

Utilização de frutooligossacarídeo por estreptococos *mutans in vitro*

In vitro utilization of fructooligosaccharide by mutans streptococci

Myrna Maria LINARDI*

Odila Pereira da Silva ROSA**

Marília Afonso Rabelo BUZALAF***

Sérgio Aparecido TORRES***

LINARDI, M. M.; ROSA, O. P. da S.; BUZALAF, M. A. R.; TORRES, S. A. Utilização de frutooligossacarídeo por estreptococos *mutans in vitro*. **Pesqui Odontol Bras**, v. 15, n. 1, p. 12-17, jan./mar. 2001.

Neosugar é o nome comercial de um frutooligossacarídeo (FOS), cuja utilização por bactérias bucais pouco se conhece. Neste trabalho, avaliou-se o efeito deste produto sobre o crescimento, fermentação e produção de placa *in vitro* por *S. mutans* sorotipos c, e e f, *S. sobrinus*, sorotipo d, *S. downei*, sorotipo h, *S. cricetus*, sorotipo a e *S. rattus*, sorotipo b. A avaliação do crescimento foi feita em caldos "Brain Heart Infusion" (BHI) adicionados ou não de sacarose e FOS, e em caldos tamponados contendo glicose ou FOS como fonte de carbono, com inóculos padronizados em espectrofotômetro e leituras das densidades ópticas em 24 horas. Nos mesmos meios, foi feita a leitura do pH, após 24 horas. A placa produzida *in vitro* em caldos BHI, acrescidos de 5% de sacarose ou FOS, foi avaliada por meio de pesagem e quantificação de carboidratos e proteínas. Foi comprovada a possível cariogenicidade do Neosugar, que permitiu o mesmo crescimento e intensidade de fermentação que a sacarose em caldo BHI, de todos os microrganismos e serviu de base para produção de placa *in vitro* por alguns deles. A quantidade de placa formada e o seu teor de proteínas e carboidratos foram menores que os evidenciados com a sacarose, embora apenas para os últimos tenha sido encontrada diferença estatisticamente significativa.

UNITERMOS: *Streptococcus mutans*; Cariogênicos.

INTRODUÇÃO

Os frutooligossacarídeos (FOS) são compostos que ocorrem na natureza e têm sido detectados em várias plantas, como trigo, centeio, cebola, alho, banana, alface, chicória. O Neosugar é uma mistura de frutooligossacarídeos desenvolvido originalmente como adoçante de baixa caloria, não-nutritivo, no Japão. Trata-se de uma mistura de $1^F-(1-\beta\text{-frutofuranosil})_{n-1}\text{-sacarose}$ oligômeros, nos quais n pode variar de 2 a 4. Basicamente, são moléculas de sacarose (dissacarídeo glicose-frutose) aos quais foram acrescentadas 1, 2 ou 3 unidades adicionais de frutose por ligação glicosídica $\beta(2\rightarrow1)$ às unidades de frutose da sacarose. Esses componentes são abreviados como GF₂ (1-kestose), GF₃ (nistose) e GF₄ (1- β -frutofuranosilnistose)⁶. Os FOS são produzidos em escala comercial a partir da sacarose, usando uma frutotransferase fúngica

(β -frutofuronidase), produzida naturalmente por *Aspergillus niger*⁸, ou então a partir da inulina através de hidrólise parcial por endoglicosidases¹⁵, possuindo cerca de metade do poder adoçante da sacarose. Esses compostos apresentam propriedades físicas que os tornam aplicáveis em produtos alimentícios, como ausência de cor e de odor, estabilidade em pH neutro e em temperaturas superiores a 140°C. Como não são digeridos, passam através do intestino delgado sem serem absorvidos e atingem o intestino grosso, onde são utilizados seletivamente por bifidobactérias intestinais. Essas duas características são a chave para sua utilização tendo em vista a saúde humana: alívio da constipação, melhora da composição de lipídeos na corrente sanguínea e supressão da produção de substâncias putrefativas no intestino⁹.

Apesar de haver na literatura vários trabalhos sobre o metabolismo de FOS por bactérias intesti-

* Aluna de graduação e bolsista do PIBIC-CNPq; ** Professora Associada e *** Professores Doutores do Departamento de Ciências Biológicas – Faculdade de Odontologia de Bauru da USP.

nais, há apenas a pesquisa de HARTEMINK *et al.*⁷ (1995) que mostra sua utilização por estreptococos bucais, inclusive *Streptococcus mutans*. Em vista da possibilidade de maior emprego desses compostos, o pouco conhecimento sobre seu potencial cariogênico e a heterogeneidade dos estreptococos do grupo *mutans*, procurou-se observar o efeito do Neosugar sobre o crescimento, fermentação e produção de placa *in vitro*, de diferentes representantes desse grupo. Foram utilizadas cepas de referência de *S. mutans*, sorotipos c (GS-5), e (B-2) e f (OMZ-175); *S. sobrinus*, sorotipo d (SL-1); *S. downei*, sorotipo h (MF-25); *S. cricetus*, sorotipo a (HS-1) e *S. rattus*, sorotipo b (FA-1). As cepas HS-1, FA-1 e MF-25 foram gentilmente cedidas pelo Prof. Fusao Ota, da Universidade de Tokushima, Japão; as cepas B-2 e OMZ-175, pelo Prof. Jean-P. Klein, da Faculté de Chirurgie Dentaire, Strasbourg, França e as demais cepas pertencem à coleção da Disciplina de Microbiologia.

MÉTODOS

Avaliação do crescimento e teste de fermentação

Como inóculo, foram utilizados 50 µl de cultivo de 18 horas dos estreptococos do grupo *mutans* em 5 ml de caldo "Brain Heart Infusion" (BHI, DIFCO), padronizado segundo o padrão 0,5 de McFarland, em espectrofotômetro (PHARMACIA), em 540 nm. Cada cepa foi cultivada em duplicata em cinco meios: caldo BHI, um meio rico, que foi o controle positivo; o mesmo caldo acrescido de 5% de sacarose (BHI-S) ou frutooligossacarídeo (BHI-FOS); um meio tamponado pobre, contendo glicose (TAM-GLICOSE) ou frutooligossacarídeo (TAM-FOS) como fonte de carbono. Todos esses meios foram distribuídos em porções de 4 ml em tubos com tampa de rosca de 13 x 100 mm, autoclavados a 121°C, por 15 minutos e submetidos ao teste de esterilidade por 24 horas. O caldo TAM foi constituído por peptona (10 g); NaCl (5 g); fosfato de sódio dibásico (3,5 g); fosfato de potássio monobásico (1,5 g); glicose (15 g); extrato de levedura (5 g) e água destilada (q.s.p. 1.000 ml). O frutooligossacarídeo utilizado nos diferentes meios foi o Neosugar, graciousamente fornecido por Meiji Seika - Japão.

Após receberem o inóculo, os tubos foram incubados a 37°C, em aerobiose, por 24 horas, fazendo-se a leitura da turvação em espectrofotômetro Ultrospec 1.000 (PHARMACIA) em 540 nm, tendo como controle negativo, para cada meio, um caldo correspondente, sem semear. Logo a seguir, proce-

deu-se à leitura do pH em pHmetro (ANALION), para avaliar a fermentação dos açúcares.

Produção da placa *in vitro*¹⁶

Para este teste, foi utilizado o caldo BHI (DIFCO), ao qual foram adicionados 5% de sacarose ou FOS. Esse meio foi distribuído em volumes de 4 ml em tubos com tampa de rosca de 13 x 100 mm, contendo bengalas de vidro feitas com tubo capilar com 1,5 mm de diâmetro externo, esterilizado a 121°C por 15 minutos e submetido ao teste de esterilidade por 24 horas. Os testes foram feitos em triplicata para cada meio, com incubação a 37°C por 24 horas, com transferências diárias para novos caldos, por um período de 5 dias. Como inóculo, foram utilizados 50 µl de cultura padronizada conforme descrito para o teste anterior. Para avaliação do depósito, cada bengala de vidro foi mergulhada em tubo de ensaio de 15 x 125 mm contendo 8 ml de água destilada esterilizada, para diluição do meio de cultura e remoção do material frouxamente aderido. Em seguida, as bengalas foram transferidas para tubos de ensaio secos e esterilizados para escorrer a água e a placa produzida sobre cada bengala foi recolhida sobre folha de alumínio previamente pesada, utilizando uma espátula, e pesada em balança de precisão (SCIENTECH - precisão 0,0001). Posteriormente, essa placa foi transferida para um frasco tipo penicilina, contendo NaOH a 50% e congelada até o momento da quantificação.

