uma queda menor de pH, provavelmente, pela ação tamponante de seu conteúdo protéico. O leite humano, com maior concentração de lactose, é um pouco mais acidogênico que o leite bovino, mas pouco provavelmente será cariogênico, exceto em raras circunstâncias quando o uso da livre-demanda é permitido.

Analisando, “in vitro”, o potencial cariogênico do leite humano, bovino, soluções de lactose e sacarose, por meio da dissolução do esmalte, RUGG-GUNN; ROBERTS; WRIGHT⁷⁴ (1985) encontraram em seus resultados maior queda de pH para o leite humano, assim como maior dissolução do esmalte, quando comparado ao leite bovino, provavelmente por possuir maior conteúdo de lactose. O leite humano, em compensação, apresenta menor quantidade de cálcio, fósforo e proteína. Ainda assim, os resultados foram melhores que os apresentados pela lactose e sacarose.

MAZZEO et al.⁵⁰ (1985), avaliando o efeito anticariogênico do cacau e do leite em ratos, concluíram que tanto o cacau como o leite possuem atividade anticariogênica, sendo que o cacau foi eficaz em reduzir os escores de cárie de esmalte e dentina ao passo que o leite reduziu apenas os escores de cárie em esmalte.

Cáries precoces na dentição decídua são geralmente causadas devido ao mau uso de alimentos infantis, principalmente na forma líquida. SCHIMIDT; SCHLAF⁷⁵ (1990) realizaram um estudo com o objetivo de analisar o potencial cariogênico de alimentos infantis comercializados comparando-os com leite materno e bovino. A cariogenicidade foi avaliada através da queda do pH na placa dentária humana em um simulador que reproduzia as condições da cavidade bucal. A produção de ácido resultante dos alimentos infantis testados foi significativamente maior do que quando utilizado leite bovino ou materno. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os produtos testados com diferentes conteúdos de lactose. Por fim, o leite de vaca apresentou a menor queda de pH, mesmo quando comparado com leite materno.

Para verificar o efeito do leite materno como fator anticariogênico OLIVEIRA et al.⁶¹ (1990) avaliaram a história de 88 mães, cujos filhos receberam aleitamento materno até os seis meses de vida. 32 foram descartadas e nas 56 restantes, os resultados demonstraram 12 crianças

apresentando lesões incipientes e 44 isentas de lesões. Concluíram neste trabalho dentre outras coisas que, referente a dentes, o aleitamento materno se constitui como fator preventivo, diminuindo a incidência de cáries em dentes decíduos e, conseqüentemente, permanentes.

Estudando os efeitos da remineralização através da saliva secretada e do leite de vaca, “in situ”, após a desmineralização por bebidas ácidas (Coca-cola), GEDALIA et al.²⁶ (1991), avaliaram 14 voluntários usando aparelhos ortodônticos removíveis com uma placa de esmalte em seu interior. A ação desmineralizante foi observada pela exposição durante uma hora à bebidas ácidas. O grau de des-remineralização era expresso pelo aumento ou diminuição da microdureza e pela observação por microscopia eletrônica de varredura. Foi observada a microdureza imediatamente antes de utilizar o aparelho, após deglutir cerca de 400 mL de Coca-cola em porções indefinidas por uma hora, e após a exposição de maneira similar da mesma quantidade de leite bovino ou a exposição do fluxo salivar contínuo por uma hora. Os resultados demonstraram evidências dos efeitos de remineralização pelo aumento da microdureza após o uso do leite ou saliva, não apresentando diferença estatisticamente significativa entre o esmalte intacto e ao final do experimento, e com as melhores performances para o leite. Morfologicamente, menores centros de erosão estavam evidenciados após a exposição ao leite ou saliva.

Com o objetivo de testar se leite bovino contendo anticorpos para *Streptococos mutans* poderia afetar a microbiota autóctone, FILLER et al.²¹ (1991) realizaram experimentos usando bochechos com leite bovino com anticorpos para *Streptococos mutans* em 19 voluntários, e encontraram uma redução no número destes microrganismos em um grupo de 9 indivíduos (grupo teste). Dez voluntários (grupo controle) que utilizaram leite bovino sem atividade contra *Streptococos mutans* tiveram níveis variáveis deste microrganismo em sua placa dentária. Completando este estudo, após cultura em ágar Gold e *Mitis Salivarius*, os *Streptococos mutans* de indivíduos após utilizarem o leite bovino imunizado formaram colônias menores do que aqueles pré-tratamento e de todos os indivíduos que utilizaram bochecho controle.

ANNÁN et al.³ (1991) procuraram estabelecer se a ingestão de leite sem adição de açúcar, administrado antes de dormir e depois de realizada a escovação, atuaria inibindo os estreptococos de crianças. Trabalhando com 12 crianças de ambos os sexos, com idade entre 3 e 11 anos, dividiu-os em dois grupos: um grupo teste que ingeriu um copo médio de leite bovino pasteurizado e um grupo controle que nada ingeriu após as cinco da tarde. Foi realizada uma coleta de placa à noite após a ceia e escovação dentária. Na manhã seguinte, antes da higiene e previamente ao desjejum, novas amostras foram obtidas em ambos os grupos, isto durante 15 dias. Ao final deste período se repetiu o controle microbiológico e os resultados

demonstraram que, os pacientes que ingeriram leite, ao final de 15 dias exibiam uma diminuição no número total de microrganismos na porcentagem de estreptococos. Nos pacientes controle, o número de microrganismos estava aumentado nas amostras retiradas pela manhã e a porcentagem de estreptococos se manteve constante.

Trabalhando com ratos dessalivados BOWEN et al.¹¹ (1991), determinaram a cariogenicidade do leite bovino com 2% de gordura e do leite com lactose reduzida, comparando-os com soluções de sacarose e lactose a 4% e avaliaram o índice de cárie e a microbiota bucal dos animais. Mesmo com a dessalivação, condição altamente susceptível ao desenvolvimento de cáries, os grupos que receberam leite e leite com lactose reduzida praticamente não desenvolveram cáries. Os grupos que ingeriram carboidratos apresentaram maiores colonizações de *Streptococcus sobrinus*. Segundo os autores, os efeitos antibacterianos podem ser percebidos por este experimento, pois mesmo contendo naturalmente 4% de lactose em seu conteúdo, quando comparado com lactose a 4%, foi observado uma redução no número de microrganismos. Algumas das substâncias antibacterianas que, segundo a conclusão dos autores, podem estar envolvidas neste processo de proteção são a lactoperoxidase, a lactoferrina e lisozimas.

Com o objetivo de estabelecer se o leite possui propriedades cariostáticas, BOWEN; PEARSON¹² (1993), examinaram o efeito do leite comum, leite com lactose reduzida e soluções de lactose 4%, sacarose 10%, frutose 10% e água destilada em ratos com dieta cariogênica. Com os resultados apresentados por este trabalho, no qual os maiores índices de cáries foram apresentados pelos animais que receberam sacarose e frutose, os autores concluíram que leite e leite com baixo teor de lactose não são cariogênicos. Neste mesmo trabalho, em um segundo experimento, foram comparados leite comum com 2% de gordura, leite com diversas concentrações de sacarose (2%, 5% e 10%) e água destilada. Este outro teste objetivou determinar se o leite, quando adicionada sacarose, apresentava atividades cariostáticas, e os resultados encontrados demonstraram que 10% de sacarose resultou no maior índice de cárie encontrado. Os resultados demonstraram ainda que, a adição de sacarose ao leite provoca maior atividade de cárie comparada ao leite puro, porém sacarose em leite é menos cariogênica que em água. Dessa forma, concluíram que o leite deve exercer um efeito protetor contra a sacarose quando ingerido concomitantemente a esta.

BIRKHED; IMFELD; EDWARDSSON⁹ (1993) para avaliar mudanças ocorridas no pH da placa dentária humana realizaram uma série de experimentos. Primeiro mediram o pH de amostras de 12 indivíduos antes e após 6 semanas de bochecho diário com 10% de lactose. A queda do pH foi

mais marcante após o período de adaptação do que anteriormente. De acordo com um segundo experimento, similar ao anterior em 10 indivíduos, bochechos diários com leite bovino desnatado resultaram em uma queda de pH mais pronunciada após um período de adaptação de 4 semanas. Bochechos simples, sem nenhum período de adaptação foram realizados com leite bovino integral, leite materno, leite bovino lactose-hidrolisado, 5% de lactose e 5% de sacarose, e com respeito ao efeito do pH na placa foram comparados. Todas as soluções resultaram em queda de pH, sendo que a mais pronunciada foi a apresentada pela sacarose, seguida pelo leite bovino lactose-hidrolisado. A quebra da lactose origina um conteúdo de 2% de glicose. Por fim, leite bovino integral, 5% lactose e 10% de sacarose foram comparadas após um simples bochecho em 5 indivíduos usando um pHmetro interdental. Lactose e leite fermentaram mais vagarosamente que a sacarose. Em um estudo separado, a produção de ácido a partir da lactose também foi medida em duas cepas orais de cada microrganismo, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius* e *Streptococcus sanguis*. Os resultados indicaram que, pelo menos parte da lactose transportada e catabolizada por todas as cepas estudadas, parece ser regulada por enzimas induzíveis. Assim o potencial cariogênico do leite sob condições normais é de importância clínica reduzida, entretanto em condições adversas, como por exemplo, quando os fatores salivares de defesa não são ideais, a situação pode ser diferente.

MILLER et al.⁵³ (1994), estudaram os efeitos produzidos na composição do leite de ovelhas quando estas ingeriam dietas ricas e deficientes em cálcio, dos 7 aos 42 dias pós-natal. Os resultados demonstraram que a regulação fisiológica de cálcio é tão efetiva que as alterações da dieta têm efeito mínimo em suas concentrações e nas proteínas do leite. No entanto, dietas deficientes em cálcio podem aumentar as concentrações de lactose em sua secreção.

O leite de cabra tem sido utilizado com muita frequência no tratamento de crianças com alergia ao leite de vaca. BORGES¹⁰ (1995) demonstra as semelhanças entre esses leites e relata a ausência de respaldo científico para a utilização do leite de cabra nessas crianças.

VACCA-SMITH; BOWEN⁸⁴ (1995), demonstraram “in vitro” que a caseína do leite reduz a adsorção e atividade da enzima glicosiltransferase (GTF), produzida pelos estreptococos, sobre a hidroxiapatita revestida por saliva (película salivar). A atividade da GTF sobre a superfície dentária pode sofrer a influência de componentes da dieta como carboidratos, lipídios e proteínas, que são incorporados à película adquirida. A kappa-caseína e o leite bovino são exemplos desses componentes, pois, segundo este estudo, foram capazes de reduzir a adsorção de GTF sobre a hidroxiapatita resultando numa menor produção de glucano. Toda caseína do leite bovino comportou-se como um potente inibidor da adesão dos *Streptococos*

sanguis e *sobrinus* sobre a hidroxiapatita, quando comparadas a outras proteínas, ainda que não tenha interferido na fixação do *Actinomyces viscosus*. A caseína mostrou-se ainda capaz de atacar a superfície das células bacterianas. Com estes resultados os autores concluem que a caseína tem efeito inibitório dos estreptococos orais, interagindo com a superfície da bactéria e está envolvida nos mecanismos de adesão.

Com o propósito de investigar o potencial cariogênico do leite bovino “in situ”, trabalhando com blocos de esmalte humano contidos em aparelhos intraorais utilizados por dez voluntários CARBONEL et al.¹⁵ (1995), utilizaram leite bovino e leite contendo sacarose em uma frequência de oito vezes por dia. Durante todo o período experimental foi utilizado pelos voluntários, creme dental fluoretado sem restrição, no entanto, este não foi utilizado nos blocos de esmalte estudados. Com os resultados apresentados, nos quais se observou diferença estatisticamente significativa entre o leite e leite adoçado com sacarose, e devido às condições cariogênicas características deste trabalho, os autores concluíram que o leite não apresenta cariogenicidade e que o uso de açúcar pode anular seu efeito cariostático.

ARAÚJO et al.⁴ (1995), para avaliar o potencial cariogênico do leite humano “in situ”, aplicaram em quatro blocos de esmalte de terceiros molares extraídos, contidos em resina acrílica, leite humano e solução de

sacarose 20%, oito vezes por dia, durante 35 dias. Durante todo o experimento, um estudo cruzado de duas fases, os oitos voluntários utilizaram dentífrico fluoretado livremente, porém não foi escovado o aparelho intraoral contendo os blocos de esmalte. Foram analisados, por meio da placa coletada, níveis de fósforo, polissacarídeos, *Streptococos mutans* e *Lactobacilos*. Os resultados demonstraram diferenças estatisticamente significantes de polissacarídeos na placa e dureza do esmalte entre os tratamentos, permitindo concluir que o leite humano não é cariogênico.

Para MALTZ⁴¹ (1996) o leite e o queijo são considerados alimentos anticariogênicos. Foi sugerido que o queijo e o leite reduzem o nível de bactérias cariogênicas. O conteúdo de cálcio e fosfato desses produtos pode influenciar em seu mecanismo anticariogênico. Outro componente alimentar que parece ter efeito anticariogênico é a gordura. Não se sabe ao certo qual o mecanismo que produz esse efeito, mas parece ser devido à aderência da gordura à superfície bacteriana, modificando suas propriedades e dificultando a adesão das bactérias ao dente, e também ao reagir com carboidratos, torna-os menos acessíveis à metabolização pelas bactérias.

Polímeros de glicose estão sendo largamente utilizados como suplemento energético na prática dietética e têm aumentado seu uso comercial em produtos como fórmulas e alimentos infantis. Informações

sobre o efeito destes polímeros são escassas, sendo necessário uma regulamentação sobre como estes carboidratos devem ser incorporados à dieta com relação ao risco de cáries. MOYNIHAN et al.⁵⁸ (1996) realizaram um estudo utilizando 10% de polímeros de glicose a 10% em água, leite bovino e em uma fórmula infantil substituta do leite (Calogen), com o objetivo de investigar se essas soluções diminuíam o pH da placa e causavam desmineralização do esmalte. Como controle utilizaram a sacarose e os resultados obtidos demonstraram que os polímeros de glicose causam queda de pH, no entanto, em menor extensão que a sacarose. Quando administrados em água, leite ou fórmula têm o mesmo comportamento acidogênico, concluindo assim que polímeros de glicose e seus produtos têm o mesmo potencial cariogênico que outros açúcares extrínsecos que não a lactose.

PETTI; SIMONETTI; SIMONETTI D'ARCA⁶⁵ (1997) estudaram o efeito do leite sobre cáries em amostras de escolares entre 6 a 11 anos de idade. A quantidade diária e a frequência do consumo de alimentos contendo sacarose foi obtida por intermédio de um diário alimentar de 24 horas. Na seqüência foram anotados dados sobre o exame bucal, nível visível de placa e número de dentes decíduos e permanentes cariados, extraídos e obturados. Foram selecionadas 439 crianças que possuíam uma péssima higiene bucal e não faziam uso de fluoretos. Divididos em três grupos de acordo com a frequência do consumo de sacarose, todos

consumiram uma média diária de 209 ± 133 ml de leite indistintamente. A saúde dentária das crianças com baixa frequência de sacarose estava significativamente melhor do que aquelas com alta frequência. Os resultados, de toda amostra, evidenciaram uma frágil, porém significativa associação negativa entre consumo de leite e cáries. Esta associação esteve mais nítida no grupo de alto consumo de sacarose, ao passo que no grupo moderado e baixo consumo não houve associação estatisticamente significativa. Segundo os autores, estes dados sugerem que na ausência de fluoretos e com higiene bucal péssima, o leite tem efeito preventivo em grupo com alta ingestão de sacarose.

