CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DA INTERRELAÇÃO FLÚOR-MANGANÊS EM RATOS *

IDA MARIA VIANNA DE OLIVEIRA **
MARIA APPARECIDA POURCHET-CAMPOS ***

RESUMO

Devido a numerosas discrepâncias nos resultados de estudos experimentais relativos à interação flúor-manganês, propusemo-nos a verificar se a adição de manganês à água fluoretada (1 ppm), em diferentes proporções flúor-manganês, levaria a uma diferente fixação do halogênio. Para tanto, 24 ratos Wistar, recém-desmamados, foram mantidos em dieta padrão de caseína a 27%, recebendo na sua água de consumo: 1) H_2O destilada (controle); 2) 1,0 ppm de flúor; 3) 1,0 ppm de flúor + 0,5 ppm de manganês (F:Mn = 2,0); 4) 1,0 ppm de flúor + 1,0 ppm de manganês (F: Mn = 1,0). Foram anotados o peso ganho e o consumo de alimento e água, durante os 60 dias de experimento, após o qual as pa

* Entregue para publicação em 21/01/80.
** Departamento de Tecnologia Rural, E.S.A. "Luiz de Queiroz", USP.
*** Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Campus de Araraquara, UNESP.

tas traseiras, dos animais sacrificados, foram autoclavadas e desossadas, e os fêmures retirados. Posteriormente, foram estes submetidos à secagem, extração da gordura, pulverização e análise do flúor fixado.

Também foram efetuadas análises da composição centesimal da ração e de flúor e manganês nesta e nas diferentes águas de consumo. Os resultados de percentagem do flúor ingerido fixado nos fêmures, foram analisados estatisticamente pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis (níveis de 1% e 5%) mostrando que, para as proporções consideradas, o flúor na taxa de 1 ppm, o manganês, quando administrado após o desmame, parece não afetar a fixação do flúor. Contudo, faz-se necessário dar continuidade aos estudos com novas proporções e taxas mais elevadas de flúor e manganês.

INTRODUÇÃO

O flúor tem sido exaustivamente estudado, em decorrência, talvez, de suas notáveis qualidades químicas, que o fazem, fisiologicamente, mais ativo que qualquer outro ion elementar e lhe conferem qualidades de grande interesse e importância para a saúde e bem estar humanos. É indiscutível seu papel benéfico em relação à cárie dental, sendo considerado o mais efetivo agente conhecido no seu combate. A fluoretação das águas de abastecimento público tem sido medida recomendada pelas autoridades sanitárias e tem proporcionado uma redução de cerca de 60% na incidência de cárie dental conforme o demonstram, fartamente, estudos de JENKINS (1970), MAIER (1971), VIEGAS & VIEGAS (1974), ERICSSON (1977), entre outros.

A possibilidade de que, além do flúor, outros elementos - traço possam modificar o progresso da cárie vem

sendo apontada por inúmeros experimentos "in vitro" e com animais.

Conforme sugerido por LOSEE & BIBBY (1970), GLASS *et alii* (1973) e SHEARER & SUTTIE (1977), entre outros autores, a ação desses elementos na prevalência da cárie dental pode sobrevir de uma interação, com o flúor, afetando sua absorção ou metabolismo e assim alterando suas disponibilidades para fixação nos tecidos mineralizados ou para ligação na superfície do esmalte.

