

## INFLUENCIA DA QUALIDADE DA PROTEINA NA FIXACAO OSSEA DO FLUOR

*Roberval de Almeida Cruz\*, Sérgio Miguel Zucas\*\**

Faculdade de Ciencias Farmaceuticas, Cidade Universitaria, Sao Paolo

### RESUMO

O trabalho foi executado com 45 ratos da linhagem Wistar, como 30 dias de idade, os quais foram divididos em 5 (cinco) grupos, recebendo as seguintes dietas: caseína, feijão e farinha de trigo, sendo as duas últimas suplementadas ou não com DL-metionina e DL-Lisina, respectivamente. Os animais receberam a dieta e água fluoretada (25 ppm) "ad libitum" por 28 dias, durante o qual foi anotado o consumo dos mesmos, assim como o peso dos ratos. Após o período experimental, os animais foram sacrificados, a mandíbula e tíbias removidas e analisadas para flúor, cinza, cálcio e fósforo.

Os resultados demonstraram que a fixação do flúor nos ossos aumenta significativamente com a suplementação da proteína. A mandíbula demonstrou menor fixação que a tíbia. Os teores de cinza, cálcio e fósforo não mostraram diferenças nos diversos grupos.

Os resultados sugerem uma interação entre a qualidade de proteína e a fixação percentual do flúor fixado nos ossos.

### INTRODUCAO

Apesar de frequentes referências de estudiosos a diferentes fatores eventualmente presentes nas dietas e na alimentação, de modo geral <sup>(1)</sup> <sup>(2)</sup> <sup>(3)</sup> <sup>(4)</sup> <sup>(5)</sup>, a correlação do flúor com substâncias orgânicas dos alimentos particularmente proteínas, pouco tem sido estudada. Cabe referir que, de forma bastante insistente, tem havido correlacionamento de prevalência de cárie com o consumo de glícides, particularmente sacarose <sup>(6)</sup> <sup>(7)</sup> <sup>(8)</sup>, sem que, contudo, seja levado em conta a fato de que o maior consumo de glícides

\* Auxiliar de Ensino da disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

\*\* Professor Adjunto do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de USP.

alimentares implica em desequilíbrio nutricional, graças à diminuição percentual do consumo, quer de prótidos, quer de lípides.

É lícito perguntar em que medida as substâncias orgânicas nitrogenadas, que tanta significação tem para o equilíbrio do organismo, podem interferir na fixação óssea do flúor, se não por ação direta (9), talvez por diferentes mecanismos indiretos.

Sabe-se que a proteção oferecida pelo flúor para o combate à cárie varia numa faixa ampla, apesar de ser a taxa administrada sempre a mesma, isto é, nas condições preconizadas pela OMS(10). E, pois, com pertinência que se afirma, como fizeram vários participantes da "Conferência sobre o papel dos alimentos no aparecimento da cárie"(1), que são necessários muito mais dados sobre o uso dos alimentos e prevalência de cárie nos diversos grupos populacionais, para poder determinar a relação do açúcar ou outros produtos com a etiologia da cárie(11).

Afirmativas esparsas na literatura científica levam-nos a levantar diferentes hipóteses sobre o papel eventual de algumas substâncias presentes nos alimentos, interferindo na ação favorável do flúor em relação à higidez dos dentes.

ZIPKIN e col. (9), por exemplo, observaram que o aumento no teor de proteína na ração promovia o aumento de consumo de água pelo animal.

Ora, esta informação é importante quando se pensa que o veículo preferencial do flúor para o organismo é a água de beber, a qual tendo sua taxa de ingestão aumentada, vem a carrear maior teor do halogênio para o organismo.

NIZEL(12) afirmou que aminoácidos ou proteínas das dietas podem ter efeito inibidor da cárie, mas sem cogitar da correlação destes compostos com a fixação do flúor, embora relate o fato de que crianças da cidade do Cabo, na África, que recebiam maior taxa de proteína e flúor, apresentavam menor incidência de cárie que outras com pouca proteína e flúor.

Muhlemann(13), ao discutir o tema "Cárie e Proteína" no Simpósio sobre "As relações da nutrição com a cárie dental"(14), postulou a necessidade de estudos para verificar o efeito protetor da proteína e, particularmente, dos aminoácidos alimentares, embora pudesse parecer que tais compostos eram de pequeno significado na proteção direta contra o aparecimento da cárie. Vale lembrar que BAVETTA & BERNICK(15) e Bernick & Bavetta(16) observaram que a deficiência em lisina e triptofano provocava, respectivamente, alterações na matriz orgânica do osso e dentina e distúrbios no processo de mineralização da dentina.

Por que, pois, não pensar que a qualidade da proteína disponível na alimentação pode ser, também, responsável pela maior ou menor fixação do flúor que chega ao organismo?

Qualquer resposta a esta hipótese é de importância fundamental para o sanitaria, dados os problemas de consumo de proteína por populações menos favorecidas de meios aquisitivos. No momento em que a Organização Mundial de Saúde, através de FAO, procura encarar realisticamente o problema da ingestão de proteínas em correlação com as quotas calóricas consumidas pelos indivíduos em diferentes idades, parece-nos licito e pertinente, abordar a incógnita das possíveis correlações existentes entre proteínas e fixação óssea do flúor, com vistas a equacionar, em uma segunda etapa, as interações cárie-flúor-proteína alimentar.

O ponto de partida para qualquer investigação no sentido anteriormente referido, parece-nos estar na comparação do comportamento de proteínas de diferentes valores biológicos, visto que já vai longe o tempo em que a proteína era tomada como uma entidade nutricional, sem a cogitação de sua hierarquia.

Decidimos, pois, numa primeira etapa, verificar se as proteínas se comportavam, no tocante à fixação óssea do flúor, em função de seu valor biológico, ou o que é o mesmo, em função da existência ou não de fator limitante em sua composição.

Admitindo, em princípio, que o consumo de taxa adequada de proteína de alto valor biológico (como tal entendida a proteína de que estão ausentes fatores limitantes) constituiu a condição ideal para o pleno aproveitamento biológico de todos os nutrientes, que com ela possam ser relacionados, decidimos ensaiar proteínas de fator limitante conhecido, verificando a extensão da viabilidade da hipótese formulada.

A experiência seria feita com a proteína deficiente e com a mesma proteína complementada de seu fator limitante, verificando-se, em ambos os casos, a relação com a fixação óssea do flúor.

Se houvesse diferença quantitativamente significativa na fixação do flúor, quando a proteína deficiente fosse suplementada adequadamente de seu fator limitante, haveria a possibilidade de afirmar que a proteína de maior valor biológico é mais favorável ao aproveitamento do flúor pelo organismo e, por conseguinte, vantajosa para o aparecimento das ações favoráveis do halogênio, entre estas, destacada a proteção dos dentes contra o aparecimento da cárie.

Pela frequência com que são usadas na alimentação de grandes grupos populacionais, escolhemos para material de nosso trabalho as proteínas do feijão e da farinha de trigo, ambas com fatores limitantes bem conhecidos e realizamos, com animais de laboratório, ensaios com vistas a:

- 1o. Verificar o efeito da ingestão de rações à base, respectivamente, de feijão e de farinha de trigo, sobre a fixação óssea do flúor, observando em ambos os casos, qual a percentagem retida do halogênio ingerido, na mandíbula e tíbias;

- 2o. Repetir o ensaio complementado as rações, respectivamente, com D-L Metionina para a de feijão e D-L Lisina para a de farinha de trigo;
- 3o. Comparar os resultados obtidos em ambos os ensaios com outros obtidos pelo uso de rações à base de caseína como fonte proteica;
- 4o. Como elemento de controle da verificação da eficiência alimentar da ração, seria acompanhado o aumento de peso de cada animal, ao correr da experiência; também para oferecer subsídios à interpretação dos resultados, seria anotado o consumo de água e ração pelos animais.

## MATERIAL E METODOS

### 2.1 MATERIAL

#### 2.1.1 - Rações

As rações utilizadas na experiência foram preparadas segundo a técnica de LAJOLO e col. (17), usando como fonte proteica a caseína (12,4%), o feijão cozido (42,4%) e a farinha de trigo (75,0%), sendo o feijão suplementado ou não com D-L Metionina a 0,2% e a farinha de trigo com D-L Lisina a 0,3%.

#### 2.1.2 - Água de Beber

A água era oferecida aos animais *ad libitum*, e continha 25 ppm de flúor, na forma de NaF.

#### 2.1.3 - Animais de Experiência

Iniciamos nossa experiência com 45 (quarenta e cinco) ratos (*Rattus norvegicus*, var. *albinus*, **Rodentia**, **Mammalia**), da linhagem "Wistar", machos, com 30 (trinta) dias de vida, os quais foram divididos em 5 (cinco) grupos, os quais receberiam as rações acima descritas.

Os animais foram alojados em gaiolas individuais, e o controle do consumo de ração e da água de beber foi feito cada 2 (dois) dias e o peso dos animais controlado semanalmente.

#### 2.1.4 - Preparo dos Ossos

O ensaio durou 28 (vinte e oito) dias, após os quais os animais foram sacrificados, a cabeça e as patas traseiras retiradas e descarnadas, para a obtenção de mandíbula e tíbias.

Estes ossos foram dessecados, desengordurados, pesados e pulverizados. No pó procedemos a determinação de alguns componentes, a saber: flúor, resíduo mineral fixo (cinza), cálcio e fósforo.

## 2.2. METODOS

O flúor foi determinado no material seco, desengordurado e pulverizado. O isolamento do elemento foi possível com o frasco de ZUCAS (<sup>18</sup>), experimentado por TAMBURINI & ZUCAS (<sup>19</sup>) e modificado por ZUCAS & LAJOLO (<sup>20</sup>)

A quantidade de flúor foi determinada pelo método colorimétrico de MEGREGIAN (<sup>21</sup>). A fração cinza foi determinada por incineração em forno mufla a 550°C até peso constante.

A determinação do cálcio foi realizada por meio de ácido clorântrico, como descrito no método espectrofotométrico de FERRO & HAM (<sup>22</sup>)

O método utilizado para a determinação do fósforo foi o espectrofotométrico de FISKE & SUBBAROW (<sup>23</sup>)

O coeficiente de eficácia proteica (CEP) foi calculado computando-se o total de proteína ingerida pelos animais após 28 dias de experiência, e relacionando-se este dado com o aumento de peso corporal.

## RESULTADOS E DISCUSSAO

Os resultados obtidos no presente trabalho, quanto ao aumento de peso dos animais, consumo de ração, água e coeficiente de eficácia proteica, expostos na tabela 1, mostram, claramente, que a suplementação do feijão cozido com DL-Metionina e da farinha de trigo com DL-Lisina, determina um aumento significativo no ganho de pesos dos animais.

Este fato vem, mais uma vez, comprovar, que a suplementação destas proteínas com seus aminoácidos limitantes, promove um aumento do valor biológico das mesmas (<sup>24</sup>) (<sup>25</sup>), que pode ser melhor visualizado através dos resultados obtidos quanto ao coeficiente de eficácia proteica (CEP), apresentados na mesma tabela.

Podemos observar também na Tabela 1, que os animais que receberam ração carente de um aminoácido essencial, comportaram-se, quanto ao consumo de água e de ração, diferentemente dos animais que receberam proteína de alto valor biológico.

ZIPKIN e col. (<sup>9</sup>) já firmaram que o aumento do teor de proteína na ração, promove um aumento de consumo de água pelo animal. No caso de nossa experiência, o teor de proteína da ração

**TABELA 1**  
**CRESCIMENTO DOS ANIMAIS, CONSUMO DE AGUA E RACAO E COEFICIENTE**  
**DE EFICACIA PROTEICA (CEP)**

Grupo	Tratamento	P E S O			C O N S U M O		C.E.P.
		Inicial (g)	Final (g)	Ganho (g)	Agua (ml)	Ração (g)	
I	Caseína	34,1	129,1	95,0	276	299,7	3,03
		± 0,60	± 6,56	± 6,97	± 23,53	± 16,91	± 0,09
II	Feijao	36,3	72,7	36,1	197,3	241,7	1,50
		± 0,33	± 2,12	± 1,90	± 8,80	± 13,52	± 0,40
III	Feijao + Metionina	27,3	123,5	95,8	408,7	322,1	2,97
		± 1,00	± 2,53	± 2,97	± 21,53	± 7,93	± 0,10
IV	Farinha de Trigo	48,6	82,4	33,4	130,7	250,4	1,33
		± 0,53	± 2,40	± 1,87	± 10,25	± 14,86	± 0,05
V	Farinha de Trigo + Lisina	44,7	137,3	92,6	349,3	360,4	2,56
		± 1,00	± 7,95	± 6,80	± 32,61	± 22,53	± 0,03

Coeficiente de Eficácia Proteica - C.E.P. = Calculado computando-se o total de proteína ingerida e relacionando-o com o ganho de peso corporal dos animais.

permaneceu constante, tendo havido melhoria qualitativa da proteína, condição que sugere ser o bom equilíbrio em aminoácido, além do tipo de alimento administrado aos animais, fatores favoráveis ao maior consumo de água.

Observando a Tabela 2, podemos verificar que o peso total das tíbias e mandíbulas, variou para mais, quando houve maior consumo de ração, o que ocorreu com os animais que receberam dieta com proteína balanceada. Porém, podemos observar também na mesma tabela, que este fato não repercutiu quer no teor de minerais totais dos ossos, ou mesmo no teor de cálcio e fósforo.

Para o caso do flúor podemos observar que surgiram diferenças significativas na concentração do halogênio, um vez que os animais que receberam uma ração com proteína deficiente, apresentaram uma concentração de flúor inferior em mais de 50% daqueles que receberam a mesma ração balanceada.

Este fato tem a sua explicação na ingestão de flúor, pois como já foi exposto, os animais que ingeriram ração balanceada apresentaram um maior consumo de água fluoretada e como a fixação de flúor é proporcional à ingestão, estas diferenças foram óbvias.

Para uma real avaliação do aproveitamento biológico do flúor ingerido, devemos relacionar este último dado com o total fixado no tecido mineralizado. Os resultados expostos na tabela 2 demonstraram que os animais que receberam a proteína não balanceada, apresentaram resultados mais baixos que aqueles que a receberam balanceada. Por outro lado, também podemos verificar que não houve diferença significativa entre o grupo 1 (caseína) e os de proteína suplementada, tanto no que diz respeito à tíbia, como à mandíbula.

ZIPKIN e col. (26) verificaram que animais submetidos a uma dieta raquitogênica, apresentaram concentração óssea de flúor significativamente maior que a dos animais controle, sendo menor o teor de cinza. Os autores atribuíram o fenômeno à alteração do processo de mineralização.

Por sua vez ZUCÁS (27), por ter encontrado, em animais hipofisectomizados, fixação de flúor superior à dos animais com hipófise, sugeriu ser a diferença devida a uma alteração na velocidade de mineralização dos tecidos duros.

Nossos resultados não sugerem a confirmação da hipótese de ZIPKIN (26), porém são semelhantes àqueles obtidos em condições diferentes por ZUCÁS (27). Isto nos faz pensar na necessidade de estudos mais amplos, relativos à correlação da existência de proteínas de elevado padrão biológico na dieta e a mineralização em geral, da qual a fixação do flúor é caso particular.

Será necessário realizar novos e mais extensos trabalhos experimentais para testar a validade da hipótese sugerida por este trabalho, através de seus resultados, isto é, que a fixação do flúor é



comandada, até certo ponto, pelo metabolismo proteico.

Ela assume invulgar importância para a Saúde Pública pois, se for provado que a fixação do flúor nas estruturas dentais, como nas ósseas, está na dependência de fatores orgânicos ainda não bem estudados, novas perspectivas deverão ser encaradas, no tocante a taxas ótimas para a administração do flúor. Se a fixação do flúor nos ossos é, de algum modo, função do tipo de proteína ingerida e, mais exatamente, se fica na dependência dos fatores limitantes das várias proteínas alimentares, o tipo de alimentação de um grupo populacional considerado passará a ser coordenada importante na determinação quantitativa do flúor a ser oferecido ao grupo, para a obtenção de efeitos favoráveis na proteção dos dentes contra a cárie. Deverão ser revistas as taxas consideradas ótimas, que oferecidas indiscriminadamente a grupos populacionais com diferentes hábitos alimentares, apresentam, hoje, larga faixa de variação na redução da cárie.

### CONCLUSOES

Pelo exposto anteriormente, nas condições experimentais por nós estabelecidas, parece-nos lícito afirmar que:

1o.- A fixação do flúor em mandíbula e tíbia é significativamente aumentada quando na ração, uma proteína deficiente é suplementada adequadamente com seu aminoácido limitante.

2o.- A conclusão anterior é válida para as proteínas existentes no feijão e na farinha de trigo que, quando suplementadas com seus fatores limitantes, alcançam nível de eficácia para o fim de fixação do flúor, equivalente ao da caseína.

3o.- Os efeitos referidos se fazem sentir mais evidentemente na tíbia do que na mandíbula.

### SUMMARY

#### The influence of protein quality in the fluoride bone fixation

45 rats Wistar, 30 days old, were divided into five groups, receiving different diets: casein, bean and wheat flour. The last two diets were supplemented or not by D-L Methionine and D-L Lysine, respectively. Diets and fluoridated water (25 ppm) were given "ad libitum" for 28 days. After this period of experience, the animals were sacrificed and the mandible and the tibias removed for analyses of fluoride, calcium, phosphorus and ash.

The A.A. main conclusions are the following: The fixation of fluorides in bones is significantly increased with the supplement of the limitant factor to deficient diets. In this condition, the mandible shows smaller fixation of fluorides than tibias.

The level of calcium, phosphorus and ash shows to be similar in the differentes groups.

This data suggests interaction of the protein quality and the percentual fixation of fluorides, and the necessity of further studies about this problem.

#### BIBLIOGRAFIA

1. International Association for Dental Research. Role of human foodstuffs in caries. *J. dent. Res.*, **49** (Supl.): 1191-342, 1970.
2. Reinartz, W. - Caries and milk. *Ost. Z. Stomat.*, **66**: 350-62, 1969, apud *Fluor. Abstr.*, **9**: 78, 1969/71.
3. Sellen, J.E. - Enquete dentaire et nutritionnelle dans l'archipel des Marquises (Polynesie Française). *Rev. franç. Odontostomat.*, **15**: 647-72, 1968.
4. Swedish Nutrition Foundation. Nutrition and caries prevention. Upsala, Almqvist & Wiksells, 1965, 130 p.
5. Sweeney, E.A. - Protein and oral health. In: KRESHOVER, S.J. & McCURE, F.J. - Environmental variables in oral disease. Washington, American Association for the Advancement of Science, 1966. p. 55-71.
6. Hartles, R.L. - Dietary modification as a mean for the control of dental caries. *Roy. Soc. Hlth J.*, **90**: 316-9, 1970.
7. Mayhall, J.T. et alii - Dental caries in eskimos of Wainwright, Alaska, *J. dent. Res.*, **49**: 886, 1970.
8. Winter, G.B. - Sucrose and cariogenesis. *Brit. dent. J.* **124**: 407-11, 1968.
9. Zipkin, I. et alii - The effect of fluoride and dietary protein levels on calculus formation alveolar bone loss, selected salivary constituents and fluoride deposition in the bones and teeth. *J. Periódont.*, **41**: 430-7, 1970.
10. Viegas, A.R. - Aspectos preventivos da cárie dentária. In: CHAVES, M. M. - *Manual de Odontologia sanitária*. Sao Paulo, Faculdade de Higiene e Saúde Pública USP, 1961, v. 3.
11. Bibby, B.G. - Inferences from natural occuring variations in caries prevalence. *J. dent. Res.*, **49** (Supl.): 1194-9, 1970.
12. Nizel, A.E. - Amino acids, protein and dental caries. In: HARRIS, R.S. - Dietary chemicals vs dental caries. *Am. Chem. Soc.*, 1970, p. 23-32 (*Advances in Chemistry Series*, 94).
13. Muhlemann, R.H. - Karies und Proteine. In: *Bibl. "Nutr. et Dieta"*, **5**: 15-28, 1964.
14. Green Meadow Foundation - Ernährung und Zahnkaries, Univ. Zurich, 16-18 oct. 1962. In: *Bibl. "Nutr. et Dieta"*, **5**, 1964. 184 p.
15. Bavetta, L.A. & Bernick, S. - Lysine deficiency and dental structures. *J. Amer. dent. Ass.*, **50**: 427-33, 1955.
16. Bernick, S. & Bavetta, L.A. - Histochemical and eletron microscopy stu-

- dies of dentin in tryptophan deficient rats. *J. dent. Res.*, **36**: 142-9, 1957.
17. Lajolo, F.M. et alii - Importância da cor da ração no consumo da mesma por ratos (*Rattus norvegicus* var. *albinus*). *Rev. Fac. Farm. Bioquim. Sao Paulo*, **7**: 95-103, 1969.
  18. Zucas, S.M. - Frasco para isolamento de flúor. *An. Farm. Quim. Sao Paulo*, **15**: 139, 1964.
  19. Tamburini Jr., R. & Zucas, S.M. - Determinação do flúor em material biológico. *Rev. Fac. Farm. Bioquim. Sao Paulo*, **2**: 135-146, 1964.
  20. Zucas, S.M. & Lajolo, F.M. - Frasco de difusão para o isolamento de microquantidades de flúor. *Rev. Fac. Farm. Bioquim. Sao Paulo*, **6**: 33-44, 1968.
  21. Megregian, S. - Rapid spectrophotometric determination of fluoride with zirconiumeriochrome cyanine R. lake. *Analyt. Chem.*, **266**: 1161-6, 1954.
  22. Ferro, P.V. & Ham, A.B. - A simple spectrophotometric method for the determination of calcium. II - A semimicromethod with reduced precipitation time. *Amer. J. clin. Path.*, **28**: 689-92, 1957.
  23. Fiske, C.H. & Subbarow, Y. - The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.*, **66**: 375-400, 1925.
  24. Lurenço, E.J. et alii - Os feijões. Seu valor nutritivo e substâncias indesejáveis. In: *1o. Simpósio Brasileiro de Feijão*, Campinas, 1971, 49 p.
  25. Tamburini, A.M. - Valor biológico da proteína da farinha de trigo suplementada com concentrados proteicos de pescados. Botucatu, 1972. (Tese).
  26. Zipkin, I. et alii - Deposition of fluoride, calcium and phosphorus in experimental low-phosphorus richets. *J. Nutr.*, **67**: 65-7, 1959.
  27. Zucas, S.M. - Influência da hipófise na fixação do flúor em alguns tecidos mineralizados de ratos. Sao Paulo, 1970. (tese).