Com o objetivo de determinar o potencial cariogênico de fórmulas infantis comumente usadas na alimentação infantil, BOWEN et al.¹³ (1997) usaram ratos dessalivados e compararam o efeito destas com solução de sacarose 5%, água destilada e leite com 2% de gordura. Encontraram que várias destas fórmulas apresentaram significativo potencial cariogênico. De todos os produtos examinados a sacarose foi o substrato que apresentou os piores resultados com alta destruição dentária, e o leite a melhor performance, com as fórmulas testadas sendo classificadas em baixa, moderada e alta capacidade de induzir cáries. Pequenas diferenças foram detectadas entre os grupos no que diz respeito à quantidade de microrganismos da microbiota, com exceção do leite que apresentou significativamente as menores populações. Os resultados evidenciaram que

a cariogenicidade destes produtos deve ser avaliada não somente pelo conteúdo de carboidratos, mas também pelos seus outros componentes, como cálcio, fósforo, ferro e peptídeos, inclusive o baixo teor ferro, nos leites testados, pode estar relacionado a alta cariogenicidade. Concluíram, por meio destes resultados que, o leite ou a lactose são não cariogênicos ou promovem o desenvolvimento da cárie de maneira discreta, e que algumas fórmulas infantis, apesar de demonstrar algum potencial cariogênico, são menos nocivas que a sacarose.

Com o objetivo de comparar o potencial cariogênico do leite bovino puro e do leite bovino adoçado com 10% de sacarose, ARAÚJO et al.⁵ (1998) utilizaram um modelo experimental com 10 voluntários entre 20 e 25 anos. Os resultados encontrados quando da adição de sacarose foram uma placa bacteriana com coloração amarelo-clara, opaca, textura granulosa e densa e com um maior volume, ao passo que o tratamento com leite puro apresentou uma placa amarelo-brilhante, textura pastosa e de menor volume. O uso de sacarose causou a formação de manchas brancas na superfície do esmalte estudado, enquanto o uso de leite somente não evidenciou tão nitidamente estas manchas brancas. Com os resultados clínicos obtidos os autores concluíram que o leite bovino isolado não demonstrou potencial desmineralizador e que a adição de açúcar promoveu um efeito cariogênico.

Segundo a revisão de BOYDE; DWYER¹⁴ (1998), laticínios como queijos e leites, reduzem a desmineralização dentária e auxiliam no tamponamento dos ácidos produzidos pelas bactérias, talvez devido ao conteúdo de proteínas (caseína) ou de cálcio e fosfato, constituindo-se assim em alimentos anticariogênicos.

KOPARAL; ERONAT; ERONAT³⁵ (1998), em um estudo no qual foi medido o pH da placa dentária, “in vivo”, em crianças entre 08 e 12 anos, após o consumo de lanches e bebidas, através do método de uso do eletrodo de microtoque, sugeriram a ordem crescente de cariogenicidade para os seguintes alimentos: Coca diet < **leite** < banana < batata < batata chips < biscoitos < coca cola < pão < chocolate ao leite, solução de sacarose 10%. Neste estudo foi utilizado um leite desnatado (Pinar Süt), com um pH de 6,77 e concentração total de carboidratos de 4,7%, de acordo com sua embalagem. Dessa forma, o leite pouco diminuiu o pH na placa dentária, e ainda que tenha ocorrido uma queda de pH após seu consumo, esta não foi inferior a 6,00 em nenhum indivíduo, apresentando-se com um baixo potencial acidogênico.

Os fosfopeptídeos da caseína (CPP) são produzidos a partir da digestão triptica (tripsina) da proteína do leite caseína pela agregação com fosfato de cálcio. Para REYNOLDS⁷⁰ (1998), os CPP têm uma notável habilidade de estabilizar o fosfato de cálcio em solução e substancialmente

incrementar o nível de fosfato de cálcio na placa dentária. Os CPP unem-se para formar agrupamentos de fosfato de cálcio amorfo (ACP), os quais localizam-se na placa dentária e fazem o tamponamento da atividade iônica do íons cálcio e fosfato livres, desse modo auxiliam a manter o estado de supersaturação com a diminuição da desmineralização do esmalte e um aumento na sua remineralização. Os CPP-ACP, ao contrário dos fluoretos, podem ser adicionados aos alimentos contendo açúcar e, portanto, têm potencial comercial como aditivo alimentar bem como seu uso em colutórios e cremes dentais para o controle da cárie dentária.

Com o objetivo de determinar se o leite materno é mais cariogênico que o leite de vaca ou que fórmulas lácteas, RODRÍGUEZ RODRIGUEZ; PIMENTEL H.⁷² (1998) em sua revisão sobre leite materno reportam que do ponto de vista bioquímico o leite materno é uma solução que contém proteínas, lactose, minerais e vitaminas hidrossolúveis, mas também é uma emulsão uma vez que contém gorduras e vitaminas lipossolúveis. Constituído por monossacarídeos, glicose e galactose, por influências hormonais (insulina, cortisona, estrógenos, etc.) é secretado pelas glândulas mamárias a partir das últimas semanas de gravidez. Recebe influências da dieta da mãe, mudanças fisiológicas ocorrem durante o período de amamentação e exerce influência sobre o comportamento do esmalte dentário. As autoras concluem que a capacidade do leite humano aumentar a cariogenicidade da saliva e da placa não é estatisticamente significativa

comparada com leite bovino. O esmalte se dissolve mais em leite humano que em leite bovino sempre que se permita mais de 08 horas de contato entre eles. A dieta da mãe dificilmente produz aumento no potencial acidogênico do leite que segrega. E por fim, os hábitos nocivos são a principal causa de cárie na dentição decídua.

Streptococos mutans são os primeiros microrganismos envolvidos na cárie precoce da infância. Os fatores que podem influenciar em seu aparecimento na boca de crianças pequenas não são completamente conhecidos. Um estudo realizado por MOHAN et al.⁵⁵ (1998), entre outros aspectos, investigou a relação entre o uso e o conteúdo de mamadeiras com respeito à colonização de *Streptococos mutans* em 122 crianças de 6 a 24 meses. Foi encontrado o microrganismo em mais de um terço das crianças estudadas. A colonização por esta bactéria estava mais passível de apresentar incrementos, tanto em idade quanto em número de dentes, naquelas crianças que utilizavam bebidas adocicadas quando comparadas com aquelas que utilizavam somente leite. Estatisticamente as bebidas adocicadas quadruplicavam a colonização de *Streptococos mutans* comparadas com leite. Concluíram dessa forma que, bebês que consomem leite têm menores colonizações de *Streptococos mutans* do que aquelas que utilizam bebidas adocicadas em suas mamadeiras.

A cárie de mamadeira afeta cerca de 6% das crianças abaixo do 3 anos de idade e está associada com o mau uso da mamadeira. O objetivo do estudo realizado por ERICKSON et al.¹⁸ (1998) foi estimar o risco de cáries relacionado com 26 fórmulas infantis e leite integral. Inicialmente o pH da placa de adultos voluntários foi monitorado antes e depois de bochecho com fórmulas infantis para determinar o pH mínimo obtido em resposta a cada fórmula. Após este procedimento, *Streptococcus sobrinus* 6715 foram cultivados em cada fórmula, e o aumento no número de unidades formadoras de colônia foi medido. Em seguida cada fórmula foi encubada com esmalte em pó e a solubilidade do esmalte foi calculada na ausência de bactérias. Cada fórmula foi ainda misturada a concentrações padronizadas de ácido para determinar sua capacidade tampão. E por fim, por meio de uma janela em molares permanentes extraídos e incisivos decíduos esfoliados, colonizou-se *Streptococcus mutans* e encubou-se com cada fórmula infantil. O desenvolvimento de cáries foi acompanhado visual e radiograficamente por 18 semanas e o tempo necessário para o desenvolvimento de cáries de esmalte, dentina e para o envolvimento pulpar foi registrado. Os testes estatísticos destes cinco experimentos demonstraram que o pH da placa variou na resposta ao bochecho com fórmulas infantis e a maioria destas não tinha capacidade para reduzir significativamente o pH comparado com a redução quando utilizada água. Algumas fórmulas infantis demonstraram significativo crescimento bacteriano. Apenas algumas determinadas fórmulas causaram dissolução do

esmalte por encubação. Houve uma variável capacidade tampão entre as fórmulas testadas e o tempo necessário para que as cáries atingissem a dentina ou polpa diferiram entre os produtos utilizados, com alguns causando cáries dentinária entre 3,4 semanas e envolvimento pulpar por volta de 7,2 semanas.

FISBERG et al.²² (1999) procederam a um estudo sobre a aceitação e tolerância do leite de cabra em pré-escolares de três creches municipais da cidade de São Paulo, concluindo tratar-se de excelente opção para substituição do leite de vaca após o primeiro ano de vida. Foram analisados o leite de cabra em pó e na forma UHT, enriquecido com ferro e vitaminas, visando o controle da anemia, muito freqüente nessas crianças. Não houve registro de alergia ou intolerância no decorrer do estudo e, em crianças normais, o uso do leite de cabra favoreceu a ingestão láctea e, assim, de cálcio.

Em seu livro que aborda a respeito da composição química dos alimentos, FRANCO²⁴ (1999), estabelece esta composição para cada 100 gramas dos leites de cabra, humano e bovino de acordo com os valores a seguir:

	CABRA	HUMANO	BOVINO
Calorias	92	66,3	63
Glicídios (g)	5,2	6,83	5
Proteínas (g)	4,3	1,58	3,1
Lipídeos (g)	6	3,6	3,5
Ca (mg)	200	34	114
P (mg)	95	15	102
Fe (mg)	0,25	0,3	0,1

Em seu estudo sobre a prevalência de cárie precoce da infância e sua relação com os fatores comportamentais de risco, RAMOS-GOMEZ et al.⁶⁸ (1999), trabalhando com uma população de baixa renda, encontraram resultados que questionam se os modelos de alimentação com leite materno, fórmulas infantis ou leite bovino são fatores etiológicos suficientes para conduzir a esta condição.

Com o objetivo de determinar o potencial acidogênico e cariogênico de cáries associados com o leite materno, ERICKSON; MAZHARI¹⁹ (1999) monitoraram o pH da placa dentária de 18 crianças entre 12 e 24 meses, antes e após 05 minutos de alimentação com leite materno, registrando a queda do pH e o pH mínimo obtido. Também realizaram o cultivo de

Streptococcus sobrinus por 03 horas em leite e mediram o pH da cultura, assim como o aumento no número de unidades formadoras de colônia. O leite materno também foi encubado por 24 horas com esmalte em pó para determinar a solubilidade do material sem a presença de bactérias. Este ainda foi misturado com ácidos para determinar sua capacidade tampão, e por fim, utilizando-se coroas de pré-molares extraídos, por meio de janelas em esmalte, foram colonizadas com *Streptococcus mutans* e encubadas a 37°C por 18 horas com leite materno. O desenvolvimento de cáries foi acompanhado visual e radiograficamente por 12 semanas. Os resultados demonstraram que não houve queda significativa de pH causado pelo leite humano, principalmente quando comparado com dados obtido previamente utilizando água. O leite materno sustentou um moderado crescimento bacteriano, e houve uma real deposição de cálcio e fosfato sobre o esmalte em pó encubado com leite materno. A capacidade tampão demonstrada pelo leite materno foi pobre. Quando utilizado sozinho não foi causador de descalcificação em esmalte quando exposto por 12 semanas, entretanto utilizado com 10% de sacarose causou cáries em dentina em 3,2 semanas. Por este trabalho os autores concluíram que o leite materno não é cariogênico.

Pesquisas anteriores demonstraram que o bochecho com leite diminuía significativamente o pH no fluido da placa dentária, entretanto, o grau de saturação relacionado ao esmalte dentário não era

significativamente diminuído devido a um aumento na concentração do íon cálcio no fluido da placa. TANAKA; MATSUNAGA; KADOMA⁸¹ (1999) realizaram um estudo para investigar o efeito cariostático da adição do cálcio ao leite, quando utilizado em bochechos, sobre o esmalte e a placa dentária. Foram coletadas amostras de placa em 8 voluntários que tinham suspenso sua higiene bucal por 48 horas e em jejum (desde a noite anterior). As amostras foram coletadas da superfície dentária supragengival de um lado da boca e, após 30 segundos bochechando com 15 mL de leite enriquecido com cálcio, preparado com carbonato de cálcio adicionado ao leite comum. Aguardou-se 10 minutos para realização da segunda coleta do outro lado da boca. As amostras foram purificadas por centrifugação, e o fluido da placa analisado para avaliação de íons inorgânicos e do pH. A concentração do íon cálcio para o leite testado foi 6,4 nM, o qual estava 36% maior do que o leite comum. O pH caiu significativamente após o bochecho com o leite enriquecido, passando de 6,4 a 6,1. Concluíram dessa forma que, a queda do pH pode ter causado a redução nos valores do esmalte dentário, entretanto, foi compensado por um aumento significativo na concentração do íon cálcio no fluido da placa.

De acordo com o estudo de ROSE⁷³ (2000), o leite e seus derivados têm demonstrado apresentar poder anticariogênico sendo o seu mecanismo de ação devido a um efeito químico direto, a partir de seus componentes caseína e fosfato de cálcio. Fosfopeptídeos de caseína (CPP) estabilizam

fosfato de cálcio em solução pela união de fosfato de cálcio amorfo (ACP) com seus múltiplos resíduos fosfóricos. Isto permite a formação de pequenos grupos CPP-ACP, mas sem permitir o crescimento ao tamanho crítico do cristal, necessário para a precipitação do fosfato de cálcio. Dessa forma é mantido o estado de supersaturação do esmalte dentário, reduzindo a desmineralização e propiciando um aumento na remineralização.

Segundo a British Nutrition Foundation Oral Task Force Report, devido aos fatores de proteção presentes (cálcio, fosfato, proteínas e lipídios), até 10% de sacarose pode ser adicionado ao leite sem que ocorra uma significativa queda no pH. Entretanto, para MOYNIHAN⁵⁹ (2000), esse fato não é verdade, relatando que 10% de solução de sacarose no leite resulta em uma queda no valor do pH para abaixo de 5,5 em grupos de baixo risco a cárie.

De acordo com artigo publicado por TINANOFF; PALMER⁸³ (2000), o tipo de alimento mais consumido por pré-escolares é o leite e fórmulas baseadas no leite. O açúcar encontrado no leite, a lactose, não é fermentado no mesmo grau que os demais. O leite pode ser menos cariogênico devido as fosfoproteínas presentes que inibem a desmineralização, e também a fatores antibacterianos presentes que interferem com a microbiota oral. No entanto, ainda que o papel anticariogênico do leite esteja claro, pode servir de veículo para substâncias cariogênicas. Uma vez que as necessidades

nutricionais no primeiro ano da criança são supridas principalmente pelo leite materno e/ou outras fontes de leite ou fórmulas infantis a base de leite, os pais freqüentemente combinam este leite ou fórmulas com outros alimentos e açúcar. Além disto, fórmulas que contém sacarose podem não ser tão anticariogênicas como as baseadas em lactose, necessitando de mais pesquisas acerca das implicações dentárias do uso de fórmulas infantis contendo lactose e outros tipos de açúcares.

MENDES DUARTE; COPPI; ROSALEN⁵² (2000), em sua revisão sobre o efeito tópico e sistêmico dos diferentes tipos de leite, enfatizaram que os diversos estudo realizados com leite bovino, materno e em fórmulas, têm apresentado resultados controversos e ainda não conseguiram definir com exatidão os potenciais cariogênicos e cariostáticos dos diferentes tipos de leite. Sendo um produto consumido em larga escala, vem a algumas décadas merecendo atenção de pesquisadores sobre suas influências na cavidade oral. O leite bovino possui alguns componentes como a caseína, lipídeos e enzimas antibacterianas que apresentam um potencial cariostático, embora contenha 4% de lactose, açúcar sugestivamente cariogênico. O leite humano tem sido apontado como responsável por um tipo de cárie similar a cárie de mamadeira, ainda que não esteja bem claro este papel e alguns estudos defendam sua não cariogenicidade. Por fim, elaborado para ser utilizado em algumas épocas da infância, o leite em fórmulas infantis tem recebido pouco controle sobre sua capacidade de

desenvolver cáries. Concluindo, os autores sugerem que o leite bovino não é cariogênico quando utilizado de forma racional e possui propriedades cariostáticas bastante nítidas; o leite humano não é cariogênico, mas pode estar induzindo à cárie rampante quando associado a outros fatores, e suas propriedades cariostáticas ainda não estão bem definidas; e leites em fórmulas devem ser mais bem investigados, pois podem induzir cárie dentária.

O leite materno é uma secreção evolutiva em sua composição. Varia intra e interindividualmente em função da duração da lactância, a hora do dia ou se trata-se do período inicial ou final da mamada. Ainda que o regime alimentar e outros fatores maternos influenciem em sua composição, parece que as mudanças se adaptam as necessidades nutricionais da criança. Em seu artigo GUDIEL-URBANO; GOÑI²⁹ (2001) relatam que os hidratos de carbono contidos no leite materno suprem entre 40 e 50% das necessidades do lactante. O carboidrato predominante é a lactose, cuja concentração é de 6-7 g/100 mL. Sua concentração aumenta significativamente após o 2º – 3º mês, uma vez que o conteúdo de outros carboidratos (mono, di e oligossacarídeos) é máximo nas primeiras semanas de vida e decresce rapidamente depois. Tem se demonstrado uma maior resistência a infecções gastrintestinais, respiratórias e urinárias em crianças alimentadas com leite materno do que em outras que consomem fórmulas infantis. Isto é devido à presença de imunoglobulinas, citocinas, prolactina, leucócitos, lactoferrina e

lisozimas. Alguns oligossacarídeos do leite materno apresentam estruturas análogas aos receptores da superfície das células epiteliais e por ação enzimática atuam competindo por estes sítios com bactérias, vírus, fungos e protozoários do trato gastro-respiratório, inibindo sua colonização e infecção. Podem ainda contribuir para o desenvolvimento do sistema nervoso formando galactocerebrosídeos e glucolipídeos presentes na mielina.

Lactobacilos rhamnosus GG, ATCC (LGG), têm demonstrado antagonismo a muitas bactérias incluindo *Streptococos mutans*. Em seu estudo, aleatório, duplo-cego, NASE et al.⁶⁰ (2001) examinaram se o leite contendo LGG tinha efeito sobre cáries e sobre o risco de cáries em crianças quando comparado com o leite normal. 594 crianças entre 1 e 6 anos de idade de escolas municipais receberam leite como refeição, a partir de recipientes codificados, 5 vezes por semana, por 7 meses. As condições bucais foram registradas ao início e fim do estudo e o risco de cáries calculado com base em dados clínicos e microbiológicos, por meio dos níveis de *Streptococos mutans* da placa dentária e saliva. O risco era classificado como alto se a criança tinha CPOD/ceo > 0, e a contagem de *Streptococos mutans* $10^{(5)}$ UFC/mL. Os resultados demonstraram menos cáries no grupo que utilizou LGG e menor contagem de mutans ao final do estudo, sendo esta redução estatisticamente significativa. Este efeito foi particularmente marcante nas idades entre 3 e 4 anos, concluindo dessa

maneira que o leite contendo bactérias probióticas do tipo LGG podem ser benéficas para a saúde bucal de crianças.

Com o objetivo de descrever a saúde dental de crianças e lactentes, com referência especial a seus hábitos dietéticos e de higiene oral durante os primeiros 18 meses de vida, HABIBIAN et al.³⁰ (2001) estudaram 163 crianças entre 6 e 18 meses de idade, e entre outros dados encontraram que o consumo de leite bovino era de 0,36 vezes/dia ao 6 meses, 2,2 aos 12 meses e de 2,05 aos 18 meses. As fórmulas infantis a base de leite eram consumidas aos 6, 12 e 18 meses respectivamente 2,9, 0,4 e 0,25 vezes ao dia. A frequência de consumo de fórmulas infantis lácteas com adição de outros açúcares que não a lactose era de 0,22, 0,25 e 0,05 aos 6, 12 e 18 meses.

A caseína é uma proteína do leite, ela e seus derivados têm potencial ação remineralizadora no esmalte dentário. Nanocomplexos (micelas) de fosfopeptídeos da caseína-fosfato amorfo de cálcio (CPP-ACP) exibem potencial anticariogênico em experimentos de laboratório, em animais e humanos “in situ”. O objetivo do estudo realizado por SHEN et al.⁷⁷ (2001) foi determinar a capacidade dos CPP-ACP, presentes em gomas de mascar sem açúcar, para remineralizar lesões subsuperficiais em um modelo humano de cárie “in situ”. Trinta indivíduos, em um estudo duplo-cego cruzado, aleatoriamente utilizaram um aparelho removível com seis meias-

lâminas de esmalte humano contendo lesões desmineralizadas subsuperficialmente. Os aparelhos foram utilizados imediatamente após realizarem mastigação com goma por 20 min. e então retidos por outros 20 min. Esta manobra foi realizada 4 vezes por dia durante 14 dias. Ao final do tratamento, as meias-lâminas foram pareadas com as meias-lâminas desmineralizadas para controle, e submetidas à análise microrradiográfica e de imagem densiométrica para medir o nível de remineralização. As gomas utilizadas resultaram em um aumento na remineralização dose-dependente, com 0,19, 10,0, 18,8 e 56,4 mg de CPP-ACP apresentando, respectivamente, 9, 63, 102, e 152% comparadas com a goma controle.

Em seu artigo, LEVINE³⁸ (2001) atenta para o fato do consumo de leite aromatizado ter aumentado, na Inglaterra, 50% entre 1992 e 1999 e sobre a necessidade dos educadores em saúde dental em conhecerem o comportamento destes alimentos, e se eles ou outros sucos de frutas adoçados com produtos lácteos, tais como iogurtes de frutas, são aceitáveis como lanches. As evidências disponíveis sugerem que sua cariogenicidade é desprezível se o consumo for baixo ou moderado, e que são uma alternativa preferível às bebidas adocicadas como refrigerantes.

Para estudar o potencial cariogênico de fórmulas infantis e leite de vaca usando um modelo experimental altamente cariogênico com animais, PERES et al.⁶⁴ (2002) utilizaram 60 ratos dessalivados e infectados com

Streptococcus sobrinus divididos em seis grupos de dez. Os grupos receberam a vontade: 1) água esterilizada e deionizada com 5% de sacarose, 2) leite bovino, 3) Nan 2[®], 4) Nestogeno[®], 5) Ninho[®], 6) Água esterilizada e deionizada. Todos os grupos receberam uma dieta essencial através de sonda gástrica, duas vezes por dia. Após 21 dias foram sacrificados e avaliados para estimar sua microbiota oral e os “scores” de cárie segundo o método de Keyes modificado. Após análise estatística dos dados, o leite bovino foi o que apresentou o menor potencial cariogênico comparado com os outros grupos testados, sendo que não há evidência de diferenças estatisticamente significante quando comparados entre eles. A porcentagem de *Streptococcus sobrinus* obtida a partir da cavidade oral dos animais não foi significativamente diferente entre os grupos estudados, exceto para o grupo no qual se utilizou somente água esterilizada e deionizada. A partir de seus resultados os autores concluíram que o leite de vaca não é cariogênico e que as fórmulas infantis demonstraram algum potencial cariogênico.

KRACHER³⁷ (2002) em seu artigo relata um caso clínico de gêmeos onde um dos quais tinha uma dieta a base de refrigerantes 6 vezes/dia, e o outro por não gostar de refrigerante dava preferência por leite. Fora este aspecto não havia diferença em seus hábitos alimentares. O gêmeo que se alimentava com o uso de refrigerante tinha 15 restaurações, a maioria

classificada como Classe V e algumas Classe II. O irmão que utilizava leite era totalmente isento de cáries.

3. Proposição

Proposição

Tendo em vista a característica de alto consumo e os relatos clínicos nos quais é sugerida a participação do leite no desenvolvimento da cárie dentária, há uma necessidade de se investigar o potencial cariogênico ou anticariogênico dos leites materno, bovino e caprino, largamente utilizados na alimentação de crianças lactentes ou não.

Este trabalho propôs-se a avaliar o efeito “in vitro” de três tipos de leite “in natura”: materno, de vaca e de cabra, sobre o metabolismo da placa dentária humana, com relação a:

- Capacidade de fermentação e,
- Síntese de polissacarídeos extracelulares.

4. Material e Métodos

Material e Métodos

4.1. COLETA DA PLACA DENTÁRIA

Cumpridas as etapas de aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP, (Anexo 1) e autorização dos responsáveis pelos participantes deste estudo, foram selecionadas para coleta de placa dentária 50 crianças e adolescentes entre 10 a 15 anos, com média de idade de 13,1 anos, do sexo masculino, procedentes da instituição denominada Consórcio Intermunicipal da Promoção Social (CIPS), situada na cidade de Bauru/SP.

Os voluntários foram orientados a suspender a higienização por 24 horas e a não ingerir alimentos ou bebidas por pelo menos 30 minutos antes da coleta, realizando previamente a ela um bochecho com água destilada com a finalidade de remover resíduos grosseiros de alimentação. A coleta foi realizada pelo próprio pesquisador no consultório odontológico instalado na instituição supracitada, com curetas de dentina nº. 14 e 18, previamente esterilizadas, removendo a placa dentária supragengival de toda a superfície dentária, de todos os dentes em todos os quadrantes.

Após cada coleta o material obtido foi armazenado em recipientes plásticos, também esterilizados, e colocados em gelo para sua conservação durante o transporte até a armazenagem em freezer a -20°C .

Do total coletado resultou um “pool” de placa que foi ensaiado em laboratório com diferentes substratos – leite materno (LM), leite bovino (LB) e leite caprino (LC) - todos “in natura”, garantindo as mesmas características para os três. Em todas as amostras foram realizados testes, em quintuplicata, de fermentação e de síntese de polissacarídeos extracelulares.

4.2. PREPARO DA PLACA

4.2.1. Reagentes

Inicialmente para o preparo da placa dentária coletada, foi necessária a preparação de Tampão Fosfato de Sódio 0,01 M pH 6,8. Esse reagente foi obtido a partir de:

Fosfato de Sódio Monobásico - PM 137,99.

Fosfato de Sódio Bibásico - PM 141,96.

Para a preparação de Fosfato de Sódio Monobásico 0,2 M foi pesado, em balança de precisão para gramas e miligramas, 27,6 g de Fosfato e diluído em 01 L de água deionizada, com o auxílio de uma pisseta, um Becker de 200 mL, um bastão de vidro e um balão volumétrico para 01 L,

após a diluição foi rotulado e armazenado em vidro âmbar sob refrigeração. De maneira semelhante foi obtido o Fosfato de Sódio Bibásico 0,2 M, pesando-se 28,4 g e diluindo-se em 01 L de água deionizada.

Após a preparação dos reagentes iniciais, foi preparado o Tampão Fosfato de Sódio 0,2 M pH 6,8. Em um agitador magnético em baixa velocidade, foi montado um Becker de 01 L com uma barra magnética, calibrado o eletrodo do pHmetro para pH = 7,0, e misturados, primeiramente Fosfato Monobásico (aproximadamente 450 mL) e completado com Fosfato Bibásico, até atingir pH = 6,8. Esse reagente foi rotulado e armazenado em vidro âmbar servindo de substrato para a preparação do Fosfato de sódio 0,01 M pH 6,8 a cada experimento. Optou-se por essa formulação para estocagem, visto que a concentração de 0,2 M é mais estável.

A cada experimento fazia-se a diluição (na proporção de 1:20) do Fosfato de Sódio 0,2 M para 0,01 M pH 6,8. Utilizando-se um balão volumétrico de 200 mL, inseriu-se 10 mL do Fosfato 0,2 M que foi completado com água deionizada até o menisco estar com a concavidade (meia-lua) no risco demarcador.

4.2.2. Tratamento da placa

O “pool” de placa coletado foi descongelado em temperatura ambiente e reunido em um Becker de 200 mL, com o auxílio de um bastão de vidro para removê-la do recipiente onde estava armazenada, e de uma pipeta de 10 mL para ir adicionando o Tampão Fosfato 0,01 M. Antes porém foram rotulados tubos de centrifuga, e feito a tara, em balança de precisão, anotando-se o peso dos frascos e tampas prévio a realização da centrifugação da placa:

- 1 A = 20,94 g
- 1 B = 20,99 g
- 2 A = 20,93 g
- 2 B = 20,97 g
- 3 A = 20,72 g
- 3 B = 20,90 g

Montados em um suporte, os tubos foram preenchidos com a suspensão de placa em Fosfato de Sódio 0,01 M, e com o auxílio de uma balança de equilíbrio foram igualados para não explodir ao ser colocado, em pares, na centrífuga.

Centrifugada a 3000 rpm durante 10 min., desprezado o sobrenadante, os tubos foram colocados de cabeça para baixo em discos de

filtro de papel absorvente para secagem e, observando a numeração dos tubos e das tampas, novamente congeladas à -20°C . Os quadros 1 e 2 representam os materiais e reagentes, respectivamente, utilizados para o tratamento da placa dentária.

Quadro 1 - Materiais utilizados para o tratamento da placa

MATERIAL	FABRICANTE	LOCAL
Becker	Vidrolabor - Thermex	Brasil
Bastão de vidro	Precicolor HBG	Alemanha
Balão volumétrico	Pyrex	Estados Unidos
Pipeta	Precicolor HBG	Alemanha
Agitador/ Barra magnética	Nova Técnica	Piracicaba / SP
pHmetro	Micronal – B371	São Paulo/ SP
Tubos para centrífuga	Du Pont Company	Wilmington / USA
Centrífuga	Jovan S.A. – centrifuge A 14	St. Herbain / França
Balança de equilíbrio	Record	—
Balança de precisão	A & D Company Limited GR – 202	Japão
Câmara fria	Refriclínica	Bauru / SP
Freezer	Refriclínica	Bauru / SP
Filtro de papel	Melitta do Brasil	Avaré / SP
Caixa térmica	Isopor	São Bernardo do Campo/SP

Quadro 2 – Reagentes utilizados para o tratamento da placa

REAGENTE	FABRICANTE	LOTE	LOCAL
Fosfato de Sódio (monobásico)	E. Merck S. A.	1063466001	Rio de Janeiro / RJ
Fosfato de Sódio (bibásico)	E. Merck S. A.	503005	Rio de Janeiro / RJ
Água deionizada	FOB - Bioquímica	—	Bauru / SP

4.3. FERMENTAÇÃO DA PLACA

4.3.1. Reagentes

Para o estudo da fermentação foi testado um tipo de leite por vez, e foi necessário o preparo dos seguintes reagentes:

- Fosfato de Sódio 0,01 M pH 6,8

Esse reagente foi preparado pela diluição (na proporção de 1:20) do Fosfato de Sódio 0,2 M para 0,01 M pH 6,8 previamente armazenado. Utilizando-se um balão volumétrico de 200 mL, inseriu-se 10 mL do Fosfato 0,2 M que foi completado com água deionizada até o menisco estar com a concavidade (meia-lua) no risco demarcador.

- Glicose 2,5%

Para o preparo de 20 mL de glicose a 2,5%, que equivale a 2,5 g de glicose em 100 mL de água deionizada, foi pesado 0,5 g de glicose anidra, e diluída em um Becker de 25 mL, com o auxílio de um bastão de vidro, um balão volumétrico de 20 mL e uma pisseta com água deionizada.

- Leite adoçado com glicose 2,5%

Para o preparo de 20 mL de leite adoçado com glicose a 2,5%, que equivale a 2,5 g de glicose em 100 mL de leite, foi pesado 0,5 g de glicose anidra, e diluída em um Becker de 25 mL, com o auxílio de um bastão de vidro, um balão volumétrico de 20 mL e uma pipeta para deposição do leite.

- Suspensão de placa

A concentração da suspensão de placa utilizada foi de 1%, que equivale a 10 mg/mL, sendo utilizado por experimento 200 mg de placa dentária previamente tratada. A placa era descongelada em temperatura ambiente, e a seguir pesada e diluída na proporção de 10 mg de placa úmida para 1 mL de Tampão Fosfato de Sódio 0,01 M pH 6,8. Essa suspensão era homogeneizada por 01 min. em homogeneizador tipo Potter Elvehjen.

- Leite

Os diferentes tipos de leite utilizados neste trabalho (leite materno, leite bovino e leite caprino) estavam “in natura”, com menos de 24 horas de

sua coleta, sem adição de nenhum produto para sua conservação, sem fervura e sem congelamento, armazenado somente em refrigeração antes e durante o experimento.

- Hidróxido de Sódio 0,05 M

Para preparar Hidróxido de Sódio 0,05 M foi utilizado NaOH – PM 40. Pesado 02 g de Hidróxido de Sódio, foi diluído em 01 L de água deionizada, com auxílio de um Becker de 100 mL, um bastão de vidro, um balão volumétrico de 01 L e uma pisseta com água deionizada.

- Vermelho de cresol

Com auxílio de um Becker de 10 mL, um bastão de vidro e um balão volumétrico de 10 mL, preparou-se o Vermelho de Cresol a 0,1% pesando-se 10 mg do reagente e diluindo-o em 10 mL de álcool etílico.

Lembrando sempre que todos reagentes eram etiquetados com o nome da substância, concentração e data do preparo, colocados em vidro âmbar, e mantidos armazenados em refrigeração, assim como durante o experimento.

4.3.2. Montagem da bancada

Para o estudo da fermentação foi montada uma bancada com o seguinte esquema de frascos Erlemeyer de 50 mL, etiquetados, para cada teste (leite materno, leite bovino, leite caprino) realizado em quintuplicata:

Os grupos foram divididos em:

T_1 = **Endógeno**

- 1,0 mL de tampão fosfato 0,01M pH 6,8
- 2,5 mL de água deionizada
- 0,5 mL de glicose 2,5%
- 1,0 mL de suspensão de placa

T₂ = Controle (glicose)

- 1,0 mL de tampão fosfato 0,01M pH 6,8
- 2,5 mL de água deionizada
- 0,5 mL de glicose 2,5%
- 1,0 mL de suspensão de placa

T₃ – T₇ = Amostra (leite + glicose)

- 1,0 mL de tampão fosfato 0,01M pH 6,8
- 2,5 mL de água deionizada
- 0,5 mL de leite adoçado com glicose 2,5%
- 1,0 mL de suspensão de placa

T_{3a} – T_{7a} = Amostra (leite)

- 1,0 mL de tampão fosfato 0,01M pH 6,8
- 2,5 mL de água deionizada
- 0,5 mL de leite
- 1,0 mL de suspensão de placa

4.3.3. Preparo dos sistemas

Para a montagem da bancada de trabalho foi estabelecida a seguinte ordem de procedimentos:

1º - Pipetar 1,0 mL de Tampão Fosfato de Sódio 0,01 M pH 6,8 em todos os frascos;

2º - Pipetar 2,5 mL de água deionizada em todos os frascos;

3º - Pipetar 0,5 mL de glicose 2,5% somente nos frascos **endógeno (T₁) e controle (T₂)**;

4º - Pipetar 0,5 mL de leite adoçado com glicose 2,5% somente nos frascos **amostra - leite + glicose 2,5% (T₃ – T₇)**;

5º - Pipetar 0,5 mL de leite somente nos frascos **amostra - leite (T_{3a} – T_{7a})**;

6º - Pipetar 1,0 mL de suspensão de placa 1% em todos os frascos **menos no endógeno**, com intervalo de 02 min. entre cada frasco.

O frasco **endógeno** foi preparado separadamente, pois o grupo endógeno ou tempo zero não sofreu fermentação, e foi titulado imediatamente após a adição da suspensão de placa. Os demais frascos foram encubados em estufa a 37°C por 02 horas, e somente após a encubação sofreram titulação. Para fins estatísticos, durante a realização dos experimentos foram acrescentados mais frascos endógenos e dois frascos controles, para que ao final fosse obtido um total de cinco valores para o endógeno e cinco valores para o controle e assim poder calcular o valor da média a ser utilizada.

4.3.4. Titulação

Para a realização da titulação foi montado um sistema composto por uma bureta de 25 mL, um suporte para bureta, um agitador automático e uma barra magnética. A bureta foi preenchida com Hidróxido de Sódio 0,05 M, tomando-se o devido cuidado para retirar todo o ar do seu interior.

Após a retirada da estufa, com uma micropipeta automática, foi colocado em todos os frascos 10 μ L do indicador Vermelho de Cresol 0,1% e agitado bem para misturar com o tratado.

O grupo endógeno sofreu titulação imediata após seu preparo e os demais foram titulados após 02 horas em 37°C, seguindo a mesma seqüência de preparo e com o intervalo de 02 min. entre um e outro. Cada frasco era titulado gotejando-se o NaOH 0,05 M enquanto a barra magnética era agitada no interior do frasco, e após obtida a “viragem” do indicador era anotado o volume de Hidróxido de Sódio gasto e novamente preenchida a bureta para a próxima titulação.

A neutralização dos ácidos formados pela fermentação da placa dentária foi realizada por meio do NaOH 0,05 N. A diferença do volume gasto de Hidróxido de Sódio na titulação entre a média dos frascos endógenos (que representam os ácidos já existentes na placa antes da incubação) e os demais forneceu a quantidade de ácido formado na placa, após 2h de incubação, nos diferentes sistemas estudados.

Os resultados obtidos após o teste de fermentação, tiveram de ser corrigidos por um fator, conforme os cálculos a seguir:

$$\text{NaOH} - \text{PM} = 40$$

$$\text{NaOH } 1 \text{ M} \quad 40 \text{ g/L}$$

$$\text{NaOH } 0,05 \text{ M} \quad X$$

$$X = 40 \times 0,05 / 1 = 2 \text{ g/L}$$

$$2 \text{ g/L} = 2000 \text{ mg/L}$$

$$\text{ou } \mathbf{2 \text{ mg/mL}}$$

Por exemplo, para um resultado de gasto de NaOH 0,05 M de 1,6 mL, teremos o seguinte raciocínio:

$$1,6 \text{ mL} \quad X$$

$$1,0 \text{ mL} \quad 2,0 \text{ mg}$$

$$X = 1,60 \times 2 / 1 = \mathbf{3,20 \text{ mg de NaOH}}$$

Ainda, a título de facilitar os cálculos, os resultados foram transformados de mg para g de NaOH. (Anexo 2)

Para se obter a estimulação ou inibição da fermentação em porcentagem, esse valor foi calculado seguindo o raciocínio abaixo:

A = valor da fermentação do leite

B = valor da fermentação do controle

C = valor da fermentação do leite adoçado com glicose

$A + B = 100\%$

$C = X$

$X = C \times 100 / A + B$

X = valor da fermentação do leite adoçado com glicose em porcentagem

Após a obtenção da porcentagem do valor da fermentação do leite adoçado com glicose, foi subtraída de 100% para evidenciar se houve estímulo ou inibição da fermentação. (Tabela VI)

Os quadros 3 e 4 representam os materiais e reagentes, respectivamente, utilizados para o estudo da fermentação da placa.

Quadro 3 - Materiais utilizados para o estudo da fermentação da placa

MATERIAL	FABRICANTE	LOCAL
Becker	Vidrolabor - Thermex	Brasil
Bastão de vidro	Precicolor HBG	Alemanha
Balão volumétrico	Pyrex	Estados Unidos
Pipeta	Precicolor HBG	Alemanha
Potter Elvehjen	Marconi	Piracicaba / SP
Erlemeyer	Pyrex	Estados Unidos
Etiquetas	Pimaco	Rio de Janeiro / RJ
Estufa	Fanen - Orion	São Paulo / SP
Agitador/Barra magnético	Nova Técnica	Piracicaba / SP
Bureta	Pyrex	Estados Unidos
Suporte para bureta	Fischer - Castaloy	Estados Unidos
Micropipeta automática	Gilson	França
Balança de precisão	A & D Company Limited GR – 202	Japão
Câmara fria	Refriclinica	Bauru / SP
Freezer	Refriclinica	Bauru / SP
Filtro de papel	Mellita do Brasil	Avaré / SP
Caixa térmica	Isopor	São Bernardo do Campo/SP

Quadro 4 – Reagentes utilizados para o estudo da fermentação da placa

REAGENTE	FABRICANTE	LOTE	LOCAL
Fosfato de Sódio (monobásico)	E. Merck S. A.	1063466001	Rio de Janeiro / RJ
Fosfato de Sódio (bibásico)	E. Merck S. A.	503005	Rio de Janeiro / RJ
Água deionizada	FOB – Bioquímica	–	Bauru / SP
Glicose anidra	E. Merck S. A.	1665937	Darmstadt/Alemanha
NaOH	E. Merck S. A.	298498839	Darmstadt/Alemanha
Vermelho de cresol	Riedel	32653	Alemanha
Álcool Etílico	FOB – Bioquímica	–	Bauru / SP

4.4. SÍNTESE DE POLISSACARÍDEOS EXTRACELULARES

4.4.1. Reagentes

Para a realização do estudo da síntese de polissacarídeos extracelulares, no qual os 03 tipos de leite foram tratados em um único experimento, foi necessário o preparo dos seguintes reagentes:

- Fosfato de Sódio 0,5 M pH 6,5

A preparação de Tampão Fosfato de Sódio 0,5 M pH 6,5 foi obtida a partir de:

Fosfato de Sódio Monobásico - PM 137,99.

Fosfato de Sódio Bibásico - PM 141,96.

Foi pesado 68,99 g de Fosfato de Sódio Monobásico, em balança de precisão para gramas e miligramas, diluído em 01 L de água deionizada, com o auxílio de uma piseta, um Becker de 200 mL, um bastão de vidro e um balão volumétrico para 01 L, após a diluição foi rotulado e armazenado em vidro âmbar sob refrigeração. De maneira semelhante foi obtido o Fosfato de Sódio Bibásico, pesando-se 70,98 g e diluindo-se em 01 L de água deionizada.

Após a preparação dos reagentes iniciais, em um agitador magnético em baixa velocidade, foi montado um Becker de 01 L com uma barra magnética, calibrado o eletrodo do pHmetro para pH = 7,0, e misturados, primeiramente Fosfato Monobásico (aproximadamente 450 mL) e completado com Fosfato Bibásico, até atingir pH = 6,5. Esse reagente foi rotulado e armazenado em vidro âmbar sob refrigeração.

- Suspensão de placa

Para o preparo da suspensão de placa foi utilizada 100 mg de placa, pesada em balança de precisão, descongelada a temperatura ambiente, e suspensa em 10 mL de Fosfato de Sódio 0,5 M pH 6,5, preparando-a em uma proporção de 10 mg/mL. Essa suspensão era homogeneizada por 03 min. em homogeneizador tipo Potter Elvehjen.

- Sacarose 1 M

Para o preparo de 50 mL deste reagente, foi pesado 17,11 g de Sacarose, PM = 342,3, em um Becker de 100 mL, e diluído com o auxílio de um bastão de vidro, um balão volumétrico de 50 mL e uma pisseta com água deionizada.

- Leite

Os diferentes tipos de leite utilizados neste trabalho (leite materno, leite bovino e leite caprino) estavam “in natura”, com menos de 24 horas de sua coleta, sem adição de nenhum produto para sua conservação, sem fervura e sem congelamento, armazenado somente em refrigeração, antes e durante o experimento.

- Hidróxido de Potássio 1 N

Para o preparo do KOH 1 N pode-se utilizar como unidade de medida a molaridade pois, nesse caso, as valências dos elementos químicos são as mesmas. Dessa forma, foram pesados 11,22 g de KOH, $PM = 56,1$, e com o auxílio de um Becker de 250 mL, um bastão de vidro, um balão volumétrico de 200 mL e uma pisseta com água deionizada, preparou-se o reagente em 200 mL de água deionizada, sendo rotulado e armazenado em vidro âmbar.

- Glicose 0,01%

Para o preparo deste reagente na concentração especificada foi utilizado 10 mg de Glicose anidra e com o auxílio de um Becker de 150 mL, um bastão de vidro, um balão volumétrico de 100 mL e uma pisseta com água deionizada, foi diluído em 100 mL de água deionizada.

- Fenol 5%

Para o preparo deste reagente na concentração especificada foi utilizado 12,5 mg de Fenol e com o auxílio de um Becker de 250 mL, um bastão de vidro, um balão volumétrico de 250 mL e uma pisseta com água deionizada, foi diluído em 100 mL de água deionizada. O preparo deste reagente deve ser cercado de cuidados adicionais, visto que, apresenta características carcinogênicas.

- Ácido Sulfúrico Concentrado

Este reagente, PM = 97, foi utilizado na forma apresentada pelo fabricante, sem diluição. Devido à natureza corrosiva desta substância, o uso de luvas para sua manipulação foi necessário.

4.4.2. Montagem da bancada

Para o estudo da síntese de PE foi montada uma bancada utilizando frascos do tipo Ependorff de 1,5 mL, em suporte próprio, etiquetados, obedecendo o seguinte esquema para os 03 tipos de substrato (leite materno, bovino e caprino), realizados em um único experimento em quintuplicata:

Controle

- 0,2 mL de água deionizada
- 0,1 mL de tampão fosfato 0,5 M pH 6,5
- 0,2 mL de sacarose 1 M
- 0,5 mL de suspensão de placa

Amostra 1 - 5

- 0,2 mL de leite (materno, bovino ou caprino)
- 0,1 mL de tampão fosfato 0,5 M pH 6,5
- 0,2 mL de sacarose 1 M
- 0,5 mL de suspensão de placa

4.4.3. Preparo dos sistemas

Para a montagem da bancada de trabalho foi estabelecida a seguinte ordem de procedimentos:

1º - Pipetar 0,2 mL de água deionizada para o frasco controle e 0,2 mL de leite para os frascos amostra 1-5;

2º - Pipetar 0,1mL de Tampão Fosfato de Sódio 0,5 M pH 6,5 em todos os frascos;

3º - Pipetar 0,2 mL de Sacarose 1 M em todos os frascos;

4º - Pipetar 0,5 mL de suspensão de placa em todos os frascos.

Agitar bem todos os frascos e levar em estufa a 37°C por 18 horas.

Após a encubação, os frascos foram retirados da estufa e levados em centrífuga regulada para 10.000 rpm por 12 min. desprezado o sobrenadante, o conteúdo restante foi suspenso em 1,0 mL de água deionizada e sofreu nova centrifugação a 10.000 rpm por 12 min.

Terminada esta centrifugação, após desprezar o sobrenadante, o novo precipitado foi suspenso em 0,5 mL de KOH 1 N e dessa solução foram retiradas alíquotas de 0,1 mL para dosagem de carboidratos totais.

4.5. DOSAGEM DE CARBOIDRATOS TOTAIS

Com o conteúdo dos frascos obtidos após a síntese de polissacarídeos extracelulares, a dosagem de carboidratos totais foi realizada pelo método de DUBOIS et al.¹⁶ (1956). Previamente ao estudo da dosagem de carboidratos totais foi necessária a realização de uma Curva Padrão de Glicose, de maneira a ser obtido um fator que foi multiplicado pela leitura da dosagem obtida, corrigindo dessa maneira eventuais distorções nesta leitura. Esta curva padrão foi estabelecida a um intervalo variando entre 10 μ g e 40 μ g para a glicose 0,01%, e realizada a leitura através de espectrofotômetro regulado para 490 nm.

Obtida a Curva Padrão de Glicose, para a dosagem de carboidratos totais foi montado, em tubos de ensaio, o seguinte sistema:

Assim, foram pipetados na seqüência:

- 0,1 mL de água deionizada para o tubo branco;
- 0,1 mL de controle para os tubos controles (1-5);
- 0,1 mL das amostras 1-5 para os tubos amostra (1-5);
- 0,4 mL de água deionizada em todos os tubos;
- 0,5 mL de Fenol 5% em todos os tubos,
- 3,0 mL de H_2SO_4 concentrado em todos os tubos.

Após aguardar 30 minutos, em temperatura ambiente, foi realizada a leitura dos polissacarídeos hidrolisados em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 490 nm. Os cálculos para a concentração de carboidratos totais foram realizados utilizando o fator resultante ($F = 105,52$) do valor médio das leituras da Curva Padrão de Glicose, expressos em μg de glicose. (Anexo 3)

Os quadros 5 e 6 representam os materiais e reagentes, respectivamente, utilizados para o estudo da síntese de polissacarídeos extracelulares e dosagem de carboidratos totais.

Quadro 5 - Materiais utilizados para o estudo da síntese de polissacarídeos extracelulares e dosagem de carboidratos totais

MATERIAL	FABRICANTE	LOCAL
Becker	Vidrolabor - Thermex	Brasil
Bastão de vidro	Precicolor HBG	Alemanha
Balão volumétrico	Pyrex	Estados Unidos
Pipeta	Precicolor HBG	Alemanha
Potter Elvehjen	Marconi	Piracicaba / SP
Tubos Ependorff 1,5 mL	Master Diagnóstica	São Paulo / SP
Tubos de ensaio 25 mL	Pyrex	Estados Unidos
Suporte para tubos	Marcenaria modelo	Bauru / SP
Etiquetas	Pimaco	Rio de Janeiro / RJ
pHmetro	Micronal – B371	São Paulo / SP
Estufa	Fanen - Orion	São Paulo / SP
Agitador/Barra magnético	Nova Técnica	Piracicaba / SP
Centrífuga	Jovan S.A. – centrifuge A 14	St. Herbain / França
Balança de precisão	A & D Company Limited GR – 202	Japão
Espectrofotômetro	Pharmacia Biotech - Ultrospec 2000	Cambridge / Inglaterra
Câmara fria	Refriclinica	Bauru / SP
Freezer	Refriclinica	Bauru / SP
Luvas descartáveis	Embramac	Campinas / SP
Caixa térmica	Isopor	São Bernardo do Campo/SP

Quadro 6 – Reagentes utilizados para o estudo da síntese de polissacarídeos extracelulares e dosagem de carboidratos totais

REAGENTE	FABRICANTE	LOTE	LOCAL
Fosfato de Sódio (monobásico)	E. Merck S. A.	1063466001	Rio de Janeiro / RJ
Fosfato de Sódio (bibásico)	E. Merck S. A.	503005	Rio de Janeiro / RJ
Água deionizada	FOB – Bioquímica	–	Bauru / SP
Sacarose	Sigmer	9040679	St.Louis / EUA
Glicose anidra	E. Merck S. A.	1665937	Darmstadt/Alemanha
KOH	Montfdison Farmacêutica	7080069	São Paulo / SP
Fenol	E. Merck	3687560	Darmstadt/Alemanha
Ácido sulfúrico	E. Merck	70122309	Darmstadt/Alemanha

Para realização de todos os testes laboratoriais, foi utilizado o laboratório de Bioquímica da Faculdade de Odontologia de Bauru. Todas as crianças participantes do estudo receberam ao final dos trabalhos uma profilaxia profissional e aplicação tópica de flúor em forma de gel, assim como orientações e uma palestra, abordando o tema Higiene Bucal.

4.6. METODOLOGIA ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos a partir da fermentação foram tabulados e submetidos ao teste de Análise de Variância (ANOVA) a dois critérios e tendo demonstrado significância, foi empregado o teste de Tukey-Kramer com nível de significância de 5% para comparação entre os diferentes tipos de substratos.

Os resultados obtidos a partir da síntese de polissacarídeos extracelulares foram tabulados e submetidos ao teste de Análise de Variância (ANOVA) a um critério e tendo demonstrado significância, foi empregado o teste de Tukey-Kramer com nível de significância de 5% para comparação entre os diferentes tipos de substratos.

5. Resultados

Resultados

5.1. FERMENTAÇÃO

Na Tabela I encontram-se os valores médios da fermentação apresentada pelos substratos utilizados neste trabalho, expresso em $\mu\text{g/mL}$ de NaOH, após realizada a titulação.

TABELA I – Fermentação dos substratos testados (valores em $\mu\text{g/mL}$ de NaOH)

Substrato	$\bar{x}$	dp
Endógeno	3040,00	$\pm 517,69$
Controle (glicose 2,5 %)	3600,00	$\pm 316,22$
Leite de cabra	5040,00	$\pm 606,63$
Leite de vaca	5720,00	$\pm 438,17$
Leite materno	10160,00	$\pm 753,65$
Leite de cabra adoçado	5160,00	$\pm 260,76$
Leite de vaca adoçado	5880,00	$\pm 178,88$
Leite materno adoçado	10400,00	$\pm 648,07$

Estes resultados representam a fermentação bruta apresentada pelas substâncias testadas. Para obter-se a fermentação real deve-se descontar o valor do endógeno, ou seja, a fermentação que a placa exibia antes de metabolizar o reagente, assim sendo realizou-se a subtração do valor médio

obtido para o endógeno da média da fermentação demonstrada pelos demais substratos, obtendo dessa forma o valor da média real de fermentação apresentada para cada um deles.

Na Tabela II encontra-se o valor médio da fermentação real expresso em $\mu\text{g/mL}$ de NaOH, para o controle (glicose 2,5%), para os leites testados, e para os leites testados adicionados de glicose 2,5%.

TABELA II – Fermentação real expressa em $\mu\text{g/mL}$ de NaOH

Substrato	$\bar{x}$	dp
Controle (glicose 2,5%)	560,00	$\pm 316,22$
Leite de cabra	2000,00	$\pm 606,63$
Leite de vaca	2680,00	$\pm 438,17$
Leite materno	7120,00	$\pm 753,65$
Leite de cabra adoçado	2120,00	$\pm 260,76$
Leite de vaca adoçado	2840,00	$\pm 178,88$
Leite materno adoçado	7360,00	$\pm 648,07$

Estes resultados evidenciam a menor fermentação real apresentada pelo leite de cabra, seguida pelo leite de vaca e pelo leite materno. Para determinar o comportamento das substâncias testadas ingeridas em conjunto com carboidratos, adicionou-se glicose a 2,5% em cada tipo de leite, e os resultados apresentados pela Tabela II demonstram que a fermentação real dos diversos tipos de leite testados sem a adição de

carboidrato é sempre menor do que a que ocorre quando se adiciona glicose 2,5%. A fermentação apresentada pelo controle, glicose 2,5%, é pequena devido à concentração utilizada deste. Este controle foi realizado para evidenciar a fermentação somente do carboidrato sem adição do substrato teste.

O gráfico 1 exibe os valores médios da fermentação real apresentada pelo controle (glicose 2,5%), pelos leite de cabra, de vaca e materno, e pelos leites testados adoçados com glicose 2,5%.

GRÁFICO 1 – Valores médios da fermentação real do controle (glicose 2,5%), dos diferentes tipos de leite e dos leites adoçados com glicose 2,5%.

A média dos resultados obtidos através da fermentação real dos diferentes tipos de leite sem adição de glicose 2,5% foi somada ao valor

médio obtido pela fermentação real do controle (glicose 2,5%), mantendo-se o mesmo comportamento anterior apresentado, com o leite de cabra demonstrando a menor fermentação, logo após o leite de vaca, e apresentando a maior fermentação real o leite materno, conforme apresentado pela Tabela III.

TABELA III – Fermentação real do leite somado a fermentação real do controle (glicose) $\mu\text{g/mL}$ de NaOH

Leite	$\bar{x}$	dp
Cabra	2560,00	$\pm 606,63$
Vaca	3240,00	$\pm 438,17$
Materno	7680,00	$\pm 753,65$

Para comparação destes resultados foi aplicado o teste estatístico de Análise de Variância (ANOVA) a 02 critérios, na qual foram comparados os diferentes tipos de leite e as duas condições apresentadas, fermentação real do leite adoçado com glicose a 2,5% e fermentação real do leite somado ao valor da fermentação real da glicose a 2,5%. O nível de significância adotado para este teste foi de 5%, demonstrado pela Tabela IV.

Observa-se, por meio da análise destes dados que houve diferença estatisticamente significativa para os diferentes tipos de leite, enquanto que as condições estudadas, leite adoçado com glicose 2,5% e leite somado a glicose 2,5%, ainda que se apresentem com valores diferenciados, não

demonstrou ser esta diferença estatisticamente significativa. Os dados da Tabela IV evidenciam ainda que, não existe interação entre os dois critérios estudados.

TABELA IV – Análise de variância a 02 critérios para comparação dos diferentes tipos de leite e das condições testadas (leite adoçado com glicose 2,5%; leite somado com glicose 2,5%)

Efeito	GL efeito	QM efeito	GL erro	QM erro	F	p
Tipo de leite	2	78988000	24	274666,7	287,5777	< 0,0001*
Condição	1	1121333	24	274666,7	4,0825	0,054 ^{ns}
Interação	2	9333	24	274666,7	0,0340	0,966 ^{ns}

* diferença estatisticamente significativa – ($p < 0,05$)

ns – não significativa

O gráfico 2 evidencia a comparação das condições apresentadas pelos leites testados. Comparou-se a fermentação real do leite somada a fermentação real da glicose 2,5%, com a fermentação do leite adoçado com glicose 2,5%.

GRÁFICO 2 – Comparação das condições estudadas, fermentação real do leite somada a fermentação real da glicose 2,5% (controle), e do leite adoçado com glicose 2,5%.

Depois de constada diferença estatisticamente significante para os diferentes tipos de leite utilizados, foram realizadas comparações individuais através do teste estatístico de Tukey-Kramer, com nível de significância de 5%, Tabela V.

TABELA V – Teste de Tukey-Kramer para comparações múltiplas

COMPARAÇÃO – Tipo de leite	<i>p</i>
Cabra x Vaca	0,0171*
Cabra x Materno	0,0001*
Vaca x Materno	0,0001*

* diferença estatisticamente significativa – ($p < 0,05$)

Por meio deste teste, demonstra-se que todas as substâncias testadas apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre si. Pela análise destes resultados pode-se inferir que o leite de cabra apresentou a melhor performance entre os substratos testados, seguido pelo leite de vaca e o menor desempenho foi demonstrado pelo leite materno.

CABRA < VACA < MATERNO

A Tabela VI representa os resultados encontrados, em porcentagem, para a inibição demonstrada pelos diferentes tipos de leite testados, quando utilizados em adição ao carboidrato (glicose 2,5%), fermentando menos que o esperado quando se soma a fermentação real do leite com a fermentação real da glicose 2,5% (controle).

TABELA VI – Inibição da fermentação real dos leites testados quando adoçados com glicose 2,5%

Tipo de leite	% de inibição
Cabra	17,19 %
Vaca	9,38 %
Materno	4,17 %

O gráfico 3 demonstra a comparação entre a inibição da fermentação apresentada pelos leites quando estes são adoçados com glicose 2,5%.

GRÁFICO 3 – Comparação da inibição da fermentação apresentada pelos diferentes tipos de leite estudados.

5. 2. SÍNTESE DE POLISSACARÍDEOS EXTRACELULARES

A tabela VII traz os resultados da síntese de polissacarídeos extracelulares totais, que foram hidrolisados e depois lidos, expressos em μg de glicose, para os grupos controle e diferentes tipos de leite testados exibindo a média dos experimentos bem como os respectivos desvios padrões. Nesta pode-se observar que o leite materno foi o responsável pela menor síntese de polissacarídeos extracelulares, seguido pelo leite de vaca, e com o leite de cabra apresentando os maiores resultados.

TABELA VII – Síntese de Polissacarídeos Extracelulares totais em μg de glicose

Grupos	$\bar{x}$	dp
Controle	30,86	$\pm 1,55$
Cabra	80,56	$\pm 2,87$
Vaca	76,22	$\pm 2,99$
Materno	56,70	$\pm 3,31$

Para comparação destes resultados foi aplicado o teste estatístico da Análise de Variância (ANOVA) a 01 critério, no qual foram comparados os valores obtidos pelo experimento para o controle e diferentes tipos de leite. O nível de significância adotado para este teste foi de 5%, demonstrado pela Tabela VIII.

TABELA VIII – Análise de variância a 01 critério para comparação dos diferentes tipos de leite utilizados

Efeito	GL efeito	QM efeito	GL erro	QM erro	F	<i>p</i>
Tipo de leite	3	2568,352	16	7,669	334,8966	< 0,0001*

* diferença estatisticamente significativa – ($p < 0,05$)

Após a constatação que os diferentes tipos de leite testados apresentavam diferenças estatisticamente significantes entre si, aplicou-se o teste de Tukey-Kramer para realizar comparações individuais, adotando um nível de significância de 5%. Os resultados podem ser observados na Tabela IX.

TABELA IX – Teste de Tukey-Kramer para comparações múltiplas

Comparação	<i>p</i>
Controle x Materno	0,0002*
Controle x Vaca	0,0002*
Controle x Cabra	0,0002*
Materno x Vaca	0,0002*
Materno x Cabra	0,0002*
Cabra x Vaca	0,1015 ^{ns}

* diferença estatisticamente significativa – ($p < 0,05$)

ns – não significativa

Pela análise destes dados observou-se que todos os leites testados apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre si e quando comparados com o controle, exceto o leite de cabra contra o leite de vaca.

As médias finais apresentadas, para síntese de polissacarídeos extracelulares, foram maiores para os leites testados, quando comparadas ao valor médio do controle.

O gráfico 4 demonstra com mais clareza a performance de cada substrato testado.

GRÁFICO 4 – Comparação entre os diferentes tipos de leite para a síntese de polissacarídeos extracelulares. (µg de glicose oriunda de polissacarídeos totais hidrolisados)

6. *Discussão*

Discussão

A presença da placa dentária, com seus microrganismos e seu metabolismo, é indubitavelmente um dos fatores relacionados ao desenvolvimento da cárie dentária que merece destaque em seu estudo. A fermentação e a síntese de polissacarídeos extracelulares apresentadas pela placa dentária são apenas dois aspectos, os quais nos permitem observar o potencial cariogênico de determinada substância, no entanto são extremamente significativos para a iniciação de processo carioso^{1, 7, 8, 27, 40, 45, 79, 86, 87}.

A fermentação, ao produzir ácidos orgânicos, determina uma queda no pH que conduzirá a desmineralização do substrato dentário. A síntese de polissacarídeos extracelulares favorecerá a adesão e colonização bacteriana, além de dificultar a difusão dos ácidos formados durante a fermentação, mantendo-os muito próximos à superfície dentária^{27, 40, 44, 78, 87}.

Assim, fica estabelecido o papel que desempenham as bactérias no meio bucal em especial os estreptococos do grupo mutans com relação ao desenvolvimento de cáries^{47, 49, 57, 63, 80}. Porém, a dieta tem influência também determinante neste processo, sendo a ingestão de carboidratos o principal substrato para a fermentação e mais especificamente de sacarose para ocorrência da síntese de polissacarídeos extracelulares^{31, 47, 55, 75, 85, 86}.

Neste experimento procurou-se avaliar o comportamento dos leites materno, bovino e de cabra com relação a estes dois aspectos estudados, a fermentação e a síntese de polissacarídeos extracelulares.

Durante o primeiro ano de vida a alimentação evolui em função das capacidades funcionais, desenvolvimento psicomotor e necessidades nutricionais do indivíduo. É por isso que neste primeiro ano se divide, do ponto de vista nutricional, em dois períodos: lácteo e diversificação ou complementação. O leite materno é o alimento de eleição durante o período lácteo uma vez que a amamentação cria laços afetivos entre a mãe e filho, além de fornecer a combinação de nutrientes e energia mais adequada para o crescimento e desenvolvimento do lactente^{27, 62}.

Na impossibilidade de utilizar o leite materno recorre-se a outros tipos de leite, que sejam adaptados à idade e às condições orgânicas da criança. O leite bovino se destaca na produção e no consumo⁵², tem uma natureza protéica diferente do leite materno (mais rico em cálcio e fosfato), é bem tolerado por crianças, porém somente deve fazer parte da dieta após os seis meses, e a partir do segundo ano de vida deve-se encorajar seu uso, visto que é rico em fatores protetores da cárie (cálcio e fosfato) e livre de açúcares extrínsecos²⁶.

Para realização deste trabalho optou-se por utilizar somente leite “in natura”, dessa forma não será mencionado o uso de fórmulas lácteas infantis, porém é devidamente reconhecida a sua utilização na alimentação do infante. Um outro leite utilizado na alimentação infantil é o leite de cabra

^{10, 22}, contudo, praticamente nada foi encontrado na literatura consultada com informações sobre leite de cabra no que diz respeito à saúde bucal. Talvez porque, segundo ORNELLAS; ORNELLAS⁶² (1970), o leite de cada espécie animal é adaptado às particularidades do crescimento e desenvolvimento da respectiva espécie.

Ainda a respeito do conteúdo apresentado pelos leites estudados, este trabalho pode estar sujeito a alterações devido a um mecanismo fisiológico de regulação apresentado pelo organismo da mãe. Ainda que contenha os nutrientes necessários, o leite no início da mamada tem aspecto aquoso e azulado, pois tem muita água e é rico em vitaminas, minerais e lactose. Ao final é mais branco e tem o conteúdo de gordura aumentado, para que a possa satisfazer, e também para fornecer mais energia e peso à criança⁷². Partindo deste fato é de se esperar que algum significado neste trabalho seja enfatizado uma vez que, por razões éticas e morais, a voluntária que forneceu seu leite materno realizou a coleta após a alimentação do lactente. Resultados diferentes podem ser encontrados ao se utilizar leite materno nas diversas fases de amamentação. Isto sugere a necessidade de trabalhar-se com o leite materno nestas diferentes fases, assim como, durante o decorrer dos meses que sucedem o nascimento da criança.

No entanto os resultados encontrados, nos quais o leite materno apresenta fermentação superior ao leite bovino são concordantes

com a literatura que reporta um conteúdo de lactose superior no leite materno^{5, 6, 52, 64, 76, 89}.

A coleta da placa dentária realizada, bem como a metodologia foi baseada em outros trabalhos semelhantes, porém com diversos substratos mais estudados nestes dois aspectos, fermentação e síntese de polissacarídeos extracelulares^{1, 8, 25, 46, 66, 67, 87}. Esta metodologia, um tanto quanto arrojada e de técnica sensível, é provavelmente causa de uma grande diferença entre os resultados parciais obtidos, motivo este de termos realizado todos os testes em quintuplicata e trabalharmos apenas com as médias finais de cada teste.

Visto que a placa dentária utilizada em forma de “pool” era consistente com o objetivo^{2, 43} fornecendo microrganismos para a realização dos experimentos, tivemos apenas o cuidado de eliminar a fermentação chamada endógena, que é a fermentação nativa apresentada pela placa que se comporta de maneira diferente a cada teste realizado, uma vez que a placa coletada apresenta em seu conteúdo uma determinada quantidade de carboidratos, que fermentam e apresentam produção de ácidos, devendo esse valor ser descontado do valor fermentado, assim fornecendo a fermentação real de cada substância testada^{42, 43}, conforme observado na Tabela II, onde encontramos o valor médio da fermentação real apresentada pelos produtos testados.

Ainda que, neste experimento, os leites estudados tenham apresentado uma fermentação maior que a glicose, deve-se lembrar que a

concentração utilizada, 2,5%, é abaixo do que a concentração normalmente estudada, com valores acima deste normalmente entre 5% a 10%, e por vezes utilizando sacarose^{5, 9, 12, 32, 44, 58}. O valor estipulado foi o suficiente para o objetivo desta pesquisa, que era saber o quanto fermentava o carboidrato que seria utilizado para adoçar nossos leites testados.

Os resultados deste trabalho demonstraram também que, quando utilizado em conjunto com a glicose, todos os leites fermentaram menos que o esperado, ou seja, menos que a fermentação do leite somada a fermentação da glicose, Gráfico 2, sugerindo que a fermentação do leite adoçado com a glicose 2,5% apresentou uma inibição desta atividade em todos os leites testados, levantando a hipótese de que algum componente destes leites pode interferir no processo de produção de ácidos (Tabela VI).

Muito embora todos os leites apresentem diferenças estatisticamente significantes entre si em relação à fermentação, visualizou-se uma enorme discrepância entre os valores obtidos para os leites de cabra e bovino quando comparados com o leite materno (Gráfico 1). O leite de cabra, sobre o qual não se dispunha de muitas informações sobre seus componentes, tinha um aspecto sugestivo, demonstrado durante o experimento, que poderia conter uma quantidade maior de gordura e, segundo FRANCO²⁴ (1999), realmente o apresenta entre seus componentes quando comparado aos outros leites. Isto, de acordo com a literatura^{26, 32, 41, 51, 52, 89, 90}, que relata a ação da gordura do leite em geral com características antibacterianas, pode sugerir que este conteúdo maior lipídico esteja conferindo alguma

característica positiva durante a fermentação deste tipo de leite em particular. Mais estudos sobre a composição do leite de cabra podem vir a elucidar melhor este aspecto.

Os leites de vaca e materno, melhores detalhados pela literatura, estes sim guardam entre si uma relação muito importante. O leite materno apresenta praticamente o dobro da lactose em sua composição quando comparado ao leite bovino^{5, 6, 9, 52, 76, 89}, o que pode ser comprovado pelos resultados apresentados pelo teste de fermentação, no qual se verifica o leite materno fermentando mais que o dobro de leite bovino, e mais de três vezes o valor do leite de cabra. Aqui pode-se levantar outra hipótese que necessita de mais investigação para sua comprovação, a de que o leite de cabra possa apresentar em seu conteúdo um menor teor de lactose.

Não obstante o fato de ter apresentado uma fermentação elevada, a inibição dessa fermentação quando utilizados os três tipos de leite adoçados com glicose 2,5%, serve de incentivo para recomendação do uso do leite em substituição a outras bebidas adoçadas artificialmente, como sugerido por MOHAN⁵⁵ (1998) ou LEVINE³⁸ (2001), quando este afirma ter o leite menor queda de pH quando comparado com sucos naturais de frutas, bebidas artificialmente adoçadas ou mesmo o próprio leite adoçado. Isto tudo sem relevar o fato da existência de componentes no leite que atuam reduzindo os efeitos de carboidratos, tais como descalcificação, inclusive promovendo remineralização do elemento dentário.

Várias campanhas têm sido desenvolvidas com o objetivo de motivar e orientar a população sobre a importância da amamentação materna no desenvolvimento físico e psicológico da criança. Sendo assim, não é objetivo deste estudo contrariar esta recomendação, inclusive acreditamos ser o leite materno o mais indicado para o lactente, o qual recomendamos. Tão pouco julgamos ser este, quando de seu uso adequado, responsável por iniciar o processo cariogênico, mas sim o seu uso prolongado durante a noite e sem qualquer manobra de higiene, permitindo que o leite permaneça sobre o dente por longos períodos, fermentando e causando queda de pH^{6, 20, 31, 65, 68}. Isto também ocorre com outros tipos de leite como os testados neste trabalho, e leite em fórmulas amplamente utilizados na infância. Ainda assim deve-se lembrar que, a lactose é menos nociva que os outros açúcares e deve ser preferida para a saúde geral e dentária de crianças^{6, 17, 36, 74}.

As condições estudadas, fermentação do leite somada a da glicose, e fermentação do leite adoçado com glicose, não apresentaram significância estatística, onde pode-se sugerir que o leite tem o mesmo comportamento em relação à fermentação, do que quando adoçado com glicose 2,5%. Aqui lembramos que a utilização da glicose para adoçar o leite infantil é comum, onde temos a marca comercial Dextrosol (dextrose) da Nestlé como principal representante deste segmento, o que poderia justificar a utilização desta substância neste trabalho. Porém, deve-se lembrar que, como observada na tabela VI, em porcentagem todos os leites demonstraram uma leve redução na fermentação quando utilizados juntamente com a glicose.

O alimento do homem geralmente contém uma mistura de sacarose, glicose e frutose das frutas e vegetais, além da lactose originada do leite. Todavia a sacarose é sem dúvida o açúcar mais utilizado nas dietas ocidentais. O potencial cariogênico dos alimentos está relacionado ao conteúdo desses açúcares e seu metabolismo, que podem ser fermentados diretamente ou após armazenamento na placa como polissacarídeos intra e extracelulares^{41, 89, 90}. Esses carboidratos são utilizados pelas bactérias bucais, especialmente o *Streptococcus mutans*, formando placa espessa e pegajosa que favorecem a adesão de microrganismos ao dente^{27, 40, 78, 79}.

Muitos outros mono e dissacarídeos difundem-se prontamente na placa e são metabolizados, no entanto, a sacarose é a única em sua habilidade de induzir os *Streptococcus mutans* a produzir ambos, polissacarídeos extracelulares tais como frutano e glucano, a matriz insolúvel mutano, que favorece a aderência e colonização, e ainda polissacarídeos intracelulares de estoque, constituindo-se em uma fonte de energia de escolha pela maioria das bactérias^{33, 82}.

Há um grande interesse em pesquisar substâncias que possam inibir a síntese de polissacarídeos extracelulares, inclusive provenientes da dieta normal do indivíduo, tornando a placa dentária menos agressiva ao esmalte, diminuindo sua formação e acúmulo.

Porém nos resultados deste trabalho observa-se a ocorrência de valores para a síntese de polissacarídeos extracelulares totais, obtidos com os leites testados, bem acima do valor obtido com o controle, que continha

somente solução de sacarose 1 M, revelando que os substratos testados apresentam algo mais em seu conteúdo que favorecem essa síntese.

De acordo com os valores evidenciados pela Tabela VII, o grupo controle revela o menor valor de polissacarídeos sintetizados, ou seja, a sacarose somente tem a menor síntese entre todos os leites testados, seguida pelo leite materno, de vaca e de cabra.

Os valores médios, aqui expressos em μg de glicose, representam na verdade polissacarídeos que foram hidrolisados pelo KOH 1M, e realizada a sua leitura como glicose em espectrofotômetro a 490 nm de absorbância.

Estes resultados evidenciaram ainda que o comportamento dos substratos testados segue uma ordem inversa a da fermentação, apresentando o leite de cabra o maior valor observado (Tabela VII). Na seqüência tem-se o leite de vaca e os menores índices registrados são obtidos com o leite materno. Ao se considerar que esses polissacarídeos são responsáveis por fenômenos de aderência e colonização bacteriana^{7, 27, 78}, o leite materno leva uma grande vantagem em comparação aos outros testados, visto que seu comportamento foi, ainda que estatisticamente diferente, bem próximo ao comportamento do controle.

Quando comparados entre si, somente não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os leites de cabra e de vaca, as demais comparações, demonstradas na Tabela IX e Gráfico 4, evidenciam diferenças significantes entre si e em relação ao controle.

No entanto, com relação à síntese de polissacarídeos, também há a necessidade da realização de mais estudos detalhados que demonstrem, com mais clareza, a composição dos leites estudados, bem como a variação que ocorre, principalmente com o leite materno nas diferentes fases de amamentação. Dessa forma, poderia ser sugerido qual componente apresentado pelo leite em geral, estaria favorecendo a síntese de polissacarídeos.

Como já foi considerado, a sacarose é o principal carboidrato responsável em conduzir essa reação^{27, 40, 49, 79}. Assim sendo, o leite por conter somente lactose^{6, 76, 83}, não teria grande influência sobre este processo metabólico, porém, os resultados deste estudo demonstraram o contrário. Ainda que a lactose tivesse alguma influência neste processo, como observado na literatura^{9, 19, 52, 62, 71} o conteúdo desta é muito maior para o leite materno quando comparado ao leite bovino. Mesmo assim, tem-se o menor valor médio de síntese de polissacarídeos apresentado pelo leite materno quando comparados aos outros estudados (Tabela VII).

Pode-se supor ainda que o mecanismo de estimulação não esteja relacionado ao carboidrato. Talvez algum componente presente nos leites estudados tais como, vitaminas, sais minerais ou mesmo íons dispersos, estivessem agindo de maneira a favorecer a ação da glicosiltransferase, sendo estes responsáveis por estas mudanças quantitativas ocorridas na síntese de polissacarídeos.

Ao se estudar a cariogenicidade de algum substrato, vários fatores devem ser levados em consideração para a realização de afirmações sobre o seu potencial cariogênico. Neste trabalho apenas dois desses fatores foram avaliados, a fermentação e capacidade de sintetizar polissacarídeos extracelulares a partir da placa dentária humana. Antes de sugerir-se qualquer hipótese sobre estes leites testados, outros aspectos destes, bem como suas características intrínsecas necessitam de mais estudos para melhor compreensão de suas propriedades.

Devido à carência de informações na literatura, em especial sobre o leite de cabra, pouco se pode raciocinar em cima dos resultados encontrados. Foi evidenciado nas Tabela I, II e III o seu ótimo desempenho a respeito da fermentação, sua porcentagem de inibição dessa fermentação quando associado com a glicose 2,5%, Gráfico 3, é a mais elevada. No entanto, a sua síntese de polissacarídeos foi extremamente elevada, demonstrado no Gráfico 4. Uma vez que há a recomendação para a substituição do leite de vaca pelo leite de cabra em casos de alergia¹⁰, e que este apresenta uma boa aceitação e tolerância por parte das crianças, tendo o seu consumo aumentado os últimos tempos²², a ausência de respaldo científico para a sua utilização deve ser sanada através de novos estudos como este, contando com o enfoque odontológico.

Neste trabalho, dentre os três produtos testados, o leite bovino manteve-se sempre em posição intermediária em relação aos outros dois, assim sendo, sugere-se que a melhor performance deste leite, aliada à

outras qualidades apresentadas pelo seu conteúdo, do ponto de vista nutricional e também sob a ótica odontológica, tornando-o recomendável para o consumo racional em crianças, quando há necessidade de substituir o leite materno, visto que este é o alimento de eleição por tudo que representa à criança.

A literatura consultada nesta pesquisa evidenciou praticamente a inexistência de trabalhos considerando os aspectos estudados, quando utilizados estes substratos. Dessa forma, esta discussão foi realizada por meio de inferências baseadas a partir dos dados obtidos pela realização deste experimento.

7. Conclusões

Conclusões

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho pode-se afirmar que:

- Todos os leites testados, leite de cabra, de vaca e materno apresentaram fermentação. Ocorrendo uma diferença estatisticamente significativa entre eles, sendo o leite de cabra responsável pela menor fermentação, seguida do leite bovino e depois o leite materno.
- Não houve diferença estatisticamente significativa entre as condições estudadas, fermentação dos leites adoçados com glicose e fermentação do leite somada a fermentação da glicose, evidenciando-se uma inibição da fermentação quando estudado o leite adoçado com glicose.
- A síntese de polissacarídeos é aumentada quando utilizados leites de cabra, bovino e materno comparado ao grupo controle, havendo diferença estatisticamente significativa entre eles. O leite de cabra apresentou a maior síntese de polissacarídeos extracelulares, seguido pelo leite de vaca e pelo leite materno.

Referências Bibliográficas

Referências Bibliográficas *

1. ABREU, C. S. B. **Avaliação, “in vitro”, do efeito inibidor do ácido tânico, do diacetato de clorexidina, da iodoacetamida, do metabissulfito de sódio e do sulfato de protamina sobre o metabolismo da placa dentária humana: fermentação e síntese de polissacarídeos extracelulares insolúveis.** Bauru, 1985. 95 p. Tese (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.
2. ACEVEDO, A. M. **La composición química y microbiológica da la placa dental en diferentes áreas de la boca.** Caracas, 1984. 121 p. Tese (Mestrado) – Facultad de Odontología, Universidad Central de Venezuela.
3. ANNÁN, E. S. G. de et al. Efecto de la leche sobre los estreptococos orales de la placa bacteriana en niños. **Rev. Asoc. Odont. Argent.**, v. 79, n. 4, p. 221-4, oct./dic. 1991.
4. ARAÚJO, D. R. et al. An in situ evaluation of cariogenic potencial of human breast milk. **J. dent. Res.**, v. 74, n. 3, p. 811, Mar. 1995.

* Normas recomendadas para uso no âmbito da Universidade de São Paulo, com base no documento “Referências Bibliográficas: exemplos”, emanado do Conselho Supervisor do Sistema Integrado de Bibliotecas da USP, em reunião de 20 de setembro de 1990.

5. ARAÚJO, F. B. et al. Estudo in situ da cariogenicidade do leite bovino: aspectos clínicos. **Rev. ABO Nac.**, v. 6, n. 2, p. 103-6, abr./maio 1998.
6. AWAD, L. P.; GLEISER, R. Cárie provocada por leite materno: revisão e apresentação de caso clínico. **Rev. bras. Odont.**, v. 41, n. 2, p.22-4, mar./abr. 1984.
7. BARROS, E. R. C. Metabolismo da placa cariogênica. **Rev. Fac. Odont. Porto Alegre**, v. 30/31, p. 16-22, 1990.
8. BIJELLA, M. F. T. B. et al. Avaliação do efeito inibidor de dentifrícios antiplaca disponíveis no mercado, sobre o metabolismo da placa dentária humana. (estudo "in vitro"). **Rev. Bras. Odont.**, v. 49, n. 1, p. 29-34, jan./fev. 1992.
9. BIRKHELD, D.; IMFELD, T.; EDWARDSSON, S. pH changes in human dental plaque from lactose and milk before and after adaptation. **Caries Res.**, v. 27, n. 1, p. 43-50, Jan. 1993.
10. BORGES, W. G. Utilização do leite de cabra em crianças com alergia ao leite de vaca. **Rev. bras. Alergia Imunopatol.**, v. 18, n. 2, p. 46-9, mar./abr. 1995.

11. BOWEN, W. H. et al. Influence of milk, lactose-reduced milk, and lactose on caries in desalivated rats. **Caries Res.**, v. 25, n. 4, p. 283-6, 1991.
12. BOWEN, W. H.; PEARSON, S.K. Effect of milk on cariogenesis. **Caries Res.**, v. 27, n. 6, p. 461-6, 1993.
13. BOWEN, W. H. et al. Assessing the cariogenic potential of some infant formulas, milk and sugar solutions. **J. Amer. dent. Ass.**, v. 128, n. 7, p. 865-71, July 1997.
14. BOYD, L. D.; DWYER, J. T. Guidelines for nutrition screening, assessment and intervention in the dental office. **J. dent. Hyg.**, v. 72, n. 4, p. 31-43, Fall 1998.
15. CARBONEL, V. V. et al. An in situ of cariogenesis of bovine milk. **J. dent. Res.**, v. 74, n. 3, p. 811, Mar. 1995.
16. DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.**, v.28, p.350-6, 1956. apud LO, S.; RUSSEL, J. C.; TAYLOR, A. W. Determination of glycogen in small tissue samples. **J. Appl. Physiol.**, v. 28, n. 2, p. 234-6, Feb. 1970.

17. EDGAR, W. M.; DODDS, M. W. The effect of sweeteners on acid production in plaque. **Int. dent. J.**, v. 35, n. 1, p. 18-22, Mar. 1985.
18. ERICKSON, P. R. et al. Estimation of the caries-related risk associated with infant formulas. **Pediatr. Dent.**, v. 20, n. 7, p. 395-403, Nov./Dec. 1998.
19. ERICKSON, P. R.; MAZHARI, E. Investigation of the role of human breast milk in caries development. **Pediatr. Dent.**, v. 21, n. 2, p. 86-90, Mar./Apr. 1999.
20. FASS, E. N. Is bottle feeding of milk a factor in dental caries? **J. Dent. Child.**, v. 29, n. 4, p. 245-51, 4th Quarter 1962.
21. FILLER, S. J. et al. Effect of immune bovine milk on Streptococcus mutans in human dental plaque. **Arch. oral Biol.**, v. 36, n. 1, p. 41-7, 1991.
22. FISBERG, M. et al. Aceitação e tolerância de leite de cabra em pré-escolares. **Pediatr. mod.**, v. 35, n. 7, p. 526-30, jul. 1999.

23. FRAIZ, F. C. Dieta e cárie na primeira infância. In: WALTER, L. R. F.; FERELLE, A.; ISSAO, M. **Odontologia para o bebê. Odontopediatria do nascimento aos 3 anos.** São Paulo, Artes Médicas, 1996. Cap. 7, p. 107-22.
24. FRANCO, G. **Tabela de composição química dos alimentos.** 9ª ed. São Paulo, Atheneu, 1999.
25. FROSTELL, G. Quantitative determination of acid productions from different carbohydrates in suspensions of dental plaque material. **Acta odont. scand.**, v. 22, n.4, p. 457-75, Oct. 1964.
26. GEDALIA, I. *et al.* Enamel softening with Coca-cola and rehardening with milk or saliva. **Amer. J. Dent.**, v. 4, n. 3, p. 120-22, June 1991.
27. GIBBONS, R. J. e van HOUTE, J. On the formation of dental plaques. **J. Periodontol.**, v. 44, n. 6, p. 347-60. June 1973.
28. GREEN, R. M.; HARTLES, R. L. The effect of diets containing different mono and disaccharides on the incidence of dental caries in the albino rat. **Arch. oral Biol.**, v. 14, n. 1, p. 235-41, Jan./June 1969.

29. GUDIEL-URBANO, M.; GOÑI, I. **Oligosacáridos de la leche humana. Papel en la salud y en el desarrollo del lactante.** Disponível na Internet
http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222001000400002&lng=es& 26 out. 2002.
30. HABIBIAN, M. et al. Dietary habits and dental health over the first 18 months of life. **Community Dent. oral Epidemiol.**, v. 29, n. 4, p. 239-46, Aug. 2001.
31. ISMAIL, A. I. The role of early dietary habits in dental caries development. **Spec. care Dentist.**, v. 18, n. 1, p. 40-5, Jan./Feb. 1998.
32. JENKINS, G. N.; FERGUNSON, D. B. milk and dental caries. **Brit. dent. J.**, v. 120, n. 17, p. 472-77, May 1966.
33. JENSEN, M. E. Diet and dental caries. **Dent. Clin. N. Amer.**, v. 43, n. 4, p. 615-33, Oct. 1999.
34. KASHKET, S.; YASKELL, T. Effectiveness of calcium lactate added to food in reducing intraoral demineralization of enamel. **Caries Res.**, v. 31, p. 429-33, 1997.

35. KOPARAL, E.; ERONAT, C.; ERONAT, N. In vivo assessment of dental plaque pH changes in children after ingestion of snack foods. **J. Dent. Child.**, v. 65, n. 6, p. 478-83, Nov./Dec. 1998.
36. KOULOURIDES, T. et al. Cariogenicity of nine sugars tested with an intraoral device in man. **Caries Res.**, v. 10, , p. 427-41, 1976.
37. KRACHER, C. M. Pouring rights. **Dent. Assist.**, v. 71, n. 2, p.26-32, Mar./Apr. 2002.
38. LEVINE, R. S. Milk, flavoured milk products and caries. **Br. dent. J.**, v. 191, n. 1, p. 20, July 2001.
39. LO, S.; RUSSEL, J. C.; TAYLOR, A. W. Determination of glycogen in small tissue samples. **J. Appl. Physiol.**, v. 28, n. 2, p. 234-6, Feb. 1970.
40. LOESCH, W. J. Role of Streptococcus mutans in human dental decay. **Microbiol. Rev.**, v. 50, n. 4, p. 353-80, Dec. 1986.
41. MALTZ, M. Cariologia. In: TOLEDO, O. A. **Odontopediatria. Fundamentos para a prática clínica.** 2. ed., São Paulo, Editorial Premier, 1996. Cap. 6, p. 105-33.

42. MARGOLIS, H. C.; DUCKWORTH, J. H.; MORENO, E. C. Composition of pooled resting plaque fluid from caries-free and caries-susceptible individuals. **J. dent. Res.**, v. 67, n. 12, p. 1468-75, Dec. 1988.
43. MARGOLIS, H. C. An assessment of recent advances in the study of the chemistry and biochemistry of dental plaque fluid. **J. dent. Res.**, v. 69, n. 6, p. 1337-42, June 1990.
44. MARGOLIS, H. C.; et al. Cariogenic potential of pooled plaque fluid from exposed root surfaces in humans. **Arch. oral Biol.**, v. 38, n. 2, p. 131-8, Feb. 1993.
45. MARSH, P. D. Microbiologic aspects of dental plaque and dental caries. **Den. Clin. N. Amer.**, v. 43, n. 4, p. 599-614, Oct. 1999.
46. MARTIN, L. M. A. Z. **Efeito do cloreto de cetilperidínio sobre a formação “in situ” e o metabolismo “in vitro” da placa dentária humana e o metabolismo da placa dentária produzida “in vitro” pelo S. mutans.** Bauru, 1988. 79 p. Tese (Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.
47. MATEE et al. Mutans streptococci and Lactobacilli in breast-fed children with rampant caries. **Caries Res.**, v. 26, n. 3, p. 183-7, 1992.

48. MATTOS-GRANER et al. Association between caries prevalence and clinical, microbiological and dietary variables in 1.0 to 2.5-years-old Brazilian children. **Caries Res.**, v. 32, n. 5, p.319-23, 1998.
49. MATTOS-GRANER, R. O. et al. Water-insoluble glucan síntesis by Mutans streptococcal strains correlates with caries incidence in 12–to–30-month-old children. **J. dent. Res.**, v. 79, n. 6, p. 1371-7, Jun. 2000.
50. MAZZEO, A. C. et al. Influencia do cacau e do leite na incidência de cárie em ratos. **Estomat. Cult.**, v. 15, n. 4, p. 1-4, out./dez. 1985.
51. McDOUGALL, W. A.; Effect of milk on enamel demineralization and remineralization in vitro. **Caries Res.**, v. 11, n. 3, p. 166-72, 1977.
52. MENDES DUARTE, P.; COPPI, L. C.; ROSALEN, P. L. Cariogenicidade e propriedades cariostáticas por diferentes tipos de leite – revisão. **Arch. latinoam. nutri.**, v. 50, n. 2, p. 113-20, jun. 2000.
53. MILLER et al. Effect of dietary calcium concentrations during gestation and lactation in the sow on milk composition and litter growth. (Abstract). **J. Anim. Sc.**, v. 72, n. 5, p. 1315-9, 1994. apud RODRIGUEZ RODRIGUEZ, M. C.; PIMENTEL H., E. C. ¿Puede la

- leche humana llegar a producir caries: por qué y cómo? **Acta odont. venez.**, v. 36, n. 1, p. 39-45, 1998.
54. MITOMA, M. et al. Passive immunization with bovine milk containing antibodies to a cell surface protein antigen-glucosyltransferase fusion protein protects rats against dental caries. **Infect. Immun.**, v. 70, n. 5, p. 2721-4, May 2002.
55. MOHAN, A. et al. The relationship between bottle usage/contet, age, and number of teeth with mutans streptococci colonization in 6-24-month-old children. **Community Dent. oral Epidem.**, v. 26, n. 1, p. 12-20, Feb. 1998.
56. MORENO, E. C.; MARGOLIS, H. C. Composition of human plaque fluid. **J. dent. Res.**, v. 67, n. 9, p. 1181-9, Sept. 1988.
57. MOROMI, N. et al. Estreptococos cariogénicos en la placa bacteriana dental y caries dental. **Estomatol. peru.**, v. 52, n. 1, p. 3-5, 1988.
58. MOYNIHAN, P. J. et al. Effect of glucose polymers in water, milk and a milk substitute on plaque pH in vitro. **Int. J. Paed. Dent.**, v. 6, n. 1, p. 19-24, Mar. 1996.

59. MOYNIHAN, P. The British Nutrition Foundation Oral Task Force Report – issues relevant to dental health professionals. **Brit. dent. J.**, v. 188, n. 6, p.308-12, Mar. 2000.
60. NASE, L. et al. Effect of long-term consumption of a probiotic bacterium, *Lactobacillus rhamnosus* GG, in milk on dental caries and caries risk in children. **Caries Res.**, v. 35, n. 6, p. 412-20, Nov./Dec. 2001.
61. OLIVEIRA, J. F. et al. Contribuição ao estudo do aleitamento materno. **Odontol. mod.**, v. 17, n. 9, p. 6-9, set. 1990.
62. ORNELLAS, A.; ORNELLAS, L. H. **Alimentação da criança. Nutrição aplicada.** São Paulo, Atheneu, 1970.
63. PATTO, G. D. et al. Produção de ácido in vitro por *Streptococos* mutans e correlação com a experiência de cárie. **Rev. Odont. UNESP**, v. 28, n. 2, p. 329-43, jul./dez. 1999.
64. PERES, R. C. R. et al. Cariogenicity of different types of milk: an experimental study using animal model. **Braz. dent. J.**, v. 13, n. 1, p. 27-32, 2002.

65. PETTI, S.; SIMONETTI, R.; SIMONETTI D'ARCA, A. The effect of milk and sucrose consupcion on caries in 6-to-11-year-old Italian schoolchildren. **Europ. J. Epidemiol.**, v. 13, n. 6, p. 659-64, Sept. 1997.
66. PINHEIRO, C. E. et al. Efeito dos extratos de guaraná e de Stévia Rebaudiana Bertoni (folhas), e do Esteviosídeo, sobre a fermentação e a síntese de polissacarídeos extracelulares insolúveis da placa dentária. **Rev. Odont. USP**, v. 1, n. 4, p. 9-13, out./dez. 1987.
67. PINHEIRO, C. E. et al Factors that influence the "in vitro" synthesis of extracellular insoluble polysaccharides of human dental plaque. **Rev. Odont. USP**, v. 3, n. 1, p. 258-61, jan./mar. 1989.
68. RAMOS-GOMEZ, F. J. et al. Assessment of early childhood caries and dietary habits in a population of migrant Hispanic children in Stockton, California. **J. Dent. Child.**, v. 66, n. 6, p. 395-403, Nov./Dec. 1999.
69. REYNOLDS, E. C.; JOHNSON, I. H. Effect of milk on caries incidence and bacterial composition of dental plaque in the rat. **Arch. oral Biol.**, v. 26, p. 445-51, 1981.

70. REYNOLDS, E. C. Anticariogenic complexes of amorphous calcium phosphate stabilized by casein phosphopeptides: a review. **Spec. care Dent.**, v.18, n. 1, p. 8-16, Jan./Feb. 1998.
71. RIPA, L. W. Nursing habits and decay in infants: nursing bottle caries. **J. Dent. Child.**, v. 45, n. 4, p.274-5, July/Aug. 1978.
72. RODRIGUEZ RODRIGUEZ, M. C.; PIMENTEL H., E. C. ¿Puede la leche humana llegar a producir caries: por qué y cómo? **Acta odont. venez.**, v. 36, n. 1, p. 39-45, 1998.
73. ROSE, R. K. Effects of an anticariogenic casein phosphopeptide on calcium diffusion in streptococcal model dental plaques. **Arch. oral Biol.**, v. 45, n. 7, p. 569-75, July 2000.
74. RUGG-GUNN, A. J.; ROBERTS, G. J.; WRIGHT, W. G. Effect of human milk on plaque pH in situ and enamel dissolution in vitro compared with bovine milk, lactose and sucrose. **Caries Res.**, v. 19, , p. 327-34, 1985.
75. SCHIMDT, H. F.; SCHLAF, U. In vitro studies on the acidifying effect of liquid baby food on dental plaque as compared with breast and cow's milk **Dtsch. Zahnarztl. Z.**, v. 45, n. 6, p. 367-70, Jun. 1990.

76. SEERIG, L. M.; MAINARDI, A. P. R.; OLIVEIRA, M. D. M. Cárie dentária em bebês. **Rev. Fac. odont. UPF**, v. 3, n. 1, p.13-22, jan./jun. 1998.
77. SHEN, P. et al. Remineralization of enamel subsurface lesions by sugar-free chewing gum containing casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate. **J. dent. Res.**, v. 80, n. 12, p. 2066-70, Dec. 2001.
78. SLAVKIN, H. C. Biofilms, microbial ecology and Antoni van Leeuwenhoek. **J. Amer. dent. Ass.**, v. 128, n. 4, p. 492-5, April 1997.
79. STEINBERG, D.; PORAN, S.; SHAPIRA, L. The effect of extracellular polysaccharides from *Streptococcus mutans* on the bacterial activity of human neutrophils. **Arch. oral Biol.**, v. 44, n. 5, p. 437-44, May 1999.
80. STRAETEMANS, M. M.; van LOVEREN, C. The new fight against *Streptococcus mutans*. **Ned. Tijdschr. Tandheelkd.**, v. 104, n. 10, p. 370-2, Oct. 1997.

81. TANAKA, M.; MATSUNAGA, K.; KADOMA, Y. Effect of rinse with calcium enriched milk on plaque fluid. **J. Med. Dent. Sci.**, v. 46, n. 3, p. 123-6, Sept. 1999.
82. THYLSTRUP, A.; FEJERSKOV, O. A dieta e o processo cariogênico. In: _____. **Cariologia clínica**. 2ª ed., Ed. Santos, São Paulo, 1995. Cap. 13, p. 283-310.
83. TINANOFF, N.; PALMER, C. A. Dietary determinants of dental caries and dietary recommendations for preschool children. **J. Publ. Hlth. Dent.**, v. 60, n. 3, p. 197-206, Summer 2000.
84. VACCA-SMITH, A. M.; BOWEN, W. H. The effect of milk and kappa casein on streptococcal glucosyltransferase. **Caries Res.**, v. 29, n. 6, p. 498-506, 1995.
85. van HOUTE, J. Bacterial specificity in the etiology of dental caries. **Int. dent. J.**, v.30, n.4, p.305-26, Dec. 1980.
86. van HOUTE, J. Role of micro-organisms in caries etiology. **J. dent. Res.**, v. 73, n. 3, p. 672-81, March 1994.

87. VILLAVICENCIO, V. V. **Avaliação do efeito inibidor de algumas soluções contendo fluoreto de sódio a 0,05% disponíveis no Mercado e da influência do pré-tratamento com fluoreto estanoso e fluoreto de sódio, sobre o metabolismo da placa dentária humana. (Estudo “in vitro”).** Bauru, 1989. 92 p. Tese (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.
88. WALTER, L. R. F.; FERELLE, A.; ISSAO, M. **Odontologia para o bebê. Odontopediatria do nascimento aos 3 anos.** São Paulo, Artes Médicas, 1996.
89. WEISS, M. E.; BIBBY, B. G. effects of milk on enamel solubility. **Arch. oral. Biol.**, v. 11, p. 49-57, 1966.
90. WEISS, M. E.; BIBBY, B. G. Some protein effects on enamel solubility. **Arch. oral Biol.**, v. 11, p. 59-63, 1966.

Abstract

Abstract

“Evaluation of the effects of human, cow and goat milk on the fermentation and synthesis of extracellular polysaccharides in human dental plaque – *in vitro* study”.

Several types of milk are consumed by human beings besides human milk, such as cow milk, goat milk, and others. Among several other components, the milk contains lactose, which is a disaccharide composed of glucose and galactose. Dental caries, as a multifactorial disease, requires a cariogenic substrate on which to develop, in addition to the bacteria present in dental plaque, which employ the dietary carbohydrates in their metabolism. Considering the high intake of milk by mankind and the clinical reports that suggest its participation in caries development, the present *in vitro* study evaluated the influence of three types of whole milk, namely human, cow and goat milk, on human dental plaque metabolism as to the capacity of fermentation and synthesis of extracellular polysaccharides. A “pool” of dental plaque obtained from 50 children aged 10 to 15 years old attending an institution in the city of Bauru was laboratory treated and submitted to biochemical studies specifically for the fermentation and synthesis of extracellular polysaccharides. The obtained results were submitted to one and two-way variance analysis (ANOVA) at a significance level of 5% and the

Tukey-Kramer test was employed to compare the different types of substrates. It was concluded that all three types of milk demonstrated *in vitro* fermentation and synthesis of extracellular polysaccharides. Goat milk presented the smallest level of fermentation, followed by cow milk and human milk. Concerning the synthesis of polysaccharides, the highest outcome was achieved for goat milk, followed by cow milk and human milk.

Anexos

Anexos

ANEXO 1 – Cópia do comitê de ética

ANEXO 2 – Cálculos para o teste da fermentação

ENDÓGENO

AMOSTRA	mg/mL de NaOH 0,05 M	ì g de NaOH
T 1a	$1,6 \times 2 = 3,2$	3200
T 1b	$1,3 \times 2 = 2,6$	2600
T 1c	$1,7 \times 2 = 3,4$	3400
T 1d	$1,8 \times 2 = 3,6$	3600
T 1e	$1,2 \times 2 = 2,4$	2400
Média da fermentação = 3040 ìg/mL de NaOH		

CONTROLE (glicose 2,5%)

AMOSTRA	mg/mL de NaOH 0,05 M	ì g de NaOH	FERMENTAÇÃO REAL (FR) Tx = média ferm. teste T1 = média ferm. endógeno FR = Tx - T1
T 2a	$2,0 \times 2 = 4,0$	4000	
T 2b	$1,6 \times 2 = 3,2$	3200	
T 2c	$1,9 \times 2 = 3,8$	3800	
T 2d	$1,8 \times 2 = 3,6$	3600	
T 2e	$1,7 \times 2 = 3,4$	3400	
Média = 3600			FR = 560 ìg/mL de NaOH

LEITE DE CABRA

AMOSTRA	mg/mL de NaOH 0,05 M	ì g de NaOH	FERMENTAÇÃO REAL (FR) Tx = média ferm. teste T1 = média ferm. endógeno FR = Tx - T1
Leite adoçado com glicose			
T 3	2,4 x 2 = 4,8	4800	
T 4	2,6 x 2 = 5,2	5200	
T 5	2,5 x 2 = 5,0	5000	
T 6	2,7 x 2 = 5,4	5400	
T 7	2,7 x 2 = 5,4	5400	
Média = 5160			
Leite			FERMENTAÇÃO REAL (FR) Tx = média ferm. teste T1 = média ferm. endógeno FR = Tx - T1
T 3 ^a	2,0 x 2 = 4,0	4000	
T 4 ^a	2,6 x 2 = 5,2	5200	
T 5 ^a	2,6 x 2 = 5,2	5200	
T 6 ^a	2,6 x 2 = 5,2	5200	
T 7 ^a	2,8 x 2 = 5,6	5600	
Média = 5040			
FR = 2000 ìg/mL de NaOH			

LEITE DE VACA

AMOSTRA	mg/mL de NaOH 0,05 M	ì g de NaOH	FERMENTAÇÃO REAL (FR) Tx = média ferm. teste T1 = média ferm. endógeno FR = Tx - T1
Leite adoçado com glicose			
T 3	3,0 x 2 = 6,0	6000	
T 4	2,9 x 2 = 5,8	5800	
T 5	3,0 x 2 = 6,0	6000	
T 6	3,0 x 2 = 6,0	6000	
T 7	2,8 x 2 = 5,6	5600	
Média = 5880			
			FR = 2840 ìg/mL de NaOH
Leite			
T 3 ^a	2,5 x 2 = 5,0	5000	FERMENTAÇÃO REAL (FR) Tx = média ferm. teste T1 = média ferm. endógeno FR = Tx - T1
T 4 ^a	3,0 x 2 = 6,0	6000	
T 5 ^a	3,0 x 2 = 6,0	6000	
T 6 ^a	3,0 x 2 = 6,0	6000	
T 7 ^a	2,8 x 2 = 5,6	5600	
Média = 5720			
			FR = 2680 ìg/mL de NaOH

LEITE DE MATERNO

AMOSTRA	mg/mL de NaOH 0,05 M	ì g de NaOH	FERMENTAÇÃO REAL (FR) Tx = média ferm. teste T1 = média ferm. endógeno FR = Tx - T1
Leite adoçado com glicose			
T 3	5,7 x 2 = 11,4	11400	
T 4	5,1 x 2 = 10,2	10200	
T 5	4,8 x 2 = 9,6	9600	
T 6	5,2 x 2 = 10,4	10400	
T 7	5,2 x 2 = 10,4	10400	
Média = 10400			
			FR = 7360 ìg/mL de NaOH
Leite			
T 3a	4,7 x 2 = 9,4	9400	FERMENTAÇÃO REAL (FR) Tx = média ferm. teste T1 = média ferm. endógeno FR = Tx - T1
T 4a	5,7 x 2 = 11,4	11400	
T 5a	5,1 x 2 = 10,2	10200	
T 6a	4,9 x 2 = 9,8	9800	
T 7a	5,0 x 2 = 10,0	10000	
Média = 10160			
			FR = 7120 ìg/mL de NaOH

ANEXO 3 - Cálculos para o teste da síntese de polissacarídeos extracelulares

Controle

Amostras	Leitura	Resultado (ig de glicose) Leitura x Fator (105,52)
Controle 1	0,276	29,12
Controle 2	0,315	33,23
Controle 3	0,298	31,44
Controle 4	0,286	30,17
Controle 5	0,288	30,38
Média = 30,86 µg de glicose		

Leite de Cabra

Amostras	Leitura	Resultado (ig de glicose) Leitura x Fator (105,52)
A 1	0,756	79,77
A 2	0,784	82,72
A 3	0,779	82,25
A 4	0,719	75,86
A 5	0,779	82,24
Média = 80,56 µg de glicose		

Leite de Vaca

Amostras	Leitura	Resultado (µg de glicose) Leitura x Fator (105,52)
A 1	0,710	74,97
A 2	0,716	75,60
A 3	0,750	79,13
A 4	0,684	72,17
A 5	0,751	79,24
Média = 76,22 µg de glicose		

Leite de Materno

Amostras	Leitura	Resultado (µg de glicose) Leitura x Fator (105,52)
A 1	0,557	58,77
A 2	0,534	56,34
A 3	0,536	56,55
A 4	0,488	51,54
A 5	0,571	60,30
Média = 56,70 µg de glicose		