O manganês é um dos elementos que tem participação bem estabelecida no processo de calcificação (HURLEY, 1961; UNDERWOOD, 1977), cuja ação em estruturas dentais tem sido constatada. STEPHAN & HARRIS (1953), trabalhando com animais cuja dieta foi acrescida de manganês (0,0003% e 0,1%), relataram, além de maior pigmentação nos incisivos, uma diminuição no desenvolvimento de cáries. O manganês também se mostrou efetivo na inibição de cáries em estudos de MUNCH (1959) e LAPINSKA *et alii* (1968) realizados com Hamster a níveis dietários de 0,3 ppm e 0,4 ppm, respectivamente. Contrariamente, LOSEE & BIBBY (1970) e LOSEE & LUDWIG (1970), ao analisar dados de investigações clínicas e epidemiológicas, encontraram, mais frequentemente, uma significante correlação entre altos níveis de manganês e aumento de cáries. O mesmo foi verificado em anos recentes, na Colômbia, entre as comunidades de Heliconia e Don Matias, tendo-se associado um maior número de cáries nos habitantes desta última, com maior consumo de manganês, entre outros elementos-traço (GLASS *et alii*, 1973). Também BRINER (1970) admite que o manganês possa aumentar a susceptibilidade dos dentes à cárie. Contudo, nenhum efeito pré-eruptivo foi observado por KRUGER (1959) e por BUTTNER (1963) em ratos, quando vários níveis de manganês foram administrados. Revisando a literatura sobre o assunto, NAVIÁ (1972) sugere uma classificação em que o manganês aparece como elemento cuja ação não está ainda claramente, estabelecida, sendo que alguns estudos evidenciam-no como agente cariostático enquanto outros apontam-no como inefetivo e mesmo cariogênico.

Já, indicações de uma possível interação entre o manganês e o flúor têm sido apresentadas por OCKERSE & WAS-

SERSTEIN (1956) e EL TANNIR (1959) que assinalam a presença de manganês em esmalte manchado característico da fluorose dental.

Outros trabalhos de TORELL (1960) e TORELL & RIDELL (1962) têm identificado cristais de $KMnF_3$ nas camadas superficiais de dentes fluoróticos.

NIKOLAEV & KAS'YANOVA (1969), porém, encontraram uma redução de 32% nos níveis sanguíneos de manganês em trabalhadores com maior grau de fluorose e TULS (1970) obteve resultados que o levaram a concluir ser a administração de manganês efetiva na diminuição dos efeitos negativos de um excesso de flúor.

Adicionalmente, a influência do manganês na retenção de flúor em tecidos mineralizados tem sido explorada. Um dos primeiros pesquisadores a se preocupar com esta possibilidade foi POURCHET-CAMPOS (1954, 1956), que demonstrou a importância do estudo e conhecimento da interrelação e eventual competição entre os mesmos na dieta. Considerou, inicialmente, o manganês como elemento favorável à fixação do flúor (1954), mas em investigações adicionais (1956) evidenciou que o manganês, quando administrado em taxas superiores à de flúor total, parecia ter ação inibidora à fixação deste.

Outros autores como BUTTNER (1961, 1963, 1969) e FURLANETTO (1970), trabalhando com ratos recém-desmamados, concluiram não ser a fixação do flúor afetada pelo manganês.

Pode-se notar pelo exposto, uma certa divergência relativa à interação flúor-manganês o que nos motivou a estudá-la. Para tanto trabalhamos com flúor na concentração normalmente recomendada para redução de cáries (1 ppm) e manganês em taxa 50% inferior ou igual àquela de flúor (0,5 e 1 ppm).

MATERIAIS E MÉTODOS

Material

Animais

Vinte e quatro ratos machos, da linhagem Wistar, recém-desmamados e pesando, aproximadamente, trinta gramas, foram divididos em grupos, e alojados em gaiolas metabólicas individuais com comedouros proeminentes e bebedouros de vidro em forma adequada ao controle rigoroso da ingestão de ração e água (ZUCAS *et alii*, 1969).

Os animais receberam "ad libitum" dieta padrão de caseína a ± 27% e água contendo manganês e flúor em proporções conhecidas.

A distribuição dos diferentes grupos experimentais em função do teor de flúor e manganês (ppm) e proporção F: Mn, pode ser melhor visualizada na Tabela 1.

Tabela 1 - Grupos experimentais

Animais		Tratamento		
Grupo	nº	Fluor (ppm)	manganês (ppm)	F:Mn
I	6	0,0	0,0	-
II	6	1,0	0,0	-
III	6	1,0	0,5	2
IV	6	1,0	1,0	1

Foi anotado, a cada três dias, o consumo de ração e água e semanalmente, o peso dos animais durante os 60 dias de experimento.

Tabela 2 - Constituintes e composição centesimal da ração de consumo, bem como teores de flúor e manganês presentes

Constituintes		Composição centesimal		
Especificação	0%	Especificação		%
Proteina (caseína)	27,00	Umidade		13,88
Óleo (de soja)	8,00	Fração protéica		29,16
Sabugo de milho	1,50	Fração lipídica		8,20
Sacarose	10,00	Fração fibra total		2,07
Misturas		Fração mineral (cinza)		4,23
Salina *	4,00	Fração nifext (por difer.)		42,46
Vitamínica **	1,00		ppm	%
Amido	46,00	Flúor	0,02	0,000002
Conservador (benzoato de sódio)	0,10	Manganês	2	0,0002
Corante	0,01			

* Carbonato de cálcio ($CaCO_3$) 16,67%; carbonato de zinco ($ZnCO_3$) 0,22%; citrato férrico ($Fe_6H_5O_7.5H_2O$) 0,33%; cloreto de sódio (NaCl) 6,67%; cloreto de potássio (KCl) 11,67%; fosfato de potássio ($CaHPO_4$) 47,33%; fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4) 11,67%; iodeto de potássio (KI) 0,02%; sulfato de cobre ($CuSO_4$) 0,02%; sulfato de magnésio ($MgSO_4$) 5,00%.

**Ácido ascórbico 10%; ácido fólico 0,02%; ácido p-aminobenzóico 1%; biotina 0,003%; colina (bitartarato) 20%; inositol 10%; niacina 0,5%; pantotenado de cálcio 0,2%; piridoxina HCl 0,05%; retinol 0,1%; riboflavina 0,05%; tiamina 0,05%; vitamina B_{12} 0,003%; vitamina E 0,5%; vitamina K 0,2%; vitamina D 0,01%; sacarose q.s.p. 100g.

Ração e água de consumo

Utilizou-se ração balanceada, preparada de acordo com a técnica descrita por LAJOLO *et alii* (1969) cuja composição e análise química estão expostas na Tabela 2. A mistura salina utilizada foi a de FOX & BRIGGS (1960), sem adição de manganês.

Constituiu a água de consumo, água destilada na qual foi feita a adição de quantidades suficientes de NaF e $MnCl_2 4H_2O$ para obter as concentrações e proporções estabelecidas de flúor e manganês. Os constituintes e dados de análise de flúor e manganês estão contidos na Tabela 3.

Tabela 3 - Teor final de flúor e manganês na água de consumo dos diferentes grupos de animais

Grupo	Tratamento			Água			
				Constituintes (mg/l)		Análise química (ppm)*	
	F (ppm)	Mn (ppm)	F:Mn	NaF	$MnCl_2 4H_2O$	F	Mn
I	0,0	0,0	0	0,000	0,000	-0,09	0,00
II	1,0	0,0	1/0	2,212	0,000	1,05	0,00
III	1,0	0,5	2	2,212	1,800	1,12	0,50
IV	1,0	1,0	1	2,212	3,601	1,03	1,02

* Média de 3 determinações.

Preparo das amostras

Após o período experimental (60 dias) sacrificaram-se os animais através de inalação de éter etílico e os membros inferiores foram cuidadosamente descarnados (após autoclavagem a 1 atm por 30 minutos). Os fêmures foram, então separados, dessecados a 105ºC e desengordurados, durante 36 horas em aparelho de Soxhlet, com éter etílico como solvente. A pulverização do material seco e desengordurado foi efetuada através de amalgamador, usando-se cápsula de aço.

Métodos

Químicos

Composição centesimal da ração

Foram realizadas determinações de umidade, resíduo mineral fixo (cinza), nitrogênio (ARNOLD, 1947), extrato etéreo, fração fibra (HENNEBERG, 1947) e fração NIFEXT (por diferença).

Determinação de flúor

O halogênio foi isolado do material, seco, desengordurado e pulverizado, através do método descrito por ZUCAS & LAJOLO (1968) e determinado, colorimetricamente, pela técnica de MEGREGIAN (1954), modificada por ZUCAS & LAJOLO (1968).

Determinação de manganês

O manganês foi dosado na água e ração de consumo dos grupos experimentais por espectrofotometria de absorção atômica (modelo BECKMAN 440; λ = 279 µm).

Estatísticos

Para averiguar se houve diferença entre os grupos, utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis aos níveis 1,0 e 5,0% de significância. A localização das diferenças existentes entre cada dois grupos foi feita através do teste complementar de "comparação múltipla" (HOLLANDER & WOLFE, 1973).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos encontram-se nas Tabelas 4, 5 e 6.

Tabela 4 - Peso corporal médio dos diferentes grupos de animais e ganho médio de peso durante o período experimental

Animais		Tratamento			Peso (g)		
Grupo	Nº	F (ppm)	Mn (ppm)	F:Mn	Inicial	Final	Ganho
I	6	0,0	0,0	-	27,12	263,51	240,02
II	6	1,0	0,0	-	27,50	268,25	240,72
III	6	1,0	0,5	2	27,62	258,53	231,13
IV	6	1,0	1,0	1	27,88	270,57	242,68

Tabela 5 - Consumo médio de ração (g), água (ml) e flúor (µg) pelos diferentes grupos de animais

Animais		Tratamento			Consumo				
		F	Mn	F:Mn	Ração		Água		Flúor
Grupo	Nº	(ppm)	(ppm)		(g)	F(µg)	(ml)	F(µg)	(µg)
I	6	0,0	0,0	-	898,72	-	1248,40	-	-
II	6	1,0	0,0	-	904,75	-	1228,17	1289,55	1289,55
III	6	1,0	0,5	2	882,72	-	1246,80	1396,41	1396,41
IV	6	1,0	1,0	1	921,18	-	1303,86	1342,93	1342,93

Tabela 6 - Fêmur - Peso médio, em mg, do material seco e desengordurado (PSD). Valores médios de flúor total ingerido (µg); concentração de flúor (em ppm), flúor retido total (µg) e percentual retido no material seco e desengordurado, em relação ao flúor total ingerido

Animais		Tratamento			Material	Flúor			
		F	Mn	F:Mn	PSD	Total ingerido		Fixado	
Grupo	Nº	(ppm)	(ppm)		(µg)	(µg)	ppm	Total (µg)	%
I	6	0,0	0,0	-	0,6037	0,00	21,93	13,26	-
II	6	1,0	0,0	-	0,6252	1289,55	41,17	25,66	2,00
III	6	1,0	0,5	2	0,5948	1396,41	41,54	23,88	1,78
IV	6	1,0	1,0	1	0,6658	1342,93	45,23	30,09	2,23

Na Tabela 4 pode-se observar que o crescimento dos animais submetidos à dieta baixa em flúor (0,02 ppm) não diferiu, significativamente ($p > 0,05$) daqueles que receberam 1 ppm de flúor na água de consumo, confirmando resultados de outros autores, como MAURER & DAY (1957) e DOBERENZ *et alii* (1964).

Não se verificaram diferenças no consumo de alimento (Tabela 5) que, conforme observado por COTZIAS (1962), seria menor em grupos com dieta pobre em manganês.

Também a restrição do manganês dietário não alterou de forma significativa o peso dos animais (grupos I e II) no decorrer do período experimental, embora o "Comittee on Animal Nutrition" (1966) tenha estabelecido um consumo de 0,5 mg de manganês/rato/dia para um desenvolvimento ideal de ratos. WACHTEL *et alii* (1943), contudo, obtiveram um ganho em peso razoável com animais sob ingestão dez vezes menor (0,05 mg/rato/dia).

Os mesmos autores (1943), trabalhando com ratos sob dieta deficiente em manganês, encontraram uma redução no peso e conteúdo de cinza de ossos. Da mesma forma, TAL & GUGGENHEIM (1965) verificaram que a adição de manganês à dieta de ratos, alimentados com carne, ocasionava um aumento na calcificação e, consequentemente, no peso e cinza do fêmur desses animais. Contudo, não constatamos diferenças, estatisticamente significativas, entre os diferentes grupos experimentais, para o peso do fêmur seco e desengordurado (Tabela 6).

Já a concentração de flúor (em ppm) apresentou-se significativamente maior no fêmur de animais que receberam 1 ppm de flúor quando comparado ao daqueles que não receberam o halogênio na água, concordando com resultados de FURLANETTO (1970) e FURLANETTO *et alii* (1973), entre outros autores. A maior diferença encontrada ($p < 0,01$) foi entre o grupo I (0 ppm F e 0 ppm Mn) e o grupo IV (1 ppm de F e 1 ppm Mn) sendo que nas comparações entre o grupo I e os grupos II e III foram encontradas diferenças apenas ao nível de 5% de significância.

Para a concentração em µg foi constatada diferença ($p < 0,01$) entre o grupo I e o grupo IV.

Nenhuma diferença significativa foi observada nos grupos experimentais que receberam flúor e manganês simultaneamente, tanto para a concentração em ppm como para a fixação em µg.

Na análise dos resultados da % fixada de flúor em função do ingerido, nota-se uma ligeira diminuição no flúor fixado com a adição de 0,5 ppm de manganês. Já o acréscimo de 1 ppm de manganês pareceu aumentar a fixação do halogênio. Estes resultados porém, não foram estatisticamente significativos em nenhum dos níveis considerados.

Fato semelhante foi constatado por FURLANETTO (1970) e FURLANETTO *et alii* (1973) na tíbia e mandíbula de animais, recebendo diferentes níveis de flúor e manganês (10 a 25 ppm de flúor e 0, 2,5 e 15 ppm de manganês) e proporções F:Mn superiores a 1. Também BUTTNER (1961, 1963), trabalhando com ratos desmamados que receberam 50 ppm de flúor e/ou 50 ppm de manganês na água de beber (F:Mn = 1), não conseguiu verificar alterações significativas na fixação do halogênio no fêmur dos animais.

Revisando os possíveis efeitos do manganês entre outros elementos na deposição de flúor em tecidos calcificados, tanto BUTTNER (1969) como ZIPKIN (1971) consideram que o manganês não parece afetá-la significativamente.

POURCHET-CAMPOS (1956), contudo, estudando a interrelação flúor-manganês, admitiu a possibilidade de estar o efeito positivo ou negativo do manganês na deposição óssea do flúor, condicionado à proporção presente destes elementos. Seus resultados evidenciam que um efeito inibidor na fixação do halogênio só se faria sentir com proporções F:Mn inferiores a 0,7. Esse fato, talvez, justifique nossos resultados visto que trabalhamos com proporções F:Mn iguais a 1 e 2, e portanto superiores a 0,7. Contudo, para obtenção de resultados mais conclusivos, faz-se necessária a continuidade dos estudos com novas proporções e taxas mais elevadas de flúor e manganês.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem concluir que para as proporções consideradas e flúor na taxa de 1 ppm, o manganês, quando administrado após o desmame parece não afetar a fixação do flúor no fêmur de ratos.

SUMMARY

A CONTRIBUTION TO THE STUDY OF A RELATIONSHIP FLUORINE-MANGANESE IN RATS

An experiment to determine the effects of varying the manganese concentration of the diet on the fluorine retention in the femur of rats was made.

Four groups of weaning rats were fed "ad libitum" a 27% casein synthetic diet and were provided with water as follows: 1) distilled (control); 2) containing 1 ppm of fluorine (F); 3) 1,0 ppm F + 0,5 ppm Mn; 4) 1 ppm F + 1 ppm Mn.

The weight gain and food and water consumption were measured during 60 days.

The results indicated that manganese does not seem to affect the proportional fixation of fluorine in the femur. The authors think that more data should be available before a definite conclusion on the influence of the ratio F:Mn on the fluorine retention could be drawn.

LITERATURA CITADA

ARNOLD, Z., 1947. **Anat. Chem. 28**: 188, 1889. Apud WINTON, A.C. & WINTON, K.B. **Analisis de alimentos**, Buenos Aires, Editorial Hispano Americano, p.55.

BRINER, A.; CERASA, G.; BARROS, L., 1970. Influence of certain chemical elements in the susceptibility of teeth to caries. Odont. Chile **18**: 36-40. Apud **Fluorine Abstr. 9**: 154, 1969-1972.

BUTTNER, W., 1961. Effects of some trace elements on floride retention and dental caries. **Archs. Oral Biol. 6**: 40-46.

BUTTNER, W., 1963. Action of trace elements on the metabolism of fluoride. **J. Dent. Res. 42**: 453-460.

BUTTNER, W., 1969. Trace elements and dental caries in experiments on animals. **Caries Res. 3**: 1-13.

COMMITTEE ON ANIMAL NUTRITION-SUBCOMMITTEE ON LABORATORY ANIMAL NUTRITION, 1966. **Nutrient requirements of laboratory animals**, 3a. ed., NAS-NRC, p.51-80.

COTZIAS, G.C., 1962. Manganese. In COMAR, C.L. & BRONNER, F. (Ed.) **Mineral metabolism - An advanced treatise**, New York, Academic Press, Volume II - Part B, The elements, Cap. 33, p.403-442.

DOBERENZ, A.R.; KURNICK, A.A.; KURTZ, E.B.; KEMMERER, A.R.; REID, B.L., 1964. Effect of a minimal fluoride diet on rats. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **117**: 689-693.

EL TANNIR, M.D., 1959. Mottling of enamel in Mecca and the Arabia Peninsula. A survey and research study carried out in Saudi Arabia. Am. J. Publ. Hlth. **49**: 45-52.

ERICSSON, S.Y., 1977. Cariostatic mechanisms of fluorides: clinical observations. Caries Res. **11**: 2-41.

LAJOLO, F.M.; FRANÇA, H.M.C.; ZUCAS, S.M., 1969. Importância da cor da ração no consumo por ratos. Rev. Fac. Farm. Bioquim. São Paulo **7**(1): 95-103.

LAPINSKA, A.; NAGÓRSKI, J.; PORASZKA, J., 1968. Upty fluoru i manganu na próchnice zebów A. Obraz. Czas Stomat. **21**: 776 780.

LOSEE, F.L.; BIBBY, B.G., 1970. Caries inibition by trace elements other than fluorine. N.Y. St. Dent. J. pp. 3615-19.

LOSEE, F.L.; LUDWIG, T.G., 1970. Trace elements and caries. J. Dent. Res. **49**: 1229-1235.

MAIER, F.I., 1971. **Fluoruración del agua potable.** Organización Panamericana de Salud (Publicación Científica, 203).

MAURER, R.L.; DAY, H.G., 1957. The non-essenciality of fluorine in nutrition. J. Nutr. **62**: 561-573.

MEGREGIAN, S., 1954. Rapid spectrophotometric determination of fluoride with zircunium - criocrome cyanine R lake. Analyt. Chem. **26**: 1161-1166.

MUNCH, J., 1959. Die Rolle des Spurenelements mangan bei der kariesprophylaxe. J. Dent. Belge. 4: 265-271.

NAVIA, J.M., 1972. **Prevención de la carie dental: agentes que aumentan la resistencia del dentie a la caries.** Memorias del XV Congresso Dental Mundial, México.

NIKOLAEV, V.I.; KAS'YANOVA, K.G., 1969. The role of manganese in the development of occupational fluorine poisoning of workers of aluminum plants. Tr. Azerb. Nauch-Issled. **4**: 84-86. Apud Chem. Abstr. 140348s.

OCKERSE, T.; WASSERSTEIN, B.S., 1955. Stain in mottled enamel. J. Am. Dent. Ass. **50**: 536-538.

FOX, M.R.S.; BRIGGS, G.M., 1960. Salt mixtures for purified type diets. III. An improved salt mixture for chiks. J. Nutr. **72**: 242-250.

FURLANETTO, S.M.P., 1970. **Influência do manganês na fixação do flúor em tecidos mineralizados de ratos** (**Ensaio com taxas moderadas de manganês**), São Paulo, 65p., Doutoramento DANE/USP.

FURLANETTO, S.M.P.; ZUCAS, S.M.; PENTEADO, M. de V.C., 1973. Contribuição ao estudo da inter-relação flúor-manganês. Rev. Farm. Bioquim. Univ. S. Paulo **11**(2): 179-196.

GLASS, R.L.; ROTHMAN, K.J.; ESPINHAL, F.; VELEZ, H.; SMITH,

N.J., 1973. The prevalence of human dental caries and water -borne trace metals. Archs. Oral. Biol. **18**: 1099-1105.

HENNEBERG, L.V.S., 1964. Apud WINTON, A.C. & WINTON, K.B., 1947. **Analisis de alimentos, Buenos Aires**, Editorial Hispano-Americano, p.76.

HOLLANDER, M.; WOLFE, D.A., 1973. **Non parametric statistical methods**, New York, John Wiley Co., p.15-38.

HURLEY, L.S.; EVERSON, G.J.; WOOTEN, E.; ASLING, W.C., 1961. Disproportionate growth in offspring of manganese deficient rats. I. The long bones. J. Nutr. **74**: 274-281.

JENKINS, G.N.M., 1970. Physiological effects of small doses of fluoride - mechanism of effects in the mouth. In WHO-**Fluorides and Human Health**, Geneva, WHO, p.201-223.

KRUGER, B.J., 1959. The effect of "trace elements" on expeperimental dental caries in the albino rat. Univ. Queens land Papers **1**: 1-28. Apud BUTTNER, W., 1961. Effects of some trace elements on fluoride retention and dental caries. Archs. Oral Biol. **6**: 40-49.

POURCHET-CAMPOS, M.A., 1954. Fatores de influência provável no aproveitamento biológico do flúor natural de alimentos. An. Fac. Odont. Univ. S. Paulo **12**: 143-147.

POURCHET-CAMPOS, M.A., 1956. Contribution a l'étude de la fixation du fluor dans les os. (Corrélations fluor - calcium-et flúor-manganese). **In Hommage au Doyen René Fabre**, Paris, Ed. Sedes, p.339-344.

SHEARER, T.R.; SUTTIE, J.W., 1977. Other factors influencing the cariostatic properties of fluoride - trace mineral interactions. In LARSON, R.H., 1977. Animal studies relating to caries inhibition by fluoride. Caries Res. **11** (Suppl. I): 42-58.

STEPHAN, R.M.; HARRIS, M.R., 1953. The effect of manganese in the diet on dental caries in the rat. J. Dent. Res. **32**: 708.

TAL, E.; GUGGENHEIM, K., 1965. Effect of copper and manganese on calcification of bones of rats fed on meat. Nutr. Dieta 7: 62-70.

TORELL, P., 1960. The presence of $KMnF_3$ in mottled decidous dental enamel. Svensk Tanol. Tidsprift **53**: 703-705.

TORELL, P.; RIDELL, A., 1962. Potassium manganous fluoride in mottled enamel. Odont. Rev. **13**: 127-129.

TUSL, J., 1970. Effect of fluoride and manganese in large doses on minerals and trace elements in rats. Fluoride **3**: 49-53.

UNDERWOOD, E.J., 1977. **Trace elements in human and animal nutrition**, 4a. ed., New York, Academic Press, 545p.

VIEGAS, I.; VIEGAS, A.R., 1974. Análise dos dados de prevalência de cárie dental na cidade de Campinas, SP, Brasil, depois de dez anos de fluoração da água de abastecimento público. Rev. Saúde Pública, São Paulo, **8**: 399-409.

WACHTEL, L.W.; ELVE HJEM, C.A.; HART, E.B., 1943. Studies on physiology of manganese in the rat. Am. J. Physiol. **140**: 72-82.

ZIPKIN, I., 1971. Interrelation of fluoride with other components of calcified tissue. Biblthca "Nutr. Dieta" **15**: 62-78. Apud Fluoride Abstr. **1**: 10-11.

ZUCAS, S.M.; LAJOLO, F.M., 1968. Frasco de difusão para isolamento de microquantidades de flúor. Rev. Fac. Farm. Bioquím. São Paulo **6**: 33-44.

ZUCAS, S.M.; LAJOLO, F.M.; BARBERIO, J.C., 1969. Gaiola metabólica para ratos, testadas por meio de zinco radioativo ^{65}Zn. Rev. Fac. Farm. Bioquím. São Paulo **7**(2): 353-359.