Carolina Simonetti Lodi

EFEITO DE LEITES FERMANTADOS CONTENDO PROBIÓTICOS SOBRE O ESMALTE BOVINO E NO BIOFILME DENTAL FORMADO *IN SITU*.

Araçatuba – SP
2008

Carolina Simonetti Lodi

EFEITO DE LEITES FERMENTADOS CONTENDO PROBIÓTICOS SOBRE O ESMALTE BOVINO E NO BIOFILME DENTAL FORMADO *IN SITU*.

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de Araçatuba, para obtenção de título de Mestre em Odontopediatria.

Orientadora: Profª Drª Cleide Cristina Rodrigues Martinhon

ARAÇATUBA - SP
2008

Catalogação-na-Publicação

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

L823e

Lodi, Carolina Simonetti

Efeito dos probióticos sobre o esmalte bovino e no biofilme dental formado *in situ* / Caroliona Simonetti Lodi. - Araçatuba : [s.n.], 2008

89 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Araçatuba, 2008

Orientadora: Prof[a]. Dr[a]. Cleide Cristina Rodrigues Martinhon

1. Leite - Fermentação 2.Probióticos 3. Cárie dentária 4.Desmineralização

Black D27

CDD 617.645

Dados Curriculares

Carolina Simonetti Lodi

Nascimento	25.10.1978 – Bauru - SP
Filiação	Antônio Roberto Correa Lodi Vera Lígia Simonetti Lodi
2000/2003	Curso de Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Bauru, FOB-USP – Campus Bauru.
2004-2006	Curso de Especialização em Odontopediatria pelo Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, HRAC-USP
2006/2008	Curso de Pós Graduação em Odontopediatria, nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP
Associações	CROSP - Conselho Regional de Odontologia de São Paulo SBPqO - Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica

Dedico este trabalho,

Aos meus pais **ROBERTO** e **VERA**,

Pela confiança que depositam em mim... Exemplos de dedicação, honestidade, simplicidade, felicidade e amor. Agradeço por todos os momentos em que podemos estar juntos e pelas palavras de conforto que sempre trazem segurança e tranqüilidade.

Nada teria acontecido se eu não tivesse o apoio constante de vocês. Muitas vezes não fisicamente, mas em pensamentos e palavras;

A vocês dedico este trabalho, pois sem vocês eu nada seria.

Amo vocês!

Agradecimentos Especiais

À Deus,

Presente em todos os momentos da minha vida, protegendo-me e guiando meus passos nesse longo caminho rumo a grandes realizações. Devo a Ele todos os momentos de alegria e sucesso até aqui conquistado.

Muito obrigado pela companhia!

À Roberta e Rodrigo,
minha irmã e meu irmão,

Agradeço à Deus e meus pais por me concederem a bênção de ter dois irmãos.

Pessoas que fazem meu coração sorrir...

...Que não encontro todos os dias, mas que tenho a chance de dizer agora...

Para mim o que importa não é o que eu tenho na vida, mas quem eu tenho na vida... Por isso...

Guardo vocês dentro do meu coração....

Amo vocês!

Muito obrigado!

Ao João Eduardo,
Meu amor...

"Quando encontrar alguém e esse alguém fizer seu coração parar de funcionar por alguns segundos, preste atenção: pode ser a pessoa mais importante da sua vida.

Se os olhares se cruzarem e, neste momento, houver o mesmo brilho intenso entre eles, fique alerta: pode ser a pessoa que você está esperando desde o dia em que nasceu.

Se o toque dos lábios for intenso, se o beijo for apaixonante, e os olhos se encherem d'água neste momento, perceba: existe algo mágico entre vocês.
Se o primeiro e o último pensamento do seu dia for essa pessoa, se a vontade de ficar juntos chegar a apertar o coração, agradeça: Deus te mandou um presente."

Carlos Drummond de Andrade

Agradeço à Deus todos os dias por ter colocado você em minha vida....

Obrigada pelo companheirismo e apoio constante.

Amo muito você!

À minha querida orientadora,
Profª. Drª. Cleide Cristina Rodrigues Martinhon,

Agradecer é admitir que houve um momento em que se precisou de alguém; é reconhecer que ninguém jamais poderá lograr para si o dom de ser auto-suficiente. Ninguém e nada cresce sozinho; sempre é preciso um olhar de apoio, uma palavra de incentivo, um gesto de compreensão, uma atitude de amor...

Obrigada pela paciência, compreensão e carinho que dedicou à mim e a este trabalho. Pela confiança que depositou em mim e pela amizade eterna...

Minha imensa gratidão.

Ao Prof. Dr. Alberto Carlos Botazzo Delbem,

Aquela pessoa que quando deveria ser simplesmente professor, foi mestre. Que quando deveria ser mestre, foi amigo e em sua amizade me compreendeu e me incentivou a seguir em frente.

Obrigada pela colaboração constante.

À Profª. Drª. Kikue Takebayashi Sassaki,

Quando feito com amor, o trabalho permanece, modifica, transforma...

Admiro a forma carinhosa e a atenção que dispensa ao curso de Pós-graduação. A competência e dedicação ao trabalho e à pesquisa.

Obrigada pelas orientações sábias e práticas. Pela ajuda, disponibilidade e pela companhia agradável em vários momentos.

Ao meu avô Raphael,

Pela presença constante em minha vida e pelas palavras sempre doces e carinhosas, mesmo naqueles momentos em que achamos que nada mais tem sentido...

Pela maneira invejável que se dedica aos seus filhos e netos.

Amo você.

À Mariana e Donizeti,

Meus cunhados e irmãos de coração...

Pela convivência sempre alegre e feliz.

Vocês também são minha família.

À minha tia e madrinha Cristina,

Que me acolheu com tanto carinho quando aqui cheguei...

Meu muito obrigada.

À Alessandra e Marcelo,

Por terem me recebido como membro da família desde sempre.

Pela convivência alegre e divertida.

À aluna Michele Manareli,

Pela ajuda no desenvolvimento da parte experimental deste trabalho e pela amizade.

Muito Obrigada!

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba, na pessoa dos professores Dr. Pedro Felício Estrada Bernabé, digníssimo Diretor e Dra. Ana Maria Pires Soubhia, digníssima Vice-Diretora.

Ao Curso de Pós-Graduação em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba –UNESP, na pessoa do coordenador Prof. Dr. Robson Frederico Cunha e da vice-coordenadora Profª. Drª. Kikue Takebayashi Sassaki.

Aos docentes da Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, Prof. Dr. Alberto Carlos Botazzo Delbem, Prof. Dr. Célio Percinoto, Profª. Drª. Cleide Cristina Rodrigues Martinhon,, Prof. Dr. Robson Frederico Cunha, Profª. Drª. Rosângela dos Santos Nery, Profª. Drª. Sandra M. H. C. Ávila de Aguiar pelo carinho e atenção em todos os momentos.

Aos funcionários da Disciplina de Odontopediatria, Maria dos Santos Ferreira Fernandes e Mário Luis da Silva, pela amizade, auxílio indispensável e convivência tão especiais.

Aos queridos amigos da minha turma de Mestrado, Adriana, Gilberto, Renata e Vanessa, por estes dois anos de convivência, amizade e respeito. Vocês estarão sempre em meu coração.

Aos colegas da Pós-Graduação em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, Alessandra Cury, Alessandra Gomes, Ana Elisa, Ana Carolina Magalhães, Ana Carolina Zaze, Daniela, Denise, Eliana Rodrigues, Eliana Takeshita, Fernanda, Isabelle, Janaína, Juliano, Karina Bianco, Karina Mirela, Karine, Kélio, Leciana, Lílian, Luciana, Marcelo, Márcio, Mariana, Max Douglas, Rebeca, Simone, Taís e Tatyana pela convivência carinhosa e divertida.

Ao trio parada dura: Tati, Jana e Max pela amizade e pelo carinho que sempre tiveram comigo. Muito obrigada.

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, Ana Cláudia, Cláudio, Ivone, Izamar, Luzia, Maria Cláudia e Marina pela atenção e disponibilidade com que sempre me receberam.

Ao Diogo, Marina e Valéria da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, pelo profissionalismo, carinho e paciência.

Aos demais professores e funcionários da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP.

Aos amigos do Laboratório que sempre incentivaram, ajudaram e compreenderam o esforço na realização desse trabalho, Ana Elisa, Ana

Carolina Zaze, Ana Paula, Eliana Rodrigues, Eliana Takeshita, Fernanda, Jackeline, Karina Mirela, Kélio, Marcelle, Marcelo, Michele, Luciene, Tamara.

À Ana Carolina (Tuca), Fernanda Brighenti, Eliana Rodrigues e Eliana Takeshita por terem me aconselhado nos momentos iniciais da realização deste trabalho e quando me sentia completamente perdida em meio à dinâmica do laboratório.

Aos voluntário deste trabalho, Daniela, Eliana Takeshita, Isabelle, Jackeline, Marcelo, Maria Luiza, Pity, Simone, Tamara e Tuca pela imensa colaboração e compreensão durante a realização deste trabalho.

Às professoras e amigas do curso de Especialização do HRAC-USP, que de alguma forma contribuíram para que eu chegasse até aqui e que apesar da distância continuam guardadas na lembrança e no coração.

Ao Departamento de Ciências Básicas, por disponibilizar os equipamentos necessários, em especial, à Profª. Drª. Sandra Helena Penha de Oliveira e a técnica Rafaela pela atenção e amizade.

Ao Frigorífico Friboi, em especial, ao veterinário Henrique Borges, pela atenção e por ter permitido a coleta dos dentes bovinos.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro para a realização do Curso de Mestrado.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho,

...Meus sinceros agradecimentos.

"Paciência e perseverança tem o efeito mágico de fazer as dificuldades desaparecerem e os obstáculos sumirem."

John Quincy Adams

Epígrafe

SUMÁRIO

CAPÍTULO I 23

Avaliação de algumas propriedades dos leites fermentados que interferem na desmineralização do esmalte dental

RESUMO 25

ABSTRACT 26

INTRODUÇÃO 27

MATERIAL E MÉTODOS 28

Seleção da amostra 28

Determinação do pH 28

Determinação da capacidade tampão 29

Análise da concentração de flúor 29

Análise da concentração de cálcio 30

Análise estatística 30

RESULTADOS 31

DISCUSSÃO 31

REFERÊNCIAS 37

TABELAS E GRÁFICOS 41

CAPÍTULO II 44

Composição iônica do biofilme dental e avaliação da perda mineral do esmalte com a administração de probióticos

RESUMO 46

ABSTRACT 47

INTRODUÇÃO 48

MATERIAL E MÉTODOS 49

Seleção dos produtos 49

Seleção dos voluntários 50

Obtenção, preparo e seleção dos blocos de esmalte 50

Análise da microdureza 51

Regime experimental 52

Medição da acidogenicidade do biofilme 53

Protocolo para coleta do biofilme 53

Análise dos íons F, Ca, P e carboidratos álcali-solúveis 54

Análise estatística 54

RESULTADOS 55

DISCUSSÃO 56

REFERÊNCIAS 60

GRÁFICOS 63

ANEXOS 66

RESUMO

LODI, C S. **Efeito dos probióticos sobre o esmalte bovino e no biofilme dental formado *in situ*.** Araçatuba, 2008. 89 f. Dissertação (Mestrado)– Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2008.

Nas últimas décadas, tem se observado uma mudança substancial no hábito dietético das crianças, com um aumento crescente no consumo de produtos comercialmente disponíveis no mercado brasileiro, como os leites fermentados. Diante dessa realidade, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o pH, a capacidade tampão, conteúdo de flúor e de cálcio de alguns leites fermentados, bem como avaliar a acidogenicidade e a concentração dos íons flúor, cálcio, fósforo, carboidratos álcali-solúveis no biofilme dental formado *in situ*, além da desmineralização do esmalte dental bovino através do teste de microdureza superficial. Para análise bioquímica, foram utilizadas 6 marcas de leite fermentado desnatado adoçado (Parmalat®-uva, Chamyto®, Paulista®, Batavito®, Yakult®, Vigor Club®). O pH das amostras variou entre 3.51 e 3.87; a capacidade tampão variou de 470.8 a 804.2 µL da NaOH 1 mol L^{-1}; a concentração do íon flúor variou de 0.027 a 0.958 µg F/g e a concentração de cálcio apresentou uma variação de 0.4787 a 0.8177 mg Ca/g. Para o estudo *in situ*, selecionou-se 2 marcas de leite fermentado e dez voluntários que receberam dispositivos palatinos contendo 4 blocos de esmalte dental bovino durante três fases de 14 dias cada. Os resultados mostraram que as concentrações dos íons (F, Ca e P) foram significantemente maiores quando se realizou o tratamento C (Batavito®) em comparação aos tratamentos A (Yakult®) e B (sacarose 20%) ($p<0,05$), os quais não diferiram estatisticamente entre si. Os dois grupos experimentais (Batavito® e Yakult®) tiveram perdas maiores que o controle (Sacarose 20%), embora não tenham apresentado diferença significante entre si. Considerando-se os resultados deste estudo e a metodologia utilizada, pode-se concluir que embora tenha sido constatada a presença de íons como flúor e cálcio nos leites fermentados, as marcas comerciais Yakult® e Batavito® provocaram desmineralização do esmalte dental.

Palavras-chave: Leite-Fermentação, Probióticos, Cárie dentária, Desmineralização.

ABSTRACT

LODI, C S. **Effect of the probiotics on the bovine enamel and in the in situ dental plaque**. Araçatuba, 2008. 89 f. Dissertation (Master's degree) - School of Dentistry, São Paulo State University, Araçatuba, 2008.

In the last decades, it has been observed a substantial change in the children's dietary habit, with an increasing in the consumption of products commercially available in the Brazilian market, such as the fermented milks. Due to that reality, the aim of the present study was to evaluate the pH, buffering capacity, fluoride and calcium content of some fermented milks, as well as evaluating the concentration of the fluoride, calcium, phosphate, and alkali-soluble carbohydrates and the acidogenicity of the in situ dental plaque, besides the demineralization of the bovine dental enamel through the superficial microhardness test. For biochemical analysis, 6 brands of fermented milk were used (Parmalat®-grape, Chamyto®, Paulista®, Batavito®, Yakult®, Vigor Club®). The pH of the samples ranged from 3.51 to 3.87; the buffering capacity from 470.8 to 804.2 µL of NaOH 1 mol L^{-1}; the concentration of the ion fluoride from 0.027 to 0.958 µg F/g and the concentration of calcium from 0.4787 to 0.8177 mg Ca/g. For the *in situ* study, it were selected 2 fermented milks and ten volunteers who received palatine devices containing 4 blocks of bovine dental enamel during three phases of 14 days each. The results showed that the ionic concentrations (F, Ca and P) were significantly larger when the treatment C (Batavito®) took place in comparison to the treatments A (Yakult®) and B (sucrose 20%) ($p < 0,05$), which did not differ significantly amongst themselves. Batavito® and Yakult® had larger losses than the control (Sucrose 20%), although they have not presented significant difference amongst themselves. Considering the results of this study, it could be concluded that although the fluoride and calcium ions had been verified in the fermented milks the commercial brands Batavito® and Yakult® provoked demineralization of the dental enamel.

Keywords : Milk - Fermentation, Probiotics, Dental decay, Demineralization.

CAPÍTULO I

Avaliação de algumas propriedades dos leites fermentados que interferem na desmineralização do esmalte dental.

C. S. Lodi[a]
M. Manareli[a]
C. A. B. Delbem[a]
K. T. Sassaki[b]
F. C. Fraiz[c]
C. C. R. Martinhon[a]

[a] Departamento de Odontologia Social e Infantil, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista.
[b] Departamento de Ciências Básicas, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista.
[c] Departamento de Estomatologia, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Palavras-Chave: Leite – Fermentação, Probióticos, Cárie dentária, Desmineralização

Correspondência:

Cleide Cristina Rodrigues Martinhon
Departamento de Odontologia Infantil e Social
Faculdade de Odontologia de Araçatuba-Universidade Estadual Paulista
Rua José Bonifácio, 1193
16015-050-Araçatuba, São Paulo, Brasil
Tel. 55 18 3636-3235
e-mail: cleidecristina@foa.unesp.br

RESUMO

Nas últimas décadas, tem se observado uma mudança substancial no hábito dietético das crianças, com um aumento crescente no consumo de produtos comercialmente disponíveis no mercado brasileiro, como os leites fermentados. Diante dessa realidade, o objetivo do presente trabalho foi avaliar algumas propriedades dos leites fermentados que podem interferir com a dissolução do esmalte dentário através da análise do: pH, capacidade tampão, conteúdo de flúor e de cálcio. Foram analisados 3 lotes diferentes de 6 marcas de leite fermentado desnatado adoçado (Parmalat®-uva, Chamyto®, Paulista®, Batavito®, Yakult®, Vigor Club®). A medição do pH foi realizada com eletrodo de pH 2A09E – Analyser, acoplado ao potenciômetro Orion 290A. Para determinar a capacidade tampão foram coletados 5 mL de cada produto e determinado seu pH inicial. A partir daí, alíquotas de 25µL de NaOH 1 mol L^{-1} foram acrescentadas até que a amostra atingisse pH 7.0. A concentração de flúor foi analisada pelo eletrodo íon específico após microdifusão facilitada por HMDS (Método de TAVES modificado por Whitford, 1996) e a concentração de cálcio através do teste colorimétrico (espectofotômetro – HITACHI U-2000) pelo método da cresolftaleína (Kit Bioclin®). O pH das amostras variou entre 3.51 e 3.87; a capacidade tampão variou de 470.8 a 804.2 µL da NaOH 1 mol L^{-1}; a concentração do íon flúor variou de 0.027 a 0.958 µg F/g e a concentração de cálcio apresentou uma variação de 0.4788 a 0.8175 mg Ca/g. Considerando-se os resultados deste estudo, pode-se concluir que o pH dos produtos analisados foi baixo, além disso, a capacidade tampão foi elevada, características que podem promover desmineralização do esmalte dental. Por outro lado, constatou-se a presença de íons flúor e cálcio que podem diminuir a dissolução da estrutura dentária provocada por substâncias ácidas.

Palavras-chave: Leite - Fermentação, Probióticos, Cárie dentária, Desmineralização.

ABSTRACT

In the last decades, it was observed a substantial changing in the children's dietary habit, with an increasing in the consumption of products commercially available in the Brazilian market, such as the fermented milks. Facing that reality, the aim of the present study was to evaluate some properties of the fermented milks that can interfere with the dissolution of the dental enamel through the analysis of the: pH, buffering capacity, fluoride and calcium content. Three different lots from 6 fermented milk brands were analyzed (Parmalat®-grape, Chamyto®, Paulista®, Batavito®, Yakult®, Vigor Club®). The evaluation of the pH was accomplished using the 2A09E - Analyzer coupled to the Orion 290A potentiometer. The buffering capacity was determined using the initial pH from 5 mL of each product and then 25µL of NaOH 1 mol L^{-1} were added until reaching neutral pH. Fluoride concentration was analyzed by the ion specific electrode after hexamethyldisiloxane-facilitated diffusion (TAVES' Method modified by Whitford, 1996) and the calcium concentration through the colorimeteric test (Spectrophotometer - HITACHI U-2000) for the method of the cresolphtalein (Bioclin® Kit). The samples pH ranged from 3.51 to 3.87; the buffering capacity from 470.8 to 804.2 µL of NaOH 1 mol L^{-1}; the fluoride concentration from 0.027 to 0.958 µg F/g and the calcium concentration from 0.4787 to 0.8177 mg Ca/g. From the results of this study, it was concluded that the pH of the analyzed products was low, besides, the buffering capacity was elevated, characteristics that can promote demineralization of the dental enamel. On the other hand, it was verified the presence of fluoride and calcium ions which can reduce the dissolution of the dental structure reached by acid substances.

Keywords: Milk -Fermentation, Probiotics, Dental decay, Demineralization.

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas tem-se ampliado a oferta dos leites fermentados (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística-IBGE de 2002/2003). Seu consumo pode ter sido estimulado devido aos benefícios dos probióticos para a saúde geral como, por exemplo, no tratamento de doenças gastrointestinais (Sulliva e Nord, 2005; Lara-Villoslada et al, 2007; de Vrese e Marteau , 2007; Young e Huffman, 2003) e doenças alérgicas (Ouwehand, 2007; Young e Huffman, 2003). O leite fermentado também é conhecido como probiótico que é caracterizado pela presença de microorganismos vivos, e quando administrado em quantidade adequada conferem benefícios à saúde (Sullivan e Nord, 2005; Matsumoto et al, 2005).

A maioria dos leites fermentados contém açúcares, pH ácido e *Lactobacillus* ou *Bifidobacterium* que produzem ácidos orgânicos. Estas características podem facilitar a aderência à superfície dentária do *Lactobacillus* e o desenvolvimento de cárie dental (Matsumoto et al, 2005). Na literatura odontológica poucos são os trabalhos a respeito do potencial cariogênico do leite fermentado. Shibata e colabs, em 1977, estudaram os efeitos de dois leites fermentados, "Yakult" e "Calpis", na cárie em hamsters e ratos. Os resultados indicaram que a administração contínua das bebidas promoveu lesões de cárie nos animais. Além disso, pode ser observada a indução de lesões erosivas no esmalte de molares (Shibata et al, 1977). No entanto, como são produtos derivados do leite, apresentam em sua composição

minerais como o cálcio e o fosfato, sendo que o simples acréscimo destes minerais às bebidas ácidas reduz o efeito erosivo dessas substâncias (Hay et al, 1962).

Diante do aumento no consumo desses produtos, o direcionamento das campanhas publicitárias para o público infantil (período de maior risco ao desenvolvimento de lesões de cárie) e a escassez de trabalhos relacionando o consumo de leites fermentados com as condições de saúde bucal; o objetivo do presente trabalho foi avaliar algumas propriedades dos leites fermentados que podem interferir com a dissolução do esmalte dentário através da análise do: pH, capacidade tampão, conteúdo de flúor e de cálcio.

MATERIAL E MÉTODOS

1 Seleção das amostras

Foram adquiridos 3 lotes de 6 marcas diferentes de leite fermentado desnatado adoçado disponíveis no mercado para a análise de suas propriedades físico-químicas. (Tabela 1)

Todos os produtos foram comprados e armazenados de acordo com as especificações do fabricante.

2 Determinação do pH

O pH dos produtos foi determinado imediatamente após a abertura das embalagens, em temperatura ambiente, utilizando o eletrodo de pH 2A09E – Analyser, acoplado ao potenciômetro Orion 290A. Antes da leitura, o eletrodo foi calibrado com os padrões pH 7,0 e 4,0. Uma alíquota dos produtos foi colocada em

frascos J7 (Injeplast) onde se realizou a leitura do pH com o frasco posicionado em um agitador (Tecnal TE-081).

3 Determinação da Capacidade Tampão

Para determinar a capacidade tampão foram coletados 5 ml de cada produto em frasco J10 (Injeplast), em duplicata, e determinado seu pH inicial. A partir daí, alíquotas de 25µL de NaOH 1 mol L^{-1} foram acrescentadas até que a amostra atingisse pH 7.0 (Edwards et al, 1999).

4 Análise da concentração de flúor

A análise de flúor foi feita após microdifusão facilitada por HMDS (hexametildisiloxano), pelo método de TAVES (1968), modificado por WHITFORD (1996). Para tanto, 1 mL da bebida foi colocado numa placa de Petri (Falcon 1007), juntamente com 1,1 mL de água deionizada. Na tampa das placas, foi colocado 50 µL de NaOH 0,05 mol L^{-1}, distribuídos em 6 gotas. As placas foram então fechadas, vedadas com vaselina e, por um orifício feito previamente na tampa, foram colocados 2.1 mL de HMDS (Aldrich, saturado em ácido sulfúrico 3 mol L^{-1}). O orifício foi imediatamente vedado com vaselina e parafilme. As placas foram colocadas então numa mesa agitadora orbital plana (Tecnal, modelo TE 420) em velocidade 2-3, durante a noite. No dia seguinte, as tampas foram removidas, invertidas e as gotas de NaOH foram combinadas

numa única gota. O NaOH foi tamponado pela adição de 25 µL de ácido acético 0.2 mol L^{-1}. O volume total foi então ajustado para 75 µL com água deionizada usando uma pipeta. A gota, que continha todo o flúor da bebida foi analisada com o eletrodo íon-específico (Orion 9409) e um microeletrodo de referência calomelano (Accumet, número de catálogo #13-620-79), ambos acoplados ao potenciômetro Orion EA 720A. Durante a leitura, os dois eletrodos foram mantidos unidos através de bandas de borracha e colocados em contato com a gota na parte interna da tampa da placa.

5 Análise da concentração de cálcio

A concentração de cálcio foi analisada através do teste colorimétrico (espectofotômetro – HITACHI U-2000) pelo método da cresolftaleína (Kit Bioclin®). Para isso, a amostra de cada leite fermentado foi diluída 10 vezes utilizando 0.1 mL do leite fermentado e 0.9 mL de água deionizada. Desse volume coletou-se 0.1 mL e foi acrescentado 1.0 mL do reagente de trabalho (tampão + reagente de cor), esperou-se 20 minutos para iniciar o teste colorimétrico no espectofotômetro. O zero do aparelho foi ajustado com o branco e a leitura das amostras foi realizada em duplicata.

6 Análise estatística

Foi utilizado estatística descritiva para análise dos dados.

RESULTADOS

O pH das amostras variou entre 3.51 e 3.87 como mostra a Tabela 2. O produto que apresentou o menor pH foi da marca Yakult® e o maior da Batavito®.

O leite fermentado que apresentou a menor capacidade tampão foi o Parmalat®-uva. A este produto foram adicionados 470.8 µL de NaOH 1 mol L^{-1} para que atingisse pH 7.0. Já ao Paulista® foram acrescentados 804.2 µL de NaOH 1 mol L^{-1} até que este alcançasse pH 7.0, ou seja, foi o produto que apresentou maior capacidade tampão. (Tabela 2)

A concentração do íon flúor variou de 0.027 a 0.958 µg F/g conforme mostra a Tabela 2 . A marca Vigor Club® apresentou a maior concentração de flúor e a Parmalat®-uva a menor.

Com relação ao íon cálcio, pode-se encontrar uma variação de 0.4788 a 0.8175 mg Ca/g como mostra a Tabela 3 . Sendo que o leite fermentado da marca Batavito® foi o que apresentou a maior concentração de cálcio e o Parmalat®-uva a menor.

Pode ser observado relação direta (r= 0.9308) com significância de 0.0084 do pH com a capacidade tampão (Gráfico 1).

DISCUSSÃO

Diversos trabalhos têm mostrado os benefícios do consumo de probióticos para a saúde geral (Sullivan e Nord, 2005; Lara-Villoslada et al, 2007; de Vrese e

Marteau, 2007) sendo que alguns investigaram a sua relação com a saúde bucal (Matsumoto et al, 2005; Hay et al, 1962; Shibata et al, 1977).

O baixo pH dos leites fermentados pode estar associado com o aparecimento de lesão de cárie e de erosão na cavidade bucal como demonstrou Shibata et al (1977) em trabalho que avaliou o efeito da administração contínua de leite fermentado "Yakult" e "Calpis" em ratos e hamsters. Foi observado o aparecimento de lesão de cárie e erosão no esmalte de molares dos animais.

Como pode ser verificado em nosso trabalho todos os leites fermentados analisados apresentaram um pH baixo (Tabela 2) e esta é uma característica preditora de dissolução da estrutura dental segundo relatos da literatura (Edwards et al, 1999; Meurman et al, 1990; Smith e Shaw, 1987; Johansson et al, 1997; Jensdottir et al, 2004; Dawes, 2003). Entretanto, tal característica não pode ser atribuída aos alimentos levando em consideração apenas o pH. Outros fatores também devem ser considerados como propriedades física e química que interferem na adesão à superfície dental (Ireland et al, 1995), o estímulo do fluxo salivar (Lussi et al, 2000), a capacidade tampão da bebida (Creanor et al, 1995), e a presença de íons como flúor, cálcio e fósforo (Hadwick, 1950; Besic, 1953).

No presente estudo, além do pH, também foram analisadas a capacidade tampão e a concentração de flúor e de cálcio dos leites fermentados desnatados e adoçados. A capacidade tampão de uma substância está relacionada com a sua capacidade de resistir às mudanças de pH. Tendo em vista tal propriedade

verificou-se que o leite fermentado Paulista® apresentou a maior capacidade tampão, sendo necessário 804.2 µL de NaOH 1 mol L^{-1} para atingir o pH neutro. Observou-se uma relação direta (r= 0.9308) com significância de 0.0084 do pH com a capacidade tampão (Gráfico 1), resultado corroborado com os de Edwards et al (1999), de onde podemos inferir que quanto menor o pH de uma bebida maior é sua capacidade tampão permanecendo o ácido por um tempo maior na cavidade bucal.

A avaliação da concentração de flúor se justifica por ser um agente importante na prevenção da formação de lesão cariosa, condição que ocorre na presença de ambiente ácido (Clarkson et al, 1996), principalmente através de sua ação tópica (Burt e Marthaler, 1996). Baseado nesse conhecimento parece razoável dizer que o flúor poderia proteger o esmalte contra o ataque ácido. No entanto, apesar do ácido ser importante tanto para o desenvolvimento da lesão de cárie como para o aparecimento da erosão, ambos são condições e processos bastante diferentes. Na cárie o fluoreto pode exercer vários papéis como a redução da desmineralização do esmalte e estimulação da remineralização (ten Cate e Featherstone, 1996). Somando-se a isso, o flúor pode se concentrar no biofilme, e assim, ficar disponível por longos períodos na cavidade bucal (Rolla e Ekstrand, 1996). A adição de flúor à solução não altera seu pH, embora exerça um papel protetor diminuindo a erosão dental (Hughes et al, 2004). Mas deve-se lembrar, que uma vez o evento ocorrido, a presença do flúor não é capaz de promover a

remineralização diferentemente do que ocorre na lesão cariosa (Dawes, 2003). Embora nenhuma embalagem dos produtos testados indicasse a presença de fluoreto pode-se observar em nosso trabalho que todos os produtos apresentaram flúor em sua composição. Considerando que a dose ótima de ingestão de flúor para se evitar a fluorose dental é de 0.05-0.07mgF/Kg/dia, pode-se observar que a maioria (Parmalat®-uva, Chamyto®, Paulista®, Batavito®, Yakult®) mostraram baixas concentrações de flúor, com exceção da marca Vigor Club® que indicou uma concentração média de 0.958 µg F/g. Várias pesquisas vêm sendo realizadas para investigar a concentração de flúor nos alimentos no Brasil (Buzalaf et al, 2003; Buzalaf et al, 2002; Buzalaf et al, 2006; Buzalaf et al, 2004; Lodi et al 2007). Em estudo recente pode ser verificado a presença de flúor em todos os tipos de leite analisados, sendo que no Toddynho Vitaminado (Nestlé®) foi encontrado 1.6 µg F/mL (Buzalaf et al 2006). Podemos sugerir, de acordo com trabalhos da literatura (Dawes , 2003; Hughes et al, 2004; ten Cate e Duijsters, 1983), que a presença de fluoreto confere um efeito protetor à solução, mas torna-se importante ressaltar que as altas concentrações de flúor em bebidas e alimentos infantis podem oferecer risco de fluorose dental quando se considera a ingestão concomitante de outras fontes de flúor.

A análise de cálcio foi realizada, pois a adição de minerais, que contém cálcio e fósforo em sua composição, em bebidas e alimentos tem sido sugerida com o intuito de promover uma redução no potencial cariogênico e erosivo desses

alimentos (Hadwick, 1950; Besic, 1953; Hughes, 1999). A adição de cálcio às soluções ácidas é preferível ao fósforo, pois quando se comparou a mesma concentração de ambos o cálcio mostrou-se mais eficiente na prevenção da erosão (Hughes, 2004). Além disso, a adição de cálcio não altera o sabor do alimento, diferentemente do fósforo que pode dar um gosto metálico aos alimentos (Jensdottir et al, 2005). A adição de cálcio e fosfato a soluções ácidas mudou a aparência do ataque ácido ao esmalte humano e mostrou-se mais eficiente em seu efeito protetor quando suas concentrações foram aumentadas (Grobler et al, 1985). Estudos *in situ* confirmaram o efeito protetor do cálcio e a vantagem em diminuir a erosão dental provocada por bebidas ácidas (Hughes et al, 1999; Hughes et al, 1999; West et al, 1999). Todos os leites fermentados analisados neste trabalho apresentaram cálcio em sua composição, mas podem-se observar diferenças entre os valores indicados na embalagem e aqueles obtidos com o teste. A maioria (Chamyto®, Paulista®, Batavito®, Yakult®, Vigor Club®) apresentou uma diferença pequena entre ambos os valores, com exceção da marca Parmalat®-uva que apresentou um coeficiente de variação (%) de -40,15% (Tabela 3).

Sabendo-se que na cavidade bucal existem outros fatores que podem interagir com as propriedades investigadas, como por exemplo, a ação da saliva, sugere-se a realização de um estudo *in situ* para que se possa avaliar com maior fidelidade a ação desses produtos nos processos de desmineralização do esmalte.

Considerando-se os resultados deste estudo, pode-se concluir que todos os produtos analisados apresentaram pH baixo associado a uma capacidade tampão elevada, características estas que podem promover desmineralização do esmalte dental. Por outro lado, constatou-se a presença de íons flúor e cálcio que podem diminuir a dissolução da estrutura dentária provocada por substâncias ácidas.

REFERÊNCIAS

IBGE: Persquisa de Orçamentos Familiares. www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2002analise/defaulttab_.shtm, 2002-2003

Besic FC: Caries-like enamel changes by chemical means. J Dent Res 1953; 32:830-9.

Buzalaf MA, Granjeiro JM, Duarte JL, Taga ML: Fluoride content of infant foods in Brazil and risk of dental fluorosis. ASDC J Dent Child 2002;69:196-200, 125-6.

Buzalaf MA, Granjeiro JM, Cardoso VE, da Silva TL, Olympio KP: Fluorine content of several brands of chocolate bars and chocolate cookies found in Brazil. Pesqui Odontol Bras 2003;17:223-7.

Buzalaf MA, de Almeida BS, Cardoso VE, Olympio KP, Furlani T de A: Total and acid-soluble fluoride content of infant cereals, beverages and biscuits from Brazil. Food Addit Contam 2004;21:210-5.

Buzalaf MAR, Pessan JP, Fukushima R, Dias S A, Rosa HM: Fluoride content of UHT milks commercially available in Bauru, Brazil. J Appl Oral Sci 2006;14:38-42.

Clarkson BH, Fejerskov O, Ekstrand J, Burt BA: Rational use of fluorides in caries control. In: Fejerskov O, Ekstrand J and Burt BA eds. Fluoride in Dentistry. Copenhagen: Munksgaard; 1996, pp 347.

Creanor SL, Ferguson JF, Foye RH: Comparison of cariogenic potencial of caloric and non-caloric carboneted drinks. J Dent Res 1995;74:873.

Dawes C: What is the critical pH and why does a tooth dissolve in acid? J Can Dent Assoc 2003;69:722-4.

de Vrese M, Marteau PR: Probiotics and prebiotics: effects on diarrhea. J Nutr 2007;137:803-11.

Edwards M, Creanor SL, Foye RH, Gilmour WH: Buffering capacities of soft drinks: the potential influence on dental erosion. J Oral Rehabil 1999;26:923-927.

Grobler SR, Jenkins GN, Kotze D: The effects of the composition and method of drinking of soft drinks on plaque pH. Br Dent J 1985;158:293-6.

Hadwick JL: Enamel caries; a chemico-physical hypothesis; phase one, chemical. Br Dent J 1950;89:1-6.

Hay DI, Pinsent BRW, Schram CJ, Wagg BJ: The protective effect of calcium and phosphate ions against acid erosion of dental enamel and dentine. Br Dent J 1962;112:283-287.

Hughes JA, West NX, Addy M: The protective effect of fluoride treatments against enamel erosion in vitro. J Oral Rehabil 2004;31:357-63.

Hughes JA, West NX, Parker DM, Newcombe RG, Addy M: Development and evaluation of a low erosive blackcurrant juice drink in vitro and in situ. 1. Comparison with orange juice. J Dent 1999;27:285-9.

Hughes JA, West NX, Parker DM, Newcombe RG, Addy M: Development and evaluation of a low erosive blackcurrant juice drink. 3. Final drink and concentrate, formulae comparisons in situ and overview of the concept. J Dent 1999;27:345-50.

Ireland AJ, McGuinness N, Sherriff M: An investigation into the ability of soft drinks to adhere to enamel. Caries Res 1995;29:470-6.

Jensdottir T, Arnadottir IB, Thorsdottir I, Bardow A, Gudmundsson K, Theodors A, Holbrook WP: Relationship between dental erosion, soft drink consumption, and gastroesophageal reflux among Icelanders. Clin Oral Investig 2004;8:91-6.

Jensdottir T, Bardow A, Holbrook P: Properties and modification of soft drinks in relation to their erosive potential in vitro. J Dent 2005;33:569-75.

Johansson AK, Johansson A, Birkhed D, Omar R, Baghdadi S, Khan N, Carlsson GE: Dental erosion associated with soft-drink consumption in young Saudi men. Acta Odontol Scand 1997;55:390-7.

Lara-Villoslada F, Sierra S, Boza J, Xaus J, Olivares M: Beneficial effects of consumption of a dairy product containing two probiotic strains, Lactobacillus coryniformis CECT5711 and Lactobacillus gasseri CECT5714 in healthy children. Nutr Hosp 2007;22:496-502.

Lodi CS, Ramires I, Pessan JP, Neves LT, Buzalaf MAR: Fluoride concentrations in industrialized beverages consumed by children in the city of Bauru, Brazil. J. Appl Oral Sci 2007; 15:209-212.

Lussi A, Kohler N, Zero D, Schaffner M, Megert B: A comparison of the erosive potential of different beverages in primary and permanent teeth using an in vitro model. Eur J Oral Sci 2000;108:110-4.

Matsumoto M, Tsuji M, Sasaki H, Fujita K, Nomura R, Nakamo K, Shintani S, Ooshima T: Cariogenicity of the probiotic bacterium *Lactobacillus salivarius* in rats. Caries Res 2005;39:479-483.

Meurman JH, Härkönen M, Näveri H, Koskinen J, Torkko H, Rytömaa I, Järvinen V,Turunen R: Experimental sports drinks with minimal dental erosion effect. Scand J Dent Res 1990;98:120-8.

Ouwehand AC: Antiallergic effects of probiotics. J Nutr 2007;137:794-7.

Rolla G, Ekstrand J: Fluoride in oral fluids and dental plaque. In: Fejerskov O, Ekstrand J and Burt BA eds. Fluoride in Dentistry. Copenhagen: Munksgaard; 1996; pp 215.

Shibata H, Takehara T, Nara Y, Imazato M, Inoue M, Morioka T: Caries-promoting properties of fermented milk beverages containing live or killed lactobacillus. Koku Eisei Gakkai Zasshi (abstract) 1977;27:46-58.

Smith AJ, Shaw L: Baby fruit juices and tooth erosion. Br Dent J 1987;162:65-7.

Sullivan A, Nord CE: Probiotics and gastrointestinal diseases. J Intern Med 2005;257:78-92.

Taves DR: Electrophoretic mobility of serum fluoride. Nature 1968:220:582-3.

ten Cate JM, Duijsters PP: Influence of fluoride in solution on tooth demineralization. I. Chemical data. Caries Res 1983;17:193-99.

ten Cate JM, Featherstone JDB: Physicochemical aspects of fluoride-enamel interactions. In: , Fejerskov O, Ekstrand J and Burt BA eds. Fluoride in Dentistry. Copenhagen: Munksgaard; 1996; pp 252.

West NX, Hughes JA, Parker DM, Newcombe RG, Addy M: Development and evaluation of a low erosive blackcurrant juice drink. 2. Comparison with a conventional blackcurrant juice drink and orange juice. J Dent 1999:27:341-4.

Whitford GM: The metabolism and toxicity of fluoride. Monogr Oral Sci 1996;16 Rev2:1-153.

Young RJ, Huffman S: Probiotic use in children. J Pediatr Health Care 2003;17:277-83.

Normatização segundo o periódico Caries Research (Anexo M)

Tabela 1: Especificações dos produtos, local de produção e lote.

Produtor	Produto	Local de Produção	Lote
Parmalat	Leite fermentado desnatado adoçado-uva	Carambeí - PR	T3 M1 N1
Nestlé	Leite fermentado desnatado adoçado Chamyto-baunilha	Araras – SP	7078132315 7071132315 7068132312
Paulista	Leite fermentado desnatado adoçado - baunilha	Poços de Caldas - MG	L 13:03 S3 L 15:48 S3 L04:52 S3
Batavo	Leite fermentado desnatado adoçado Batavito-laranja e frutas cítricas	Carambeí - PR	L094 L103 L063
Yakult	Leite fermentado desnatado adoçado Yakult	São Paulo - SP	57 26 90
Vigor	Leite fermentado desnatado adoçado Vigor Club-baunilha	Lorena - SP	3 2 3

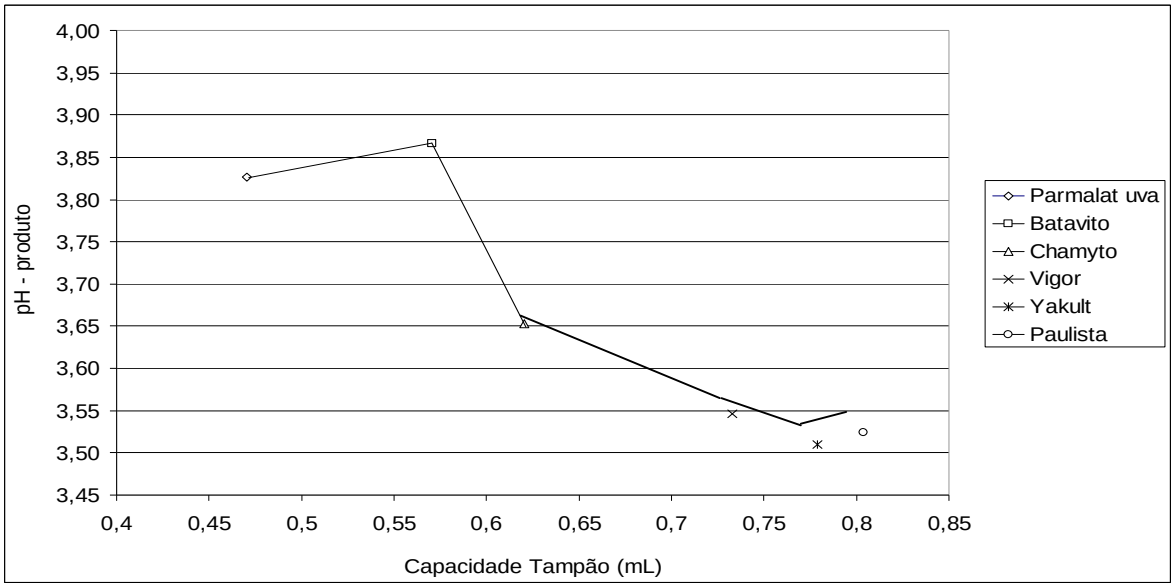
Tabela 2: Média e desvio padrão do pH, capacidade tampão e concentração de flúor dos três lotes nos diferentes produtos.

Produto	pH	Capacidade Tampão (µL)	Concentração de F (µgF/mL)
Parmalat®-uva	3.83±0.0231	470.8±19.09	0.027±0.0051
Chamyto®	3.65±0.0058	620.8±19.09	0.246±0.0231
Paulista®	3.52±0.0058	804.2±19.09	0.196±0.0210
Batavito®	3.87±0.0153	570.8±7.22	0.029±0.0011
Yakult®	3.51± 0.0265	779.2±52.04	0.148±0.0508
Vigor Club®	3.54± 0.1270	733.3±40.18	0.958±0.1895

Tabela 3: Média da concentração de cálcio e coeficiente de variação nos três lotes dos diferentes produtos.

Produto	Concentração de Ca (mg Ca/g) na embalagem	Concentração de Ca (mg Ca/g) no teste	Coeficiente de variação (%)
Parmalat®-uva	0.8000	0.4788±0.0607	-40.15
Chamyto®	0.7375	0.8054±0.0197	9.21
Paulista®	0.7385	0.7295±0.0278	-1.22
Batavito®	0.8000	0.8175±0.0165	2.18
Yakult®	0.8625	0.7211±0.0330	-16.39
Vigor Club®	0.8250	0.7426±0.0641	-9.99

Gráfico 1: Relação do pH com a capacidade tampão dos diferentes produtos analisados.



r=0.9308; p=0.0084

CAPÍTULO II

Composição iônica do biofilme dental e avaliação da perda mineral do esmalte com a administração de leite fermentado contendo probióticos.

C. S. Lodi[a]
M. Manareli[a]
C. A. B. Delbem[a]
K. T. Sassaki[b]
F. C. Fraiz[c]
C. C. R. Martinhon[a]

[a] Departamento de Odontologia Social e Infantil, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista.
[b] Departamento de Ciências Básicas, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista.
[c] Departamento de Estomatologia, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Palavras-Chave: Leite – Fermentação, Probióticos, Cárie dentária, Desmineralização

Correspondência:

Cleide Cristina Rodrigues Martinhon
Departamento de Odontologia Infantil e Social
Faculdade de Odontologia de Araçatuba-Universidade Estadual Paulista
Rua José Bonifácio, 1193
16015-050-Araçatuba, São Paulo, Brasil
Tel. 55 18 3636-3235
e-mail: cleidecristina@foa.unesp.br

RESUMO

Um número crescente de produtos contendo bactérias probióticas está disponível para consumo no mercado, e estes quando administrados em quantidades adequadas, confere benefícios à saúde do hospedeiro. O objetivo deste trabalho foi avaliar *in situ* a concentração dos íons flúor, cálcio, fósforo e carboidratos álcali-solúveis no biofilme dental, bem como a desmineralização do esmalte dental bovino através do teste de microdureza superficial. Dez voluntários receberam dispositivos palatinos contendo 4 blocos de esmalte dental bovino durante três fases de 14 dias cada. Em cada uma das fases, o tratamento foi realizado com o leite fermentado A (Tratamento A), solução de sacarose 20% (Tratamento B) ou leite fermentado C (Tratamento C). Ao final de cada fase, o biofilme dental formado foi coletado, processado e a concentração iônica analisada. Para avaliação da perda mineral, a microdureza inicial e final foram determinadas. Os resultados mostraram que as concentrações dos íons (F, Ca e P) foram significantemente maiores quando se realizou o tratamento C em comparação aos tratamentos A e sacarose 20% (Tratamento B –Grupo Controle) ($p<0,05$), os quais não diferiram estatisticamente entre si. Os dois grupos experimentais (Tratamentos A e C) tiveram perdas maiores que o controle, embora não tenham apresentado diferença significante entre si. Concluiu-se que embora todos os tratamentos realizados tenham produzido desmineralização na superfície do esmalte, o tratamento C foi aquele que ofereceu perda mineral significativemente menor em relação à sacarose 20%, entretanto sem diferença significante em relação ao tratamento A, bem como, aquele que apresentou a maior concentração de íons flúor, cálcio e fosfato e menor concentração de carboidratos álcali-solúveis no biofilme dental.

Palavras-chave: Leite - Fermentação, Probióticos, Cárie dentária, Desmineralização.

ABSTRACT

A growing number of products containing probiotic bacteria are available for consumption in the market, and these when administered in appropriate amounts can confer benefits to the health of the host. The aim of this study was to evaluate *in situ* the concentration of the fluoride, calcium, phosphate and alkali-soluble carbohydrates in the plaque, as well as the demineralization of the bovine dental enamel through the superficial microhardness test. Ten volunteers received palatine devices containing 4 blocks of bovine dental enamel during 3 phases of 14 days each. In each phase, the treatment was accomplished with the fermented milk A (Treatment A), solution of sucrose 20% (Treatment B – Control) or fermented milk C (Treatment C). At the end of each phase, the formed dental plaque was collected, processed and the ionic concentration appraised. For evaluation of the mineral loss, the initial and final microhardness were determined. The results showed that the ionic concentration (F, Ca and P) was significantly higher in the treatment C took place in comparison with the treatments A and sucrose 20% (Treatment B – Control) ($p < 0,05$), with no difference significant amongst themselves. The two experimental groups (Treatment A and C) had larger losses than the control, although they have not presented significant difference amongst themselves. It was concluded that although all of the accomplished treatments have produced demineralization in the enamel surface, the treatment C offered significant smaller mineral loss in relation to the sucrose 20%, meantime without significant difference in relation to treatment A, as well as, presented the largest concentration of fluoride, calcium and phosphate ions and lower concentration of alkali-soluble carbohydrates in the dental plaque.

Keywords: Milk -Fermentation, Probiotics, Dental decay, Demineralization.

Introdução

Probióticos são microorganismos vivos que, quando administrado em quantidades adequadas, confere benefícios à saúde do hospedeiro (Haukioja et al, 2006). As culturas mais comumente usadas pertencem aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (Ouwehand et al, 2002), que são microrganismos encontrados na cavidade bucal, incluindo em lesões de cárie (Chhour et al, 2005).

A produção eficiente de ácidos orgânicos que é uma característica comum de ambos os gêneros pode prejudicar a saúde bucal como estudos em animais têm demonstrado (Matsumoto et al, 2005). Por outro lado, *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* probióticos tem sido relacionado a um potencial benefício para saúde bucal, como produção de substâncias inibitórias do crescimento de *Streptococcus sobrinus* (Meurman et al, 1995), bem como a redução do risco de cárie em crianças de 3-4 anos de idade (Näse et al, 2001). Além disso, o consumo de iogurte contendo *Lactobacillus reuteri* reduziu ligeiramente a contagem de *Streptococcus mutans* bucal (Nikawa et al, 2004). Já os resultados de Montalto e cols (2004) mostraram que não houve nenhum aumento na contagem de *Streptococcus mutans* quando se administrou um mistura de *Lactobacillus* probióticos na forma de cápsulas ou líquida.

Além dos gêneros bacterianos, a maioria dos leites fermentados contém açúcares e pH ácido que podem facilitar a aderência do *Lactobacilus* à superfície dentária e o desenvolvimento de cárie (Matsumoto et al, 2005).

A cárie dental é uma doença bacteriana dieta dependente e a sacarose é considerada o carboidrato mais cariogênico, pois além da fermentação, ele também transforma o polissacarídeo extracelular em biofilme dental. A presença desse polissacarídeo no biofilme também aumenta a porosidade da matriz da placa, aumentando a cariogenicidade da sacarose (Dibdin e Shellis, 1988).

A alta concentração de polissacarídeos insolúveis, o biofilme dental formado na presença de sacarose também apresenta baixa concentração de flúor (F), cálcio (Ca) e fósforo inorgânico (Pi) (Cury et al, 1997; Cury et al , 2000). Assim, considerando a composição inorgânica do biofilme dental para o desenvolvimento da cárie (Pearce, 1998), os fatores responsáveis pela baixa concentração de F, Ca e P no biofilme dental formado na presença de sacarose devem ser determinados.

Diante disso, o objetivo do presente trabalho foi analisar a concentração dos íons flúor, cálcio, fósforo e carboidratos álcali-solúveis no biofilme dental formado após o período experimental; avaliar a desmineralização do esmalte dental bovino através do teste de microdureza superficial e a acidogenicidade do biofilme formado *in situ* após o uso de leite fermentado contendo probióticos.

Material e Métodos

1 Seleção dos produtos

Após realizar um estudo preliminar para avaliar algumas propriedades químicas de 6 marcas de leites fermentados disponíveis no mercado foram selecionados 2 produtos para a realização do estudo *in situ* utilizando os seguintes

critérios: leite fermentado da marca Yakult® (A), por ser um produto consumido mundialmente (pH= 3.51± 0.0265; capacidade tampão=779.2±52.04; $[Ca^{++}]$=0.7211±0.0330; $[F^{-}]$=0.148±0.0508); leite fermentado da marca Batavito® (C), por ter boa penetração no mercado nacional (pH=3.87±0.0153; capacidade tampão=570.8±7.22; $[Ca^{++}]$=0.8175±0.0165; $[F^{-}]$=0.029±0.0011). Como controle positivo do estudo foi utilizada uma solução de sacarose 20% (pH=6.60).

2 Seleção dos voluntários

Foram levados em consideração, no momento da seleção dos voluntários, alguns critérios de inclusão como: idade entre 18 e 45 anos; saúde geral- ausência de qualquer problema sistêmico que pudesse comprometer o fluxo salivar; saúde bucal- ausência de lesões de cárie ativa e doença periodontal.

Após o aceite e de posse do termo de consentimento livre e esclarecido o voluntário recebia uma lista de orientações a respeito dos procedimentos realizados durante o período experimental.

< Anexo A>

< Anexo E>

3 Obtenção, preparo e seleção dos blocos de esmalte

Blocos de esmalte (4x4 mm) foram obtidos de dentes incisivos bovinos estocados em solução de formol neutro a 2% em temperatura ambiente. As superfícies de esmalte dos blocos foram seqüencialmente polidas e os blocos

selecionados divididos de acordo com a média de dureza do total de blocos e seu intervalo de confiança. Foram selecionados para o estudo espécimes com dureza entre 272 e 440 KHN (Knoop Hardness Number), que é o valor compatível ao esmalte dentário permanente (Meredith et al., 1996), e que, segundo Maupomé et al. (1998), não difere significativamente do esmalte dentário decíduo.

< Anexo B>

< Anexo C>

< Anexo D>

4 Análise da microdureza

Os testes de microdureza nos blocos de esmalte foram realizados utilizando o microdurômetro Shimadzu Micro Hardness Tester HMV-2.000 (Shimadzu Corporation - Kyoto-Japan), com penetrador tipo Knoop, carga estática de 25 gramas e tempo de 10 segundos, acoplado ao Software para análise de imagem CAMS-WIN (NewAge Industries, USA).

Para o teste de microdureza superficial inicial (SMH inicial), foram realizadas cinco impressões na região central do bloco de no esmalte, separadas entre si por uma distância de 100 µm. Foram selecionados os blocos que apresentaram média de comprimento de impressão dentro do intervalo de confiança e não apresentarem trincas ou defeitos no esmalte. Para o teste de microdureza superficial final (SMH final) foram realizadas cinco impressões eqüidistantes entre si e a 100 µm das impressões iniciais (SMH inicial), e calculou-

se a porcentagem de perda de mineral (%ΔSMH), de acordo com a seguinte fórmula: [%ΔSMH = ((SMH final – SMH inicial) / SMH inicial) x 100].

5 Regime experimental

Após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP (Processo: 2007-01015), foram selecionados 10 voluntários os quais receberam a lista de instruções e foram orientados a utilizar por uma semana antes do início do experimento e durante todo o período experimental dentifrício sem fluoreto. Não foi dada qualquer instrução com relação à técnica de escovação.

O estudo aconteceu em três fases experimentais de 14 dias cada, com intervalo de 7 dias entre elas. Os voluntários utilizaram um dispositivo palatino confeccionado em resina acrílica como descrito por Hara et al.(2003) em cada uma das três fases experimentais, assim para cada um dos voluntários foram confeccionados 3 dispositivos palatinos nos quais os blocos de esmalte bovino foram submetidos a 3 grupos de tratamento: leite fermentado Yakult® (Tratamento A); solução de sacarose 20 % (Tratamento B - Grupo Controle); leite fermentado Batavito® (Tratamento C). Em cada fase do período experimental os voluntários gotejaram duas gotas de uma das três soluções sobre os blocos 8 vezes ao dia, em horários previamente estabelecidos (8:00, 9:30, 11:00, 14:00, 15:30, 17:00, 19:00, 21:00 horas) e os dispositivos eram reposicionados na boca após cinco minutos da

aplicação da solução. Desta forma ao final do período experimental todos os voluntários utilizaram 3 dispositivos palatinos e realizaram, portanto, os 3 tratamentos previstos.

< Anexo E>

< Anexo F>

6 Medição da acidogenicidade do biofilme

O pH do biofilme acumulado sobre os blocos foi medido utilizando-se um microeletrodo de contato (Beetrode® MEPH-3L, WPI, USA) conectado a um medidor de pH (Orion - 720-A, USA) associando um eletrodo de referência (Orion-9002, USA), segundo metodologia proposta por Ribeiro et al (2005).

< Anexo G>

7 Protocolo para coleta do biofilme

Após a realização do período experimental o biofilme formado sobre o bloco de esmalte foi coletada e dispensada em tubos para microcentrífuga codificados e pré-pesados. Ácido clorídrico 0,5 mol L^{-1} foi adicionado aos tubos na proporção de 50 µL/mg de biofilme úmido. Após permanecer 3 horas em mesa agitadora orbital plana em temperatura ambiente, o mesmo volume de NaOH 0,5 mol L^{-1} foi adicionado como tampão. As amostras foram então centrifugadas a uma velocidade de 11000 g por 1 minuto e o sobrenadante foi utilizado para determinação da concentração dos íons flúor, cálcio e fósforo. Ao precipitado foi

adicionado NaOH 1 mol L^{-1} (100 µL/mg de biofilme úmido). As amostras foram homogeneizadas no vórtex por 1 minuto, agitadas por 3 horas a temperatura ambiente, centrifugada por 1 minuto a 11000g e o sobrenadante foi coletado para análise da concentração dos carboidratos álcali-solúveis.

8 Análise dos íons F, Ca, P e carboidratos álcali-solúveis

A avaliação da concentração de flúor foi realizada com eletrodo íon específico Orion 9409-BN (Orion Research, Inc., Beverly, MA, USA) e um microeletrodo de referência (Orion Research, Inc., Beverly, MA, USA) acoplados ao potenciômetro Orion 720-A. A leitura foi realizada em duplicata. A análise da concentração de cálcio foi realizada da mesma maneira que a descrita para o flúor (potenciômetro Orion 720-A), mas utilizando o eletrodo íon específico para cálcio(Orion 9300 - Orion Research, Inc., Beverly, MA, USA)

A dosagem de fósforo e carboidratos álcali-solúveis foi realizada pelo teste colorimétrico com a utilização do espectrofotômetro (HITACHI U-2000) conforme descrito respectivamente por Fiske; Subbarow (1925) e Dubois et al (1956).

< Anexo H>

9 Análise estatística

Os dados obtidos de porcentagem de alteração de microdureza de superfície (%SMH), a concentração de flúor, cálcio, fósforo e carboidratos ácali-solúveis (µg

/mg biofilme úmido) e a variação do pH após a aplicação da solução de tratamento, após teste de normalidade e homogeneidade, mostraram-se heterogêneos e foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis. As análises foram feitas utilizando o software GMC versão 2002 (Campos, 2002) e o nível de significância estabelecido foi de 5%.

RESULTADOS

As concentrações dos íons (F, Ca e P) foram significantemente maiores quando se realizou o tratamento C em comparação aos tratamentos A e B (sacarose 20%) ($p<0,05$), os quais não diferiram estatisticamente entre si (Gráfico 1).

Com relação à porcentagem de perda mineral, os dois grupos experimentais (Tratamento A e C) tiveram perdas menores que o controle (Tratamento B), embora não tenham apresentado diferença significante entre si. Além disso, o tratamento C apresentou porcentagem de perda mineral significantemente menor ($p<0.05$) que o tratamento controle (sacarose 20%) (Gráfico 3).

Quando se relacionou a quantidade de íons presente no biofilme e a perda mineral, observou-se uma relação inversamente proporcional, pois quanto menor a concentração de íons maior foi a perda mineral. O cálcio foi o íon que apresentou maior concentração no biofilme, seguido do fósforo e do flúor (Gráfico 2).

A concentração de carboidratos foi significantemente menor quando se realizou o tratamento C comparado aos tratamentos A e B (sacarose 20%), os quais

não diferiram estatisticamente entre si. Quando se relacionou a concentração de carboidratos álcali-solúveis presente no biofilme e a perda mineral, observou-se uma relação diretamente proporcional, pois quanto maior a concentração de carboidratos maior foi a perda mineral($p<0.05$; r=) (Gráfico 3).

A média da variação do pH do biofilme formado *in situ* foi de 2.2 para o tratamento A (Yakult®) ; 1.2 para o tratamento B (sacarose 20%) e 1.8 para o tratamento C (Batavito®).

< Anexo I>
< Anexo J>
< Anexo K>
< Anexo L>

DISCUSSÃO

A cárie dental é a dissolução mineral causada por ácidos do biofilme sendo afetada pela presença de qualquer agente ou procedimento que altere a quantidade de ácido formado, o equilíbrio do fluído mineral entre o esmalte e o biofilme, ou as condições que afetem a difusão de flúor, cálcio, fosfato e sacarose.

A composição do biofilme dental é potencialmente importante no desenvolvimento da cárie (Pearce, 1998). Assim, é relevante avaliar as concentrações dos íons F, Ca e P no biofilme formado na presença de alimentos contendo probióticos e sacarose.

Os resultados do presente estudo, utilizando um modelo experimental *in situ*, mostraram que as concentrações no biofilme dental de flúor, cálcio e fósforo foram significantemente maiores após a realização do tratamento C comparado aos

tratamentos A e B (sacarose 20%), enquanto o tratamento A não mostrou diferença significante em relação ao grupo controle (Tratamento B).

O íon flúor tem um importante papel preventivo para o controle do processo de desmineralização do esmalte (ten Cate, 1997). Acredita-se que o flúor entre no biofilme de maneira direta e indireta, ou seja, pela aplicação tópica ou pela absorção sistêmica (Bowen e Geddes, 1990). No presente estudo o tratamento C (Batavito®) foi o responsável pela maior quantidade de flúor acumulado no biofilme dental e este acúmulo se deve a absorção direta, pois os voluntários não ingeriram os produtos durante os tratamentos. Um dos fatores que podem explicar este resultado é a menor capacidade tampão apresentada pelo leite fermentado C em relação ao A, conforme os dados do estudo preliminar. Além disso, em função do pH ácido ocorre um aumento da salivação diminuindo o tempo para o pH voltar ao repouso guardando alguma semelhança ao que acontece quando da estimulação por gomas contendo sacarose que promoveram remineralização significantemente maior que aquela contendo sorbitol (Creanor et al, 1992) e que a escovação com dentifrício não fluoretado (Freitas et al, 2001). Uma explicação para tal fato pode ser que quando se utiliza a sacarose o pH diminui limpando os poros e permitindo o acesso dos minerais às porções profundas (Freitas et al, 2001). Acredita-se que os depósitos em profundidade são retardados pela presença da película adquirida e pela deposição mais externa do mineral restringindo a difusão iônica em profundidade (Brudevold et al, 1984; Edgar et al, 1975).

O tratamento C também foi responsável por uma quantidade significantemente maior de íons cálcio e fosfato no biofilme dental o que concorda de alguma forma com outros achados que mostram aumento na quantidade desses íons após produção de ácido (Tanaka e Margolis, 1999). Uma maior quantidade de cálcio e fosfato são capazes de neutralizar a produção de ácido, além disso, o mecanismo do flúor está relacionado a sua entrada nos locais desmineralizados reagindo com o cálcio e o fosfato disponível durante o processo de remineralização (Harris e Garcia Godoy, 2004).

A medida da microdureza é uma alternativa para obter informações sobre o grau de desmineralização sofrida pelo esmalte (Koulourides et al, 1974; Featherstone et al, 1983; Gelhard e Arens, 1984). Assim, em nosso estudo todos os tratamentos provocaram diminuição da microdureza do esmalte, mostrando que a perda mineral no experimento *in situ* acontece primariamente na superfície do esmalte, justificando a utilização do método Knoop para este modelo experimental. Entretanto, a maior concentração de flúor, cálcio e fosfato, pode ter explicado a menor perda mineral observada no tratamento C, pois se observou uma correlação positiva entre a concentração dos íons na placa e a integridade mineral do esmalte, embora não tenha ocorrido diferença significante quando comparado ao tratamento A. A maior concentração de íons não garante por si só maior microdureza, pois alguns trabalhos mostraram que mesmo com a incorporação de flúor não há alteração da perda mineral (Reintesman e Arens, 1988; Paes Leme et

al, 2004). No presente estudo, a menor perda mineral pode estar relacionada não só com a presença de flúor, mas também de cálcio e fosfato atuando conjuntamente no processo des-remineralização.

Uma outra abordagem para se estimar o potencial cariogênico de alimentos envolve a avaliação da magnitude da resposta do pH logo após a sua ingestão. (Jensen & Schachtele, 1983). No presente trabalho pode-se observar que a maior queda ocorreu após o tratamento A, no qual o leite fermentado utilizado apresentava o menor pH seguido do tratamento C e B (sacarose 20%), o que pode ter favorecido o processo de desmineralização. A pequena diferença na variação do pH dos diferentes tratamentos pode ter ocorrido em função do tempo utilizado para medi-lo, ou seja, não foi avaliado a variação do pH em um período de tempo menor nem maior que 5 minutos.

Com base na metodologia utilizada e nos resultados obtidos pode-se concluir que todos os tratamentos realizados provocaram queda no pH do biofilme dental e produziram desmineralização na superfície do esmalte dental bovino mas o tratamento C ofereceu perda mineral significativemente menor em relação ao tratamento B (sacarose 20%), entretanto sem diferença significante em relação ao tratamento A. O tratamento C foi também o responsável pela maior concentração de íons flúor, cálcio e fósforo; e menor concentração de carboidratos álcali-solúveis no biofilme dental, seguido pelo tratamento A e B (sacarose 20%).

REFERÊNCIAS

Brudevold F, Attarzadeh F, Tehrani A, van Houte J, Russo J: Development of a new intraoral demineralization test. Caries Res 1984;18:421-9

Campos, GM. GMC 2002. Ribeirão Preto: School of Dentistry, n.d. Available at: http://www.forp.usp.br/restauradora/gmc/gmc.html#gmc. Accessed on Feb 21, 2003.

Chhour KL, Nadkarni MA, Byun R, Martin FE, Jacques NA, Hunter N: Molecular analysis of microbial diversity in advanced caries. J Clin Microbiol 2005;43: 843–849.

Creanor SL, Strang R, Gilmour WH, Foye RH, Brown J, Geddes DA, Hall AF: The effect of chewing gum use on in situ enamel lesion remineralization. J Dent Res 1992;71:1895-900.

Cury JA, Rebello MAB, Del Bel Cury AA, Derbyshire MTVC, Tabchoury CPM: Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in the presence of sucrose or glucose and fructose. Caries Res 2000;34:491-497.

Cury JA, Rebello MAB, Del Bel Cury AA: In situ relationship between sucrose exposure and the composition of dental plaque. Caries Res 1997;31:356-360.

Dibdin GH, Shellis RP: Physical and biochemical studies of *Streptococcus mutans* sediments suggest new factors linking the cariogenicity of plaque with its extracellular polysaccharide content. J Dent Res 1988;67:890-895.

Dubois M, Grilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F: Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal Chem 1956;28:350-6.

Edgar WM, Bibby BG, Mundorff S, Rowley J: Acid production in plaques after eating snacks: modifying factors in foods. J Am Dent Assoc 1975;90(2):418-25.

Featherstone JD, ten Cate JM, Shariati M, Arends J: Comparison of artificial caries-like lesions by quantitative microradiography and microhardness profiles. Caries Res 1983;17:385-91.

Fiske CH, Subarrow Y: The colorimetric determination of phosphorus. J Biol Chem 1925;66:375-400,.

Freitas RR. Oliveira JA, Taga EM, Buzalaf MAR: Effect of sucrose-containing gum and fluoridated dentifrice on in situ remineralization of artificial caries. Pesqui Odontol Bras 2001 15:98-103.

Geddes DA, Bowen WH: Fluoride in saliva and dental plaque. J Dent Res 1990;69:637-8.

Gelhard TB, Arends J: In vivo remineralization of artificial subsurface lesions in human enamel. I. J Biol Buccale 1984;2:49-57.

Hara AT, Queiroz CS, Paes Leme AF, Serra MC, Cury JA: Caries progression and inhibition in human and bovine root dentine in situ. Caries Res 2003;37:339-44.

Harris NO, Garcia Godoy F: Primary preventive dentistry (6th ed) 2004, pp 241-84.

Haukioja A, Yli-Knuuttila H, Loimaranta V, Kari K, Ouwehand AC, Meurman JH,Tenovuo J: Oral adhesion and survival of probiotic and other lactobacilli and bifidobacteriain vitro. Oral Microbiol Immunol 2006;21:326-32.

IBGE: Pesquisas de Orçamentos Familiares. www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2002aquisicao/defaulttab_.shtm, 2002-2003

Jensen ME, Schachtele CF: The acidogenic potential of reference foods and snacks at interproximal sites in the human dentition. J Dent Res 1983;62:889-92.

Kato K, Nakagaki H, Arai K, Pearce EI: The influence of salivary variables on fluoride retention in dental plaque exposed to a mineral-enriching solution. Caries Res 2002;36:58-63.

Koulourides T, Phantumvanit P, Munksgaard EC, Housch T: An intraoral model used for studies of fluoride incorporation in enamel. J Oral Pathol 1974;3:185-96.

Matsumoto M, Tsuji M, Sasaki H, Fujita K, Nomura R, Nakano K, Shintani S, Ooshima T: Cariogenicity of the probiotic bacterium Lactobacillus salivarius in rats. Caries Res 2005;39:479–483.

Maupomé G, Díez-de-Bonilla J, Torres-Villaseñor G, Andrade-Delgado LC, Castaño VM: In vitro quantitative assessment of enamel microhardness after exposure to eroding immersion in a cola drink. Caries Res 1998;32:148-53.

Meredith N, Sherriff M, Setchell DJ, Swanson SA: Measurement of the microhardness and Young's modulus of human enamel and dentine using an indentation technique. Arch Oral Biol 1996;41:539-45.

Meurman JH, Antila H, Korhonen A, Salminen S: Effect of Lactobacillus rhamnosus strain GG (ATCC 53103) on the growth of Streptococcus sobrinus in vitro. Eur J Oral Sci 1995;103:253–258.

Montalto M, Vastola M, Marigo L, Covino M, Graziosetto R, Curigliano V, Santoro L, Cuoco L, Manna R, Gasbarrini G: Probiotic treatment increases salivary counts of lactobacilli: a double-blind, randomized, controlled study. Digestion 2004;69:53–56.

Näse L, Hatakka K, Savilahti E, Saxelin M, Ponka A, Poussa T, Korpela R, Meurman JH: Effect of long-term consumption of a probiotic bacterium, Lactobacillus rhamnosus GG, in milk on dental caries and caries risk in children. Caries Res 2001;35:412–420.

Nikawa H, Makihira S, Fukushima H, Nishimura H, Ozaki Y, Ishida K, Darmawan S, Hamada T, Hara K, Matsumoto A, Takemoto T, Aimi R: Lactobacillus reuteri in bovine milk fermented decreases the oral carriage of mutans streptococci. Int J Food Microbiol 2004;95:219–223.

Ouwehand AC, Salminen S, Isolauri E: Probiotics: an overview of beneficial effects. Antonie Van Leeuwenhoek 2002;82:279–289.

Paes Leme AF, Dalcico R, Tabchoury CP, Del Bel Cury AA, Rosalen PL, Cury JA: In situ effect of frequent sucrose exposure on enamel demineralization and on plaque composition after APF application and F dentifrice use. J Dent Res 2004;83:71-5.

Pearce E: Plaque minerals and dental caries. N Z Dent J 1998;94:12-15.

Reintsema H, Arends J: An in vivo study of microhardness and fluoride uptake in partially demineralized human enamel covered by plaque. J Dent Res 1988;67:471-3.

Ribeiro CC, Tabchoury CP, Del Bel Cury AA, Tenuta LM, Rosalen PL, Cury JA: Effect of starch on the cariogenic potential of sucrose. Br J Nutr 2005;94:44-50.

Tanaka M, Margolis HC: Release of mineral íons in dental plaque following acid production. Arch Oral Biol 1999;44:253-8.

ten Cate JM: Review on fluoride, with special emphasis on calcium fluoride mechanisms in caries prevention. Eur J Oral Sci 1997;105:461-5.

Normatização segundo o periódico Caries Research (Anexo M)

Gráfico 1: Concentração de íons flúor, cálcio e fósforo (µg/mg) no biofilme dental para cada tratamento realizado.

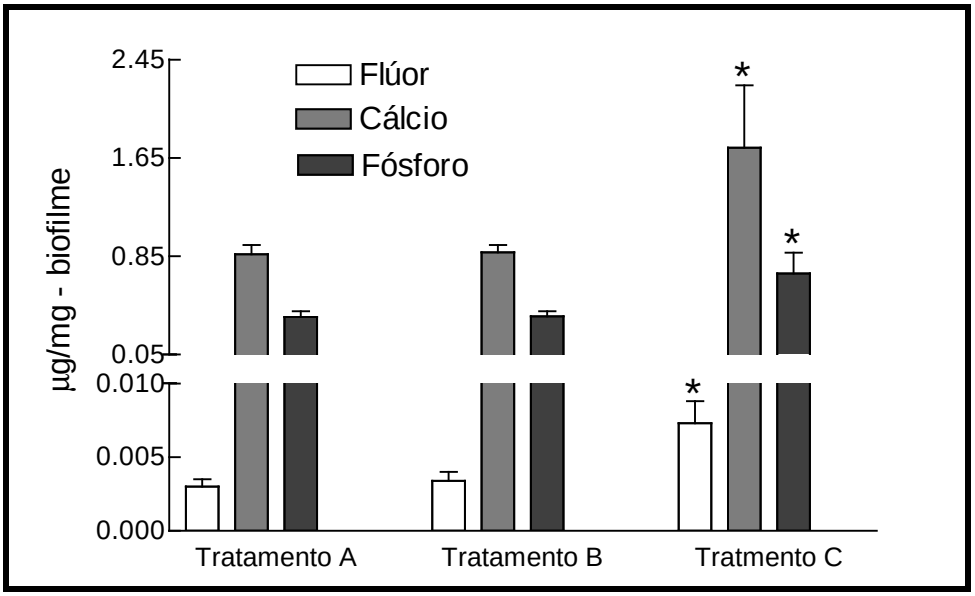


Gráfico 2: Relação entre a concentração de íons (µg/mg) presente no biofilme e a porcentagem de perda mineral (% SMH).

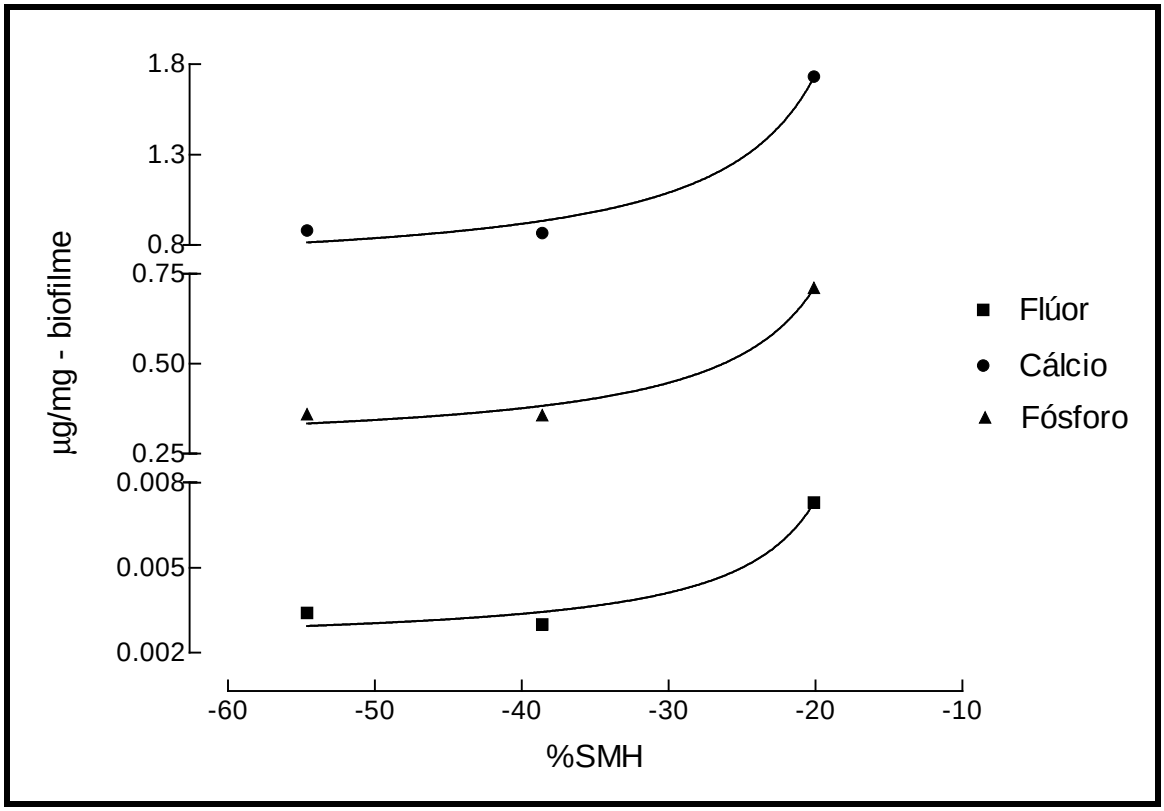
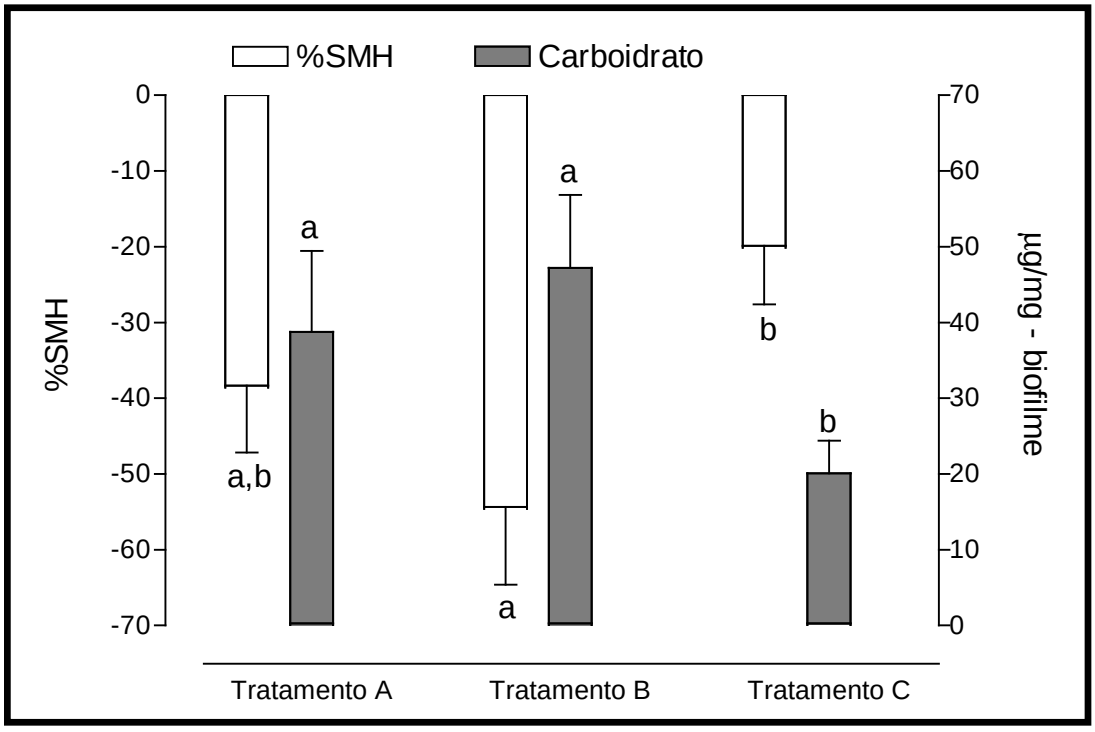


Gráfico 3: Relação da porcentagem de perda mineral (%SMH) com a concentração de carboidratos (µg/mg biofilme) após a realização de cada tratamento.



ANEXOS

ANEXO A

Lista de instruções ao voluntário

1- Todos os materiais utilizados na pesquisa não acarretam em custo ao voluntário.
2- Os voluntários não deverão utilizar qualquer tipo de produto fluoretado (exceto água) ou anti-séptico bucal uma semana antes e durante todo o experimento.
3- Uma semana antes do experimento e durante todo o experimento os voluntários deverão escovar os dentes com dentifrício não fluoretado fornecido pela pesquisadora.
4- A pesquisa será composta por 3 etapas, com duração de 14 dias cada uma e com intervalo de uma semana entre elas.
5- Os voluntários deverão utilizar o dispositivo bucal durante todo o dia, inclusive para dormir e **DEVERÁ REMOVÊ-LO SOMENTE PARA AS REFEIÇÕES** ocasião em que o dispositivo deverá permanecer na caixa própria para armazená-lo.
6- Evite que o dispositivo fique fora da boca por um período prolongado, restringindo-se ao tempo necessário para cada refeição.
7- Realize sua higiene bucal normalmente, utilizando o dentifrício fornecido.
8- Os blocos **NÃO** deverão ser escovados. Os voluntários poderão realizar a escovação do dispositivo, **1 VEZ POR DIA**, somente **NA FACE VOLTADA PARA O PALATO** e com o dentifrício fornecido pela pesquisadora.
9- Os voluntários deverão gotejar duas gotas da solução fornecida pela pesquisadora sobre os blocos 8 vezes ao dia, nos seguintes horários: 8:00, 9:30, 11:00, 14:00, 15:30, 17:00, 19:00 e 21:00 horas. O dispositivo deverá ser reposicionado na boca após 5 minutos.
10- No 13º dia o voluntário deverá comparecer no departamento de Odontopediatria, localizado na rua José Bonifácio 1193 no consultório da Bebê Clínica , para realizar a medição do pH da placa. Este procedimento será previamente marcado com a pesquisadora.
11- Para a medição do pH da placa o voluntário deverá comparecer ao local **SEM** realizar a 1ªescovação do dia e em **JEJUM**.
12- Quando qualquer material estiver acabando ou sentir algum desconforto na utilização do dispositivo, entrar em contato com a pesquisadora.
13- Favor verificar todos os dias se os fragmentos estão em suas lojas e se a tela protetora continua intacta. Caso não estejam, entrar em contato imediatamente com a pesquisadora.
14- Qualquer dúvida entrar em contato com a pesquisadora (Carolina Lodi) pelo telefone : 3636-3235 (Pediatria) ou (14) 9794-0105.

Resumo das instruções ao voluntário

1- Colocar o dispositivo após a última escovação da noite

2- No dia seguinte (1º dia), iniciar o tratamento com a solução fornecida nos horários pré-estabelecidos: 8:00, 9:30, 11:00, 14:00, 15:30, 17:00, 19:00 e 21:00 horas.

3- Após gotejar a solução de tratamento, esperar 5 minutos para reposicionar o dispositivo na boca.

4- Após as refeições, realizar a higiene bucal com o dentifrício fornecido pela pesquisadora antes de reposisionar o dispositivo.

5- Poderá escovar o dispositivo, 1 vez por dia, somente na face voltada para o palato e com o dentifrício fornecido pela pesquisadora.

Obrigada pela colaboração.

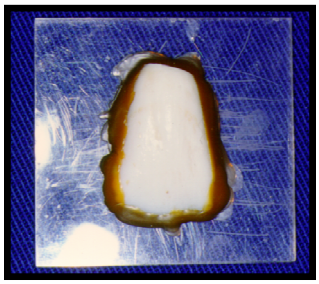
ANEXO B

OTENÇÃO E PREPARO DOS BLOCOS DE ESMALTE

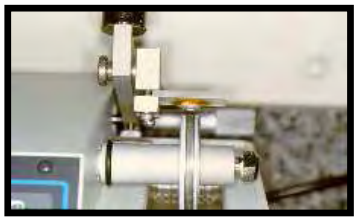
Confecção dos blocos de esmalte bovino (4 x 4 mm)

1. Coroa do dente bovino incisivo central inferior, separada da raiz através de disco diamantado de duas faces (KG Sorensen D 91), montado em motor de bancada (Nevoni), mantido sob refrigeração (água destilada/deionizada).

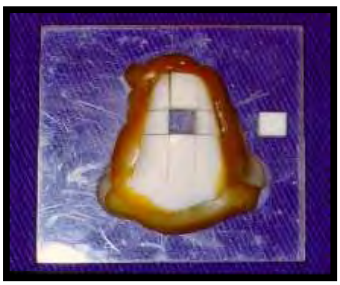
2. Secção da coroa utilizando disco diamantado (série 15 HC Diamond - n. 11-4244 Buehler) separando a superfície vestibular da lingual.



3. Face vestibular fixada na placa de acrílico.



4. Secção da face vestibular no sentido longitudinal, na porção mais plana, utilizando-se 2 discos diamantados (série 15 HC Diamond –n. 11-4243 Buehler), montados em cortadeira sob refrigeração com água destilada/deionizada e separados por um disco espaçador de alumínio com 4 mm de espessura. Em seguida, foi realizado o corte no sentido transversal.

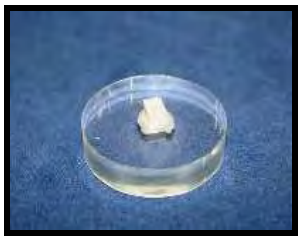


5. Fragmento vestibular do dente bovino, fixado sobre placa de resina. Ao lado, bloco de esmalte dentário.

ANEXO C

OTENÇÃO E PREPARO DOS BLOCOS DE ESMALTE

Planificação da dentina e polimento do esmalte



1. Bloco de esmalte fixado em disco de resina acrílica pré-fabricada (± 3 cm de diâmetro por ± 8 mm de espessura), com auxílio de cera pegajosa (Kota Ind. e Com. LTDA), com a superfície dentinária voltada para cima.

2. Ajuste da dentina para obtenção de superfícies paralelas entre esmalte e dentina, utilizando Politriz APL-4 AROTEC e lixas de granulação 320 (CARBIMET Paper Discs, 30-5108-320, BUEHLER), 2 pesos, durante 20 segundos sob baixa rotação e refrigeração.

3. Blocos fixados com a superfície do esmalte voltada para cima, a qual será polida.

Seqüência do polimento de esmalte:

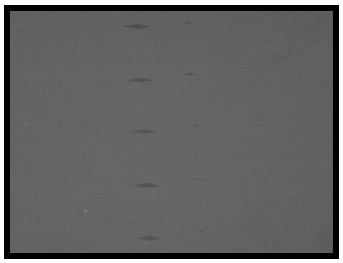
1. Pedra-pomes, água deionizada e taça de borracha montada em contra-ângulo em baixa-rotação.
2. Na Politriz APL-4 AROTEC - lixa de granulação 600, 800 e 1200 (30 segundos – 2 pesos) e refrigeração a água. Limpeza em lavadora ultrassônica e água destilada/deionizada por 2 minutos, entre cada lixa;
3. Na Politriz APL-4 AROTEC - acabamento final com disco de papel feltro TEXMET 1000 (Buehler Polishing Cloth) (1 minuto – 2 pesos) e suspensão de diamante 1 micron base-água (Buehler);
4. Limpeza em lavadora ultrassônica utilizando solução detergente (Ultramet Sonic Cleaning Solution - Buehler) diluída 20:1 em água destilada/deionizada (2minutos);
5. Lavagem durante 30 segundos com jato de água destilada/deionizada.

ANEXO D

ANÁLISE DE MICRODUREZA

1. Microdurômetro Shimadzu Micro Hardness Tester HMV-2.000 (Shimadzu Corporation - Kyoto-Japan), com penetrador tipo Knoop, acoplado ao Software para análise de imagem CAMS-WIN (NewAge Industries, USA).

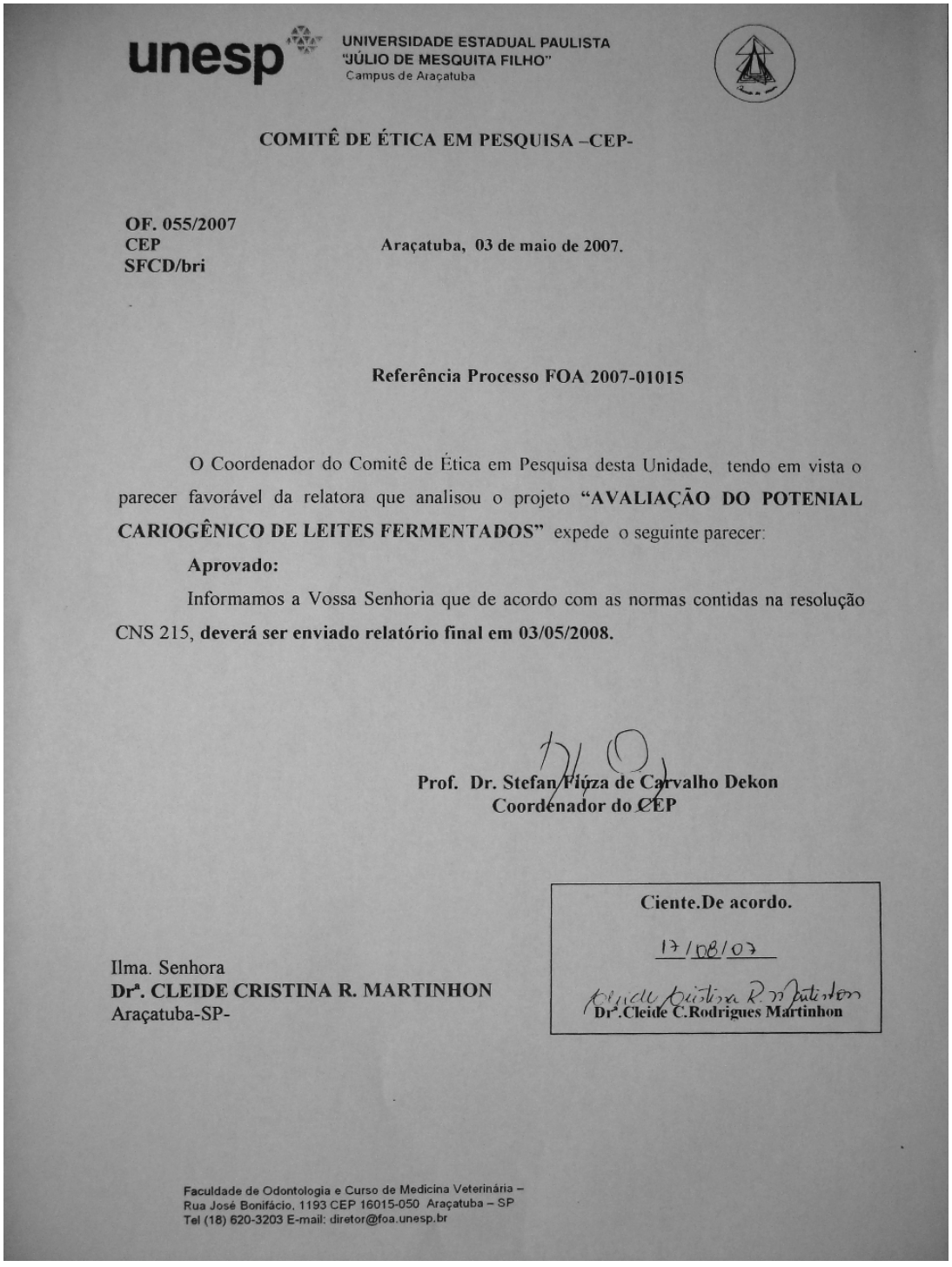
2. Bloco de esmalte sendo submetido à leitura no microdurômetro, carga estática de 25 gramas e tempo de 10 segundos, para análise da microdureza de superfície.



3. Fotomicrografia das impressões para análise de microdureza de superfície inicial (SMH-inicial), e final (SMH-final) (Aumento: 100x).

ANEXO E

COMITÊ DE ÉTICA



unesp UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" Campus de Araçatuba

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA –CEP-

OF. 055/2007
CEP
SFCD/bri

Araçatuba, 03 de maio de 2007.

Referência Processo FOA 2007-01015

O Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa desta Unidade, tendo em vista o parecer favorável da relatora que analisou o projeto **"AVALIAÇÃO DO POTENIAL CARIOGÊNICO DE LEITES FERMENTADOS"** expede o seguinte parecer:

Aprovado:

Informamos a Vossa Senhoria que de acordo com as normas contidas na resolução CNS 215, **deverá ser enviado relatório final em 03/05/2008.**

Prof. Dr. Stefan Fiúza de Carvalho Dekon
Coordenador do CEP

Ciente.De acordo.
17/08/07
Drª.Cleide C.Rodrigues Martinhon

Ilma. Senhora
Drª. CLEIDE CRISTINA R. MARTINHON
Araçatuba-SP-

Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária –
Rua José Bonifácio, 1193 CEP 16015-050 Araçatuba – SP
Tel (18) 620-3203 E-mail: diretor@foa.unesp.br

ANEXO F

DISPOSITIVO PALATINO

1. Dispositivo palatino confeccionado em resina acrílica (Jet – Artigos Odontológico Clássico, São Paulo), com espaço para a inserção dos blocos de esmalte de dente bovino.

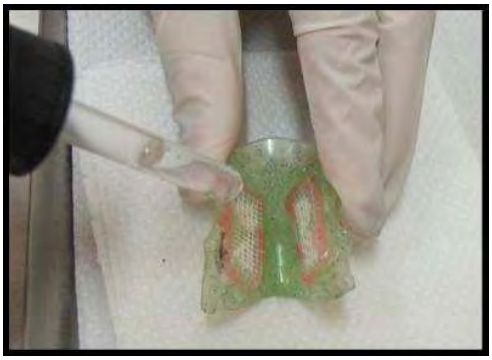
2. Os blocos fixados com cera pegajosa e cobertos com tela plástica (peneira grande, ref. 0041, Plásticos Gonçalves Ltda., São Paulo), deixando um espaço (de 1 a 2 mm) entre o bloco e a tela para permitir o acúmulo do biofilme e protegê-lo da perturbação mecânica.

ANEXO G

MEDIÇÃO DA ACIDOGENICIDADE DO BIOFILME

1. Medição do pH com microeletrodo de contato (Beetrode® MEPH-3L, WPI, USA) conectado a um medidor de pH (Orion - 720-A, USA) associando um eletrodo de referência (Orion-9002, USA). Uma ponte salina foi criada em uma solução de 3 mol L^{-1} KCl entre o eletrodo de referência e o dedo do voluntário.

2. Leitura do pH na manhã do 13º dia do experimento, com o voluntário em jejum e sem realizar a higiene oral. As medições foram realizadas em dois pontos (mesial e distal) e nos quatro blocos do dispositivo.



3. Após a primeira leitura o dispositivo era removido da boca e gotejava-se 2 gotas da solução de tratamento, aguardava 5 min. e realiza-se uma nova leitura para avaliar a queda de pH após a aplicação da solução.

ANEXO H

ANÁLISE DOS ÍONS F, CA, P E CARBOIDRATOS ÁLCALI-SOLÚVEIS

A avaliação da concentração de flúor foi realizada com eletrodo íon específico Orion 9409 e um micro-eletrodo de referência calomelano (Accumet, número de catálogo 13-620-79) acoplados ao potenciômetro Orion 720-A^+, que expressou a concentração de flúor em milivolts (mV). Os valores em milivolts foram anotados, transferidos para uma planilha (programa Excel-Microsoft) e convertidos para µg de flúor. A leitura foi realizada em duplicata. A média das leituras foi calculada, assim como porcentagem de variação entre a quantidade de flúor medida e a esperada pelos padrões. Somente curvas de calibração com porcentagem de variação de até 5% para todos os padrões e $r \geq 0.99$ foram aceitas. Para a validação do método as soluções-padrão (0.090 µg F/mL; 0.180 µg F/mL; 0.360 µg F/mL; 0.720 µg F/mL; 1.44 µg F/mL) foram preparadas em triplicata a partir de diluição seriada de um estoque de 100 µg F. A primeira leitura da curva de calibração foi realizada antes de se iniciar a leitura das amostras, a segunda após a primeira leitura das amostras e antes da leitura da duplicata das amostras, e a terceira após o término da leitura da duplicata das amostras. No momento da análise, foi utilizado 80 µL da amostra e 8 µL de Tisab III para tamponar a amostra.

A análise da concentração de cálcio foi realizada da mesma maneira que a descrita para o flúor, mas utilizando o eletrodo íon específico para cálcio e os padrões de cálcio (20.0 µg Ca/mL; 40.0 µg Ca/mL; 80.0 µg Ca/mL; 160.0 µg Ca/mL; 320.0 µg Ca/mL) obtidos a partir de diluição seriada de um estoque de 4000 µg Ca (Orion). No momento da leitura foi utilizado 80 µL da amostra e 1.6 µL de ISA (Ajustador de Força Iônica).

A dosagem de P foi realizada conforme descrito por Fiske; Subbarow (1925), empregando os seguintes reagentes:

1 – Reativo Redutor: Ácido alfa amino naftol sulfônico (AANS): 0.2 g + Sulfeto de sódio: 1.2g + dissulfito de sódio: 1.2 g.

A mistura acima foi triturada em gral e armazenada em frasco escuro. Na hora da análise, cada 0.025 g da mistura foi dissolvida em 1.0 mL de água deionizada.

2 – Ácido Molibdico: Molibdato de amônio: 6.52 g + ácido sulfúrico concentrado: 27.0 mL.

3 – Padrão contendo 3mg% P

A reação foi feita de acordo com a tabela abaixo:

Tabela a – Dosagem de Fósforo de acordo com o método de Fiske; Subbarow (1925)

	Blanck	Padrão	Padrão	Padrão	Padrão	Amostra
Água deionizada	2.3 mL	2.2 mL	2.1mL	1.9 mL	1.5 mL	2.2 mL
Padrão P 3mg%	-	0.1 mL	0.2 mL	0.4 mL	0.8 mL	-
Amostra	-	-	-	-	-	0.1 mL
Ácido Molibdico	0.5 mL em todos, agitar e esperar 10 minutos					
Reativo Redutor	0.2 mL em todos, agitar imediatamente, esperar 20 minutos e ler a 660 nm					
μg P / mL	0	3	6	12	24	-

Inicialmente foi colocado água deionizada nos tubos de ensaio de acordo com os volumes descritos na tabela acima. A seguir foram colocados em duplicatas, os padrões de P ou as amostras. Então foram adicionados 0.5 mL de ácido molibdico em todos os tubos, agitou-se e esperou-se 10 min. A coloração da reação foi desenvolvida pela adição de reativo redutor. Após 20 min da colocação do reativo redutor realizou-se a leitura em espectofotômetro (Cary 50) a 660 nm de

absorbância. Esse valores foram anotados, transferidos para uma planilha (programa Excel-Microsoft) e convertidos para μg de fósforo.

A dosagem dos carboidratos álcali-solúveis foi realizada conforme descrito por Dubois et al (1956), empregando os seguintes reagentes:

1 – Fenol 5%:

2 – Ácido Sulfúrico concentrado

A reação foi feita de acordo com a tabela abaixo:

Tabela b – Dosagem de carboidratos de acordo com o método de Dubois et al (1956)

	Blank	Padrão	Padrão	Padrão	Padrão	Padrão	Amostra
Água deionizada	0.5 mL	0.4 mL	0.3 mL	0.2 mL	0.1 mL	-	0.3 mL
Solução padrão (Glicose)	-	0.1 mL	0.2 mL	0.3 mL	0.4 mL	0.5 mL	-
Amostra	-	-	-	-	-	-	0.2 mL
Fenol 5%	0.5 mL em todos						
Ac. Sulfúrico	2.5 mL em todos, agitar imediatamente, esperar 20 minutos e ler a 490 nm						

Inicialmente foi colocado água deionizada nos tubos de ensaio de acordo com os volumes descritos na tabela acima. A seguir foram colocados em duplicatas, os padrões de glicose ou as amostras. Então foram adicionados 0.5 mL de fenol 5% em todos os tubos e em seguida colocou-se 2.5 mL de ácido sulfúrico e agitou-se imediatamente. A coloração da reação foi desenvolvida pela adição do ácido sulfúrico concentrado. Após 20 min da colocação do ácido sulfúrico realizou-se a leitura em espectofotômetro (Cary 50) a 490 nm de absorbância. Esses valores foram anotados, transferidos para uma planilha (programa Excel-Microsoft) e convertidos para μg de glicose.

ANEXO I

MÉDIA DA VARIAÇÃO DO pH DO BIOFILME PARA CADA TRATAMENTO

Queda do pH após 5 minutos da aplicação do produto

Voluntário	Tratamento A	Tratamento B	Tratamento C
1	2.46	0.78	2.37
2	2.20	1.56	2.09
3	3.51	2.03	1.10
4	2.43	0.86	1.72
5	2.43	1.16	1.08
6	2.95	2.18	2.00
7	0.83	0.55	1.33
8	1.19	1.20	2.59
9	1.75	0.41	0.73
10	2.52	1.48	2.59
Média	2,2	1,2	1,8
DP*	0,8	0,6	0,7
ep**	0,3	0,2	0,2

*DP= Desvio Padrão

**ep= erro padrão

ANEXO J

CONCENTRAÇÃO DE ÍONS PARA CADA TRATAMENTO

Flúor, cálcio e fósforo (µg/mg biofilme)

Flúor

Voluntário	Tratamento A	Tratamento B	Tratamento C
1	0.0047	0.0044	0.0061
2	0.0029	0.0075	0.0154
3	0.0058	0.0022	0.0085
4	0.0017	0.0019	0.0047
5	0.0014	0.0052	0.0029
6	0.0013	0.0033	0.0034
7	0.0019	0.0016	0.0015
8	0.0046	0.0034	0.0096
9	0.0033	0.0015	0.0067
10	0.0024	0.0026	0.0142
Média	0.0030	0.0034	0.0073
DP*	0.0016	0.0019	0.0047
ep**	0.0005	0.0006	0.0015

Cálcio

Voluntário	Tratamento A	Tratamento B	Tratamento C
1	1.35	0.68	1.39
2	0.85	1.06	2.40
3	0.81	0.66	6.08
4	0.74	0.99	1.55
5	0.60	1.19	1.13
6	0.56	0.88	1.30
7	0.80	0.83	0.75
8	1.03	1.08	1.19
9	0.83	0.83	0.65
10	1.09	0.63	0.87
Média	0.867	0.881	1.732
DP*	0.237	0.192	1.607
ep**	0.075	0.061	0.508

Fósforo

Voluntário	Tratamento A	Tratamento B	Tratamento C
1	0.16	0.22	0.91
2	0.26	0.54	1.16
3	0.60	0.62	1.98
4	0.37	0.25	0.63
5	0.30	0.27	0.31
6	0.46	0.39	0.39
7	0.32	0.29	0.29
8	0.27	0.43	0.43
9	0.26	0.24	0.33
10	0.57	0.33	0.67
Média	0.357	0.360	0.711
DP*	0.143	0.136	0.531
ep**	0.045	0.043	0.168

*DP= Desvio Padrão

**ep= erro padrão

ANEXO K

QUEDA DO pH, PESO DO BIOFILME E % DE PERDA MINERAL PARA CADA TRATAMENTO

Tratamento A

Voluntário	Δ pH	Peso Biofilme (mg)	ΔSMH (%)
1	2.46	32.0	-6.57
2	*	58.4	-21.06
3	3.51	37.2	-9.57
4	2.43	23.6	-15.6
5	2.22	58.2	-63.15
6	2.95	17.6	-36.29
7	0.83	63.5	-74.57
8	1.19	29.7	-40.06
9	1.75	156.2	-82.93
10	2.52	116.6	-36.24

*Problema no aparelho

Tratamento B

Voluntário	Δ pH	Peso Biofilme (mg)	ΔSMH (%)
1	0.78	17.6	-11.61
2	1.56	60.7	-14.11
3	2.03	22.5	-61.15
4	0.86	23.6	-17.47
5	1.16	32.5	-53.94
6	2.18	35.8	-61.00
7	0.85	182.1	-92.24
8	0.94	42.2	-54.3
9	0.41	186.6	-94.18
10	1.90	151.4	-85.87

Tratamento C

Voluntário	Δ pH	Peso Biofilme (mg)	**Δ**SMH (%)
1	2.37	20.6	3.10
2	2.09	27.3	3.40
3	1.10	87.9	-6.56
4	1.72	34.9	3.12
5	1.08	60.0	-41.60
6	2.00	45.9	-34.62
7	1.33	79.7	-35.76
8	1.64	27.7	-1.97
9	0.73	156.3	-64.04
10	2.59	92.8	-26.53

ANEXO L

MÉDIA DA MICRODURZA SUPERFICIAL INICIAL E FINAL PARA CADA VOLUNTÁRIO NOS DIFERENTES TRATAMENTO

Voluntário	Tratamento A		Tratamento B		Tratamento C	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
1	369.00	344.75	368.95	326.10	367.60	379.00
2	368.30	290.73	368.90	316.85	370.05	382.65
3	367.45	332.30	368.85	143.30	368.05	343.90
4	368.55	311.05	366.95	302.85	368.25	379.75
5	365.85	134.80	367.20	169.15	368.35	215.10
6	369.50	235.40	367.70	143.40	368.30	240.80
7	367.85	93.53	369.85	28.70	318.65	204.70
8	367.10	220.05	367.40	186.70	367.80	360.55
9	368.20	62.87	375.65	21.85	368.05	132.35
10	367.80	234.50	373.30	52.75	367.75	270.20
Média	368.0	226.0	369.5	169.2	363.3	290.9
DP*	1.0	99.7	2.8	115.9	15.7	90.1
ep**	0.3	31.5	0.9	36.7	5.0	28.5

*DP= Desvio Padrão

**ep= erro padrão

ANEXO M
Caries Research

Guidelines for Authors

www.karger.com/cre_guidelines

Aims and Scope

'Caries Research' is an international journal, the aim of which is to promote research in dental caries and related fields through publication of original research and critical evaluation of research findings. The journal will publish papers on the aetiology, pathogenesis, prevention and clinical control or management of dental caries. Papers on health outcomes related to dental caries are also of interest, as are papers on other disorders of dental hard tissues, such as dental erosion. Aspects of caries beyond the stage where the pulp ceases to be vital are outside the scope of the journal.

Submission

Manuscripts written in English should be submitted at

Online Manuscript Submission

Should you experience problems with your submission, please contact:

Dr. R.P. Shellis
r.p.shellis@bris.ac.uk
Tel. +44 (0)117 928 4328
Fax +44 (0)117 928 4778

Copies of any 'in press' papers cited in the manuscript must accompany the submission. Manuscripts reporting on clinical trials must be accompanied by the CONSORT checklist (see below).

Conditions

All manuscripts are subject to editorial review. Manuscripts are received with the explicit understanding that the data they contain have not previously been published (in any language) and that they are not under simultaneous consideration by any other publication.

Submission of an article for publication implies the transfer of the copyright from the author to the publisher upon acceptance. Accepted papers become the property of 'Caries Research' and may not be reproduced by any means, in whole or in part, without the written consent of the publisher.

It is the author's responsibility to obtain permission to reproduce illustrations, tables, etc., from other publications.

Types of Papers

Original papers or Short Communications are reports of original work (including systematic reviews and meta-analyses). Both have the structure outlined below but for Short Communications the abstract should be less than 100 words and the manuscript should not exceed 3 printed pages, equivalent to about 9 manuscript pages (including tables, illustrations and references).

Reviews can have a freer format but should nevertheless commence with a Title page, an Abstract and an Introduction defining the scope.

Current topics are concise articles that present critical discussion of a topic of current interest, or a fresh look at a problem, and should aim to stimulate discussion.

Letters to the Editor, commenting on recent papers in the journal, are published occasionally, together with a response from the authors of the paper concerned.

Preparation of Manuscripts

Text should be one-and-a-half-spaced, with wide margins. All pages should be numbered, starting from the title page. A conventional font, such as Times New Roman or Arial, should be used, with a font size of 11 or 12. Avoid using italics except for Linnaean names of organisms and names of genes.

Manuscripts should be prepared as a text file plus separate files for illustrations. The text file should contain the following sequence of sections: Title page; Declaration of interests; Abstract; Introduction; Materials and Methods; Results; Discussion; Acknowledgements; References; Legends; Tables. Each section should start on a new page, except for the body of the paper (Introduction to Acknowledgements), which should be continuous.

Title page: The first page of each manuscript should show, in order:

- the title, which should be informative but concise;
- the authors' names and initials, without degrees or professional status, followed by their institutes;
- a short title, maximum length 60 characters and spaces, for use as a running head;
- a list of 3-10 key words, for indexing purposes;
- the name of the corresponding author and full contact details (postal address, telephone and fax numbers, and e-mail address).

Declaration of Interests: Potential conflicts of interest should be identified for each author or, if there are no such conflicts, this should be stated explicitly. Conflict of interest exists where an author has a personal or financial relationship that might introduce bias or affect their judgement. Examples of situations where conflicts of interest might arise are restrictive conditions in the funding of the research, or payment to an investigator from organisations with an interest in the study (including employment, consultancies, honoraria, ownership of shares). The fact that a study is conducted on behalf of a commercial body using funds supplied to the investigators' institution by the sponsor does not in itself involve a conflict of interest. Investigators should disclose potential conflicts to study participants and should state whether they have done so.

The possible existence of a conflict of interest does not preclude consideration of a manuscript for publication, but the Editor might consider it appropriate to publish the disclosed information along with the paper.

Abstract: The abstract should summarise the contents of the paper in a single paragraph of no more than 250 words (to ensure that the abstract is published in full by on-line services such as PubMed). No attempt should be made to give numerical results in detail. References are not allowed in the abstract.

Introduction: This section should provide a concise summary of the background to the relevant field of research, introduce the specific problem addressed by the study and state the hypotheses to be tested.

Materials and Methods (or Subjects and Methods): All relevant attributes of the material (e.g. tissue, patients or population sample) forming the subject of the research should be provided. Experimental, analytical and statistical methods should be described concisely but in enough detail that others can repeat the work. The name and brief address of the manufacturer or supplier of major equipment should be given.

Statistical methods should be described with enough detail to enable a knowledgeable reader with access to the original data to verify the reported results. When possible, findings should be quantified and appropriate measures of error or uncertainty (such as confidence intervals) given. Sole reliance on statistical hypothesis testing, such as the use of P values, should be avoided. Details about eligibility criteria for subjects, randomization and the number of observations should be included. The computer software and the statistical methods used should be specified. See Altman et al.: Statistical guidelines for contributors to medical journals [Br Med J 1983;286:1489-93] for further information.

Manuscripts reporting studies on human subjects should include evidence that the research was ethically conducted in accordance with the Declaration of Helsinki (World Medical Association). In particular, there must be a statement in Materials and Methods that the consent of an appropriate ethical committee was obtained prior to the start of the study, and that subjects were volunteers who had given informed, written consent.

Clinical trials should be reported according to the standardised protocol of the CONSORT Statement. The CONSORT checklist must be submitted together with papers reporting clinical trials.

In studies on laboratory animals, the experimental procedures should conform to the principles laid down in the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes and/or the National Research Council Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

Unless the purpose of a paper is to compare specific systems or products, commercial names of clinical and scientific equipment or techniques should only be cited, as appropriate, in the 'Materials and Methods' or 'Acknowledgements' sections. Elsewhere in the manuscript generic terms should be used.

Results: Results should be presented without interpretation. The same data should not be presented in both tables and figures. The text should not repeat numerical data provided in tables or figures but should indicate the most important results and describe relevant trends and patterns.

Discussion: This section has the functions of describing any limitations of material or methods, of interpreting the data and of drawing inferences about the contribution of the study to the wider field of research. There should be no repetition of preceding sections, e.g. reiteration of results or the aim of the research. The discussion should end with a few sentences summarising the conclusions of the study. However, there should not be a separate 'Conclusions' section.

Acknowledgements: Acknowledge the contribution of colleagues (for technical assistance, statistical advice, critical comment etc.) and also acknowledge the source of funding for the project. The position(s) of author(s) employed by commercial firms should be included.

Legends: The table headings should be listed first, followed by the legends for the illustrations.

Tables: Tables should be numbered in Arabic numerals. Each table should be placed on a separate page. Tables should not be constructed using tabs but by utilising the table facilities of the word-processing software.

Illustrations:

- Illustrations should be numbered in Arabic numerals in the sequence of citation. Figure numbers must be clearly indicated on the figures themselves, outside the image area.
- Black and white half-tone illustrations must have a final resolution of 300 dpi after scaling, line drawings one of 800-1200 dpi.
- Figures with a screen background should not be submitted.
- When possible, group several illustrations in one block for reproduction (max. size 180 x 223 mm).

Color Illustrations

Online edition: Color illustrations are reproduced free of charge. In the print version, the illustrations are reproduced in black and white. Please avoid referring to the colors in the text and figure legends.

Print edition: Up to 6 color illustrations per page can be integrated within the text at CHF 760.00 per page.

References

Reference to other publications should give due acknowledgement to previous work; provide the reader with accurate and up-to-date guidance on the field of research under discussion; and provide evidence to support lines of argument. Authors should select references carefully to fulfil these aims without attempting to be comprehensive.

Cited work should already be published or officially accepted for publication. Material submitted for publication but not yet accepted should be cited as 'unpublished results', while unpublished observations communicated to the authors by another should be cited as 'personal communication', with credit in both cases being given to the source of the information. Neither unpublished nor personally communicated material should be included in the list of references. Abstracts more than 2 years old and theses should not be cited without a good reason, which should be explained in the covering letter accompanying the paper.

References should be cited by naming the author(s) and year. Where references are cited in parenthesis, both names and date are enclosed in square brackets. Where the author is the subject or object of the sentence, only the year is enclosed in brackets.

One author: [Frostell, 1984] or Frostell [1984].
Two authors: [Dawes and ten Cate, 1990] or Dawes and ten Cate [1990].
More than two authors: [Trahan et al., 1985] or Trahan et al. [1985].

Several references cited in parenthesis should be in date order and separated by semi-colons: [Frostell, 1984; Trahan et al., 1985; Dawes and ten Cate, 1990].

Material published on the World Wide Web should be cited like a reference to a print publication, and the URL included in the reference list (not in the text), together with the year when is was accessed.

The reference list should include all the publications cited in the text, and only those publications. References, formatted as in the examples below, should be arranged in strict alphabetical order. All authors should be listed. For papers by the same authors, references should be listed according to year. Papers published by the same authors in the same year should be distinguished by the letters a, b, c, ... immediately following the year, in both the text citation and the reference list. For

abbreviation of journal names, use the Index Medicus system. For journals, provide only the year, volume number and inclusive page numbers.

Digital Object Identifier (DOI)
S. Karger Publishers supports DOIs as unique identifiers for articles. A DOI number will be printed on the title page of each article. DOIs can be useful in the future for identifying and citing articles published online without volume or issue information. More information can be found at www.doi.org

Examples

(a) Papers published in periodicals: Lussi A, Longbottom C, Gygax M, Braig F: Influence of professional cleaning and drying of occlusal surfaces on laser fluorescence in vivo. Caries Res 2005;39:284-286.

(b) Papers published only with DOI numbers: Theoharides TC, Boucher W, Spear K: Serum interleukin-6 reflects disease severity and osteoporosis in mastocytosis patients. Int Arch Allergy Immunol DOI: 10.1159/000063858.

(c) Monographs: Matthews DE, Farewell VT: Using and Understanding Medical Statistics. Basel, Karger, 1985.

(d) Edited books: DuBois RN: Cyclooxygenase-2 and colorectal cancer; in Dannenberg AJ, DuBois RN (eds): COX-2. Prog Exp Tum Res. Basel, Karger, 2003, vol 37, pp 124-137.

(e) Patents: Diggens AA, Ross JW: Determining ionic species electrochemically. UK Patent Application GB 2 064 131 A, 1980.

(f) World Wide Web: Chaplin M: Water structure and behavior. www.lsbu.ac.uk/water, 2004.

Author's Choice™

With this option the author can choose to make his article freely available online against a one-time fee of CHF 2,750.00. This fee is independent of any standard charges for supplementary pages, color images etc. which may apply. More information can be found at www.karger.com/authors_choice.

Page Charges

There are no page charges for papers of seven or fewer printed pages (including tables, illustrations and references). A charge of CHF 650.00 will be levied for each page in excess of the allotted seven printed pages. The allotted size of a paper is equal to approximately 21 typescript pages (including tables, -illustrations and references).

Proofs

Unless indicated otherwise, proofs are sent to the first-named author and should be returned with the least possible delay. Alterations made in proofs, other than the correction of printer's errors, are charged to the author. No page proofs are supplied to the author.

Reprints

Order forms and a price list are sent with the proofs. Orders submitted after this issue is printed are subject to considerably higher prices.