Para a quantificação dos carboidratos e proteínas, as suspensões foram descongeladas, colocadas em tubos de ensaio e submetidas à homogeneização manual, com bastão de teflon. A dosagem de carboidratos foi realizada nas amostras em triplicata, de acordo com o método fenol-ácido sulfúrico de DUBOIS *et al.*⁴ (1956), sendo lida a absorbância em 490 nm em espectrofotômetro Ultrospec 2.000 (PHARMACIA). A dosagem de proteínas foi realizada em triplicata seguindo o método de LOWRY *et al.*¹² (1951), com leituras de absorbância em 660 nm em espectrofotômetro Ultrospec 2.000 (PHARMACIA). Para obtenção das curvas padrão de referência, foram utilizadas a D-manose e a albumina de soro bovino, respectivamente.

Análise estatística

O pequeno tamanho da amostra e a grande variabilidade dos resultados levaram à realização de testes não-paramétricos. Para a comparação entre dois grupos, foi utilizado o teste de Wilcoxon e, entre três grupos, a análise de variância de Fried-

man. Havendo diferença estatisticamente significativa nesta última, foi empregado o teste de Dunn para comparações múltiplas. Em todos os casos, foi adotado o nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Os resultados relativos ao crescimento fornecidos pela leitura da densidade óptica dos caldos, da fermentação, pela leitura do pH, quantidade de placa produzida *in vitro* e quantidade de carboidratos e proteínas dessa placa são mostrados nas Tabelas 1 a 4.

A análise estatística demonstrou diferença estatisticamente significativa no pH entre os três caldos BHI, sendo os valores do caldo BHI maiores que os do BHI-sacarose e BHI-FOS ($p = 0,002$), os quais não diferiram entre si. A análise também revelou diferença estatisticamente significativa na quantidade de carboidrato da placa produzida *in vitro*, maior no BHI-sacarose que no BHI-FOS ($p = 0,043$). Todas as outras comparações não mostraram diferença estatisticamente significativa.

DISCUSSÃO

Devido às suas propriedades físico-químicas e poder adoçante, os FOS são consumidos principalmente em massas de tortas, confeitos e laticínios⁶. MOLIS *et al.*¹⁴ (1996) avaliaram o destino de FOS no trato gastrointestinal em 6 voluntários por 11 dias e observaram que a maior parte dele não foi absorvida no intestino delgado e nenhum foi excretado nas fezes, indicando que a porção que atinge o cólon foi completamente fermentada pela

TABELA 1 - Leitura (densidade óptica) do crescimento das várias cepas bacterianas, nos diferentes caldos, após 24 horas de cultivo.

Cepas (sorotipos)	BHI	BHI-sacarose	BHI-FOS	TAM-glicose	TAM-FOS
<i>S. mutans</i> (c)	1,135	0,447	1,209	0,572	0,939
<i>S. mutans</i> (e)	1,237	0,742	1,332	0,487	0,931
<i>S. mutans</i> (f)	1,412	0,643	0,642	0,570	1,193
<i>S. downei</i> (d)	1,317	0,299	1,209	0,024	0,030
<i>S. sobrinus</i> (h)	1,387	1,953	1,952	1,209	1,197
<i>S. cricetus</i> (a)	1,315	1,448	1,933	0,001	0,030
<i>S. rattus</i> (b)	1,341	1,489	1,518	0,061	0,043
Média	1,306	1,003	1,399	0,418	0,623
d.p.	0,094	0,624	0,457	0,435	0,561

$X^2 = 2,00$; $p = 0,368$. $T = 5,00$; $p = 0,128$.

microbiota local. Concluíram que os FOS são apenas ligeiramente digeridos no intestino delgado e depois fermentados no cólon, resultando em reduzida produção de energia. Particularmente, o Neosugar parece alterar de forma benéfica a microbiota fecal, diminuindo a atividade de algumas enzimas redutoras².

Todos esses fatos positivos chamam a atenção, uma vez que, no Brasil, também se desenvolveu FOS a partir da sacarose, utilizando-se enzima de cepa de *Aspergillus niger* isolado no país¹, fato que pode favorecer uma generalização do seu uso e desperta interesse quanto à cariogenicidade desse tipo de produto, mesmo podendo haver diferenças entre FOS de diferentes procedências.

A literatura sobre a utilização de FOS por microrganismos orais limita-se ao estudo de HARTEMINK *et al.*⁷ (1995), os quais verificaram que a fermentação de FOS por estreptococos orais é muito comum, demonstrando que cepas-estoque de *S. oralis*, *S. mitis*, *S. sanguis*, *S. gordonii* e *S. mutans* (2 cepas) produziram ácido lático e ácido acético a partir dos oligossacarídeos. Demonstraram também, em teste de acidificação, que a formação de ácido era muito rápida, sendo atingido o pH crítico dentro de 15 minutos, tanto para a glicose como para o FOS. Os mesmos autores comentam a ampla difusão de estreptococos fermentadores de FOS na população, pois a saliva de quarenta voluntários holandeses, que nunca haviam consumi-

TABELA 2 - Resultados das leituras do pH das cepas nos diferentes caldos.

Cepas (sorotipos)	BHI	BHI-sacarose	BHI-FOS	TAM-glicose	TAM-FOS
<i>S. mutans</i> (c)	5,4	5,0	4,2	5,3	4,7
<i>S. mutans</i> (e)	5,5	4,2	4,1	4,3	4,3
<i>S. mutans</i> (f)	5,3	4,3	4,1	4,4	4,3
<i>S. sobrinus</i> (d)	5,4	4,6	4,4	6,9	6,9
<i>S. downei</i> (h)	5,4	4,2	4,2	4,4	4,5
<i>S. cricetus</i> (a)	5,8	4,5	4,2	6,9	7,0
<i>S. rattus</i> (b)	5,6	4,6	4,7	6,9	6,9
Média	5,49 ^a	4,49 ^b	4,27 ^b	5,59	5,51
d.p.	0,17	0,29	0,21	1,27	1,33
Controle negativo	7,4	7,4	7,4	7,0	7,0

$X^2 = 12,07$; $p = 0,002$. $T = 4,00$; $p = 0,715$. Grupos com a mesma letra não apresentam diferença estatisticamente significativa.

do FOS comercial, apresentava cepas capazes de degradá-lo. O *Streptococcus mutans*, um dos estreptococos por eles testados, é a espécie mais prevalente dos estreptococos *mutans* no homem, tendo sua virulência diretamente associada à disponibilidade de sacarose, que lhe permite a síntese de polissacarídeos extracelulares. Conseqüentemente, o emprego de substitutos da sacarose que não possam ser utilizados da mesma maneira que esse açúcar constitui-se em método eficiente de prevenção da doença.

Ficou patente naquele estudo⁷ que as cepas de *Streptococcus mutans* parecem variar no modelo de degradação dos constituintes dos FOS. A cepa n° 36 rapidamente degradou a nistose, enquanto a cepa n° 44 degradou quase todos substratos, exceto a nistose. IKEDA *et al.*¹⁰ (1990) mostraram que a nistose era lentamente degradada ou fermentada por 5 cepas de *S. mutans*, entre as quais a NCTC 10449, enquanto ZIESENITZ; SIEBERT¹⁸ (1987), demonstraram que a nistose era rapidamente degradada pela mesma cepa NCTC 10449. Essas diferenças poderiam ser explicadas pelo fato de a produção de frutanas depender do pré-cultivo e das condições do meio e também porque as frutanas produzidas por diferentes cepas apresentam diferentes preferências por frutanos¹⁷.

A possível cariogenicidade do Neosugar, anteriormente prevista⁷, foi comprovada *in vitro* neste estudo com diferentes representantes do grupo *mutans*, os quais apresentaram crescimento semelhante em BHI acrescido de FOS ou sacarose, fermentaram na mesma intensidade os dois substratos e utilizaram semelhantemente FOS e glicose, como fonte de carbono (Tabelas 1 e 2).

TABELA 3 - Peso médio (mg) da placa formada *in vitro* pelas diferentes cepas em dois caldos.

Cepas (sorotipo)	BHI-sacarose	BHI-FOS
<i>S. mutans</i> (c)	6,0	0,7
<i>S. mutans</i> (e)	16,0	7,0
<i>S. mutans</i> (f)	32,0	6,0
<i>S. sobrinus</i> (d)	5,0	5,0
<i>S. downei</i> (h)	0	D*
<i>S. cricetus</i> (a)	57,0	33,0
<i>S. rattus</i> (b)	D*	D*
Média	16,57	7,39
d.p.	21,09	11,67

T = 0,00; p = 0,068. D* = desprezível.

O FOS também permitiu a produção de placa, *in vitro*, em quantidade menor, porém não estatisticamente diferente daquela obtida com a sacarose (Tabela 3). Esse resultado confirma a observação de HARTEMINK *et al.*⁷ (1995), cuja cepa de *S. mutans* produziu placa de 13 mg após 3 dias com o Neosugar, contra 16 mg frente à sacarose, enquanto no presente trabalho, as quantidades produzidas no BHI-FOS pelos três sorotipos de *S. mutans* foram de 0,7 (c), 7,0 (e) e 6,0 (f), e no BHI-sacarose, de 6,0, 16,0 e 32,0, respectivamente. Posto que também não tenha sido observada diferença estatisticamente significativa para a quantidade de proteína, o teor significativamente menor de carboidratos na placa confirma a tendência notada nas outras quantificações (Tabelas 3 e 4).

A variedade dos resultados com cepas representantes das várias espécies e sorotipos mostra a importância de não se avaliar uma única representante do grupo *mutans* nesse tipo de pesquisa. Outros trabalhos já evidenciaram diferenças significativas no potencial cariogênico de cepas provenientes de pessoas com diferentes experiências de cáries tanto *in vitro*¹³ como *in vivo*¹¹. Por outro lado, essa mesma variedade aponta para a influência da composição do meio de cultura sobre esses microrganismos. Um meio que permitiu o crescimento semelhante de todas as cepas, com mínima variação, o BHI (média ± dp = 1,306 ± 0,094), quando acrescido de FOS e principalmente de sacarose, influenciou sobremaneira o crescimento dos microrganismos. Isso não se traduziu, porém, em menor

TABELA 4 - Quantidades médias (µg/ml) de carboidratos e proteínas da placa produzida *in vitro* pelas diferentes cepas em dois caldos.

Cepas (sorotipo)	Carboidratos		Proteínas	
	BHI-S	BHI-FOS	BHI-S	BHI-FOS
<i>S. mutans</i> (c)	588	258	277	75
<i>S. mutans</i> (e)	1.881	692	254	238
<i>S. mutans</i> (f)	4.096	1.156	386	131
<i>S. sobrinus</i> (d)	531	418	216	231
<i>S. downei</i> (h)	–	–	–	–
<i>S. cricetus</i> (a)	5.119	1.596	732	304
<i>S. rattus</i> (b)	–	–	–	–
Média*	2.443,0	823,8	373,0	195,8
d.p.	2.080,0	549,9	210,4	91,5

T = 0,00; p = 0,043. T = 1,00; p = 0,079.

* Não considerando as cepas negativas.

produção de placa com a sacarose no teste específico.

Considerando-se que a espécie mais prevalente na população é a de *S. mutans*, torna-se significativo o fato de todos os sorotipos do mesmo apresentarem resultados positivos em todos os testes realizados com o FOS, com eficiência aparentemente maior que a de *S. sobrinus*. Em pesquisa de KÖHLER; KRASSE¹¹ (1990), em hamsters, os autores também confirmaram que *S. mutans* foram mais cariogênicos que *S. sobrinus*, diferentemente do observado por EMILSON *et al.*⁵ (1987), em hamsters, e por DE SOET *et al.*³ (1991), em ratos.

CONCLUSÃO

Os resultados aqui relatados demonstram a necessidade de se avaliar quaisquer FOS que surjam no comércio quanto ao seu potencial cariogênico, *in vitro*, sob diferentes condições de cultivo e *in vivo*.

AGRADECIMENTOS

Aos laboratórios Meiji Seika, Japão, pela gentileza do Neosugar[®]. Ao Prof. Dr. José Roberto Pereira Lauris, pela análise estatística e aos senhores André Luis da Silva e José Osni Vitorato, pelo auxílio técnico.

LINARDI, M. M.; ROSA, O. P. da S.; BUZALAF, M. A. R.; TORRES, S. A. *In vitro* utilization of fructooligosaccharide by *mutans* streptococci. **Pesqui Odontol Bras**, v. 15, n. 1, p. 12-17, jan./mar. 2001.

Neosugar is the trade name of a fructooligosaccharide (FOS) whose utilization by oral bacteria is not well known yet. The aim of the present study was to evaluate *in vitro* the effect of this product on the growth, fermentation and production of plaque by *mutans* streptococci: *S. mutans*, serotypes c, e and f, *S. sobrinus*, serotype d, *S. downei*, serotype h, *S. cricetus*, serotype a and *S. rattus*, serotype b. The evaluation of growth was carried out in Brain Heart Infusion (BHI) broths containing or not sucrose and FOS and in buffered broths having glucose or FOS as carbon sources, through optical density reading in spectrophotometer after 24 hours of incubation at 37°C. Thereafter the reading of pH was made in the same media. The plaque produced on glass sticks in BHI broths containing 5% sucrose or FOS was weighed and carbohydrates and proteins were assayed. The possible cariogenicity of Neosugar was confirmed, since it sustained the same growth and intensity of fermentation of sucrose in BHI broth for all streptococci and permitted *in vitro* production of plaque by some of them. The amount of plaque as well as its content of proteins and carbohydrates were smaller than those produced with sucrose, although the difference was statistically significant only for carbohydrates.

UNITERMS: *Streptococcus mutans*; Cariogenicity agents.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDRADE, M. Politicamente correto. **Rev Ass Bras Odont**, v. 5, n. 3, p. 147, jun./jul. 1997.
2. BUDDINGTON, R. K.; WILLIAMS, C. H.; CHEN, S. C. *et al.* Dietary supplement of neosugar alters the fecal flora and decreases activities of some reductive enzymes in human subjects. **Am J Clin Nutr**, v. 63, n. 5, p. 709-716, May 1996.
3. DE SOET, J. J.; VAN LOVEREN, C.; LAMMENS, A. J. *et al.* Differences in cariogenicity between fresh isolates of *Streptococcus sobrinus* and *Streptococcus mutans*. **Caries Res**, v. 25, n. 2, p. 116-122, Mar./Apr. 1991.
4. DUBOIS, M. *et al.* Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal Chem**, v. 2, p. 350-356, 1956.
5. EMILSON, C. G.; CARLSSON, P.; BRATTHALL, D. Strains of *mutans* streptococci isolated in a population with extremely low caries prevalence are cariogenic in the hamster model. **Oral Microbiol Immunol**, v. 2, n. 4, p. 183-186, Dec. 1987.
6. FISHBEIN, L.; KAPLAN, M.; GOUGH, M. Fructooligosaccharides: a review. **Vet Hum Toxicol**, v. 30, n. 2, p. 104-107, Apr. 1988.
7. HARTEMINK, R.; QUATAERT, M. C. J.; VAN LAERE, M. J. R. *et al.* Degradation and fermentation of fructo-oligosaccharides by oral streptococci. **J Appl Bacteriol**, v. 79, n. 5, p. 551-557, Nov. 1995.
8. HIDAKA, H.; EIDA, T. The production of oligosaccharides utilizing sugar transfer action. **Bio Industry**, v. 1, p. 5-13, 1984.
9. HIDAKA, H.; HIRAYAMA, M. Useful characteristics and commercial applications of fructo-oligosaccharides. **Biochem Soc Trans**, v. 19, n. 3, p. 561-565, 1991.
10. IKEDA, T.; KURITA, T.; HIDAKA, H. *et al.* Low-cariogenicity of the tetrasaccharide nystose. **Gen Pharmacol**, v. 21, n. 2, p. 175-179, 1990.
11. KÖHLER, B.; KRASSE, B. Human strains of *mutans* streptococci show different cariogenic potential in the hamster model. **Oral Microbiol Immunol**, v. 5, n. 4, p. 177-180, Aug. 1990.
12. LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L. *et al.* Protein measurement with the Folin-phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193, p. 265-275, 1951.
13. MACPHERSON, L. M. D.; MACFARLANE, T. W.; GEDDES, D. A. M. *et al.* Assessment of the cariogenic potential of *Streptococcus mutans* strains and its relationship to *in vivo* caries experience. **Oral Microbiol Immunol**, v. 7, n. 3, p. 142-147, Jun. 1992.
14. MOLIS, C.; FLOURIE, B.; OUARNE, F. *et al.* Digestion, excretion and energy value of fructooligosaccharides in healthy humans. **Am J Clin Nutr**, v. 64, n. 3, p. 324-328, Sept. 1996.
15. NORMAN, B. E.; HOJER-PEDERSEN, P. The production of fructooligosaccharides from inulin or sucrose using

- inulinase or fructosyltransferase from *Aspergillus ficum*. **Denpun Kagaku**, v. 36, p. 103-111, 1989.
16. OLIVEIRA, C. M.; ARAUJO, W. C. Formação de placa *in vitro* em culturas puras de *Streptococcus* isolados de pacientes. **Rev Bras Odontol**, v. 25, n. 149, p. 270-276, jan./fev. 1968.
17. WALKER, G. J.; HARE, M. D.; MORREY-JONES, J. G. Activity of fructanase in batch cultures of oral streptococci. **Carbohydr Res**, v. 113, n. 1, p. 101-112, Feb. 1983.
18. ZIESENITZ, S. C.; SIEBERT, G. *In vitro* assessment of nystose as a sugar substitute. **J Nutr**, v. 117, n. 5, p. 846-851, May 1987.

Recebido para publicação em 15/06/00
Enviado para reformulação em 25/11/00
Aceito para publicação em 15/12/00

Estética: Recursos Atuais da Dentística para o Clínico

Ministradores: Prof. Dr. José Fortunato F. Santos e equipe

Teórico-clínico-demonstrativo

Carga horária: 96 horas

Período de realização: 14/03 a 27/06/2001

Horário: 4^{as} feiras das 17 h às 22h30

Valor: R\$ 50,00 de inscrição e 4 mensalidades de R\$ 300,00

Odontopediatria na Primeira Infância – Orientação à Gestante, Prevenção e Tratamento de Bebês de Zero a 5 Anos

Ministradoras: Profa. Dra. Maria Salete Nahás Pires Corrêa, Profa. Flavia Ribeiro de Carvalho Fernandes, Profa. Luciana Fazzi e Profa. Mariângela Schalka

Teórico-clínico

Módulo I

Carga horária: 90 horas/aula (teórico-prático)

Período de realização: 14/03 a 11/07/2001

Horário: 4^{as} feiras das 14 h às 18 h e eventualmente das 18 h às 20 h
Valor: R\$ 50,00 de inscrição e 4 mensalidades de R\$ 300,00

Módulo II

Carga horária: 90 horas/aula (prático – com complementação teórica)

Período de realização: 01/08 a 05/12/2001

Horário: 4^{as} feiras das 14 h às 18 h e eventualmente das 18 h às 20 h

Valor: R\$ 50,00 de inscrição e 4 mensalidades de R\$ 300,00

Módulo III – Aperfeiçoamento clínico

Requisitos: Módulos I e II

Carga horária: 90 horas/aula

Período de realização: 14/03 a 11/07/2001

Horário: 4^{as} feiras das 14 h às 18 h
Valor: R\$ 50,00 de inscrição e 4 mensalidades de R\$ 300,00

Workshop – Utilização Clínica do Laser

Ministradores: Prof. Dr. Carlos de Paula Eduardo e equipe

Carga horária: 20 horas/aula

Período de realização: 15, 16 e 17/03/2001; 07, 08 e 09/06/2001; 20, 21 e 22/09/2001; e 22, 23 e 24/11/2001

Horário: 5^a e 6^a feiras das 8 h às 18 h horas e sábado das 8 h às 12 h

Valor: 1 mensalidade de R\$ 450,00

Obs.: O aluno poderá escolher o período que mais lhe convier.

Dor Orofacial – Soluções para o Clínico Geral

Ministrador: Prof. Dr. Marcelo Bolzan

Teórico-clínico

Carga-horária: 64 horas/aula

Período de realização: 16/03 a 29/06/2001

Horário: 6^{as} feiras das 14 h às 18 h

Valor: R\$ 50,00 de inscrição e 4 mensalidades de R\$ 300,00

Endodontia

Coordenação: Prof. Assoc. Antonio Carlos Bombana e Prof. Dr. Celso Luiz Caldeira

Assistência: Prof. Weber Bueno de Andrade e Prof. Oscar Faciola Pessoa

Carga horária: 64 horas (80% clínico)

Período de realização: 16/03 a 29/06/2001

Horário: 6^{as} feiras das 8 h às 12 h

Valor: R\$ 50,00 de inscrição e 4 mensalidades de R\$ 300,00

Ortodontia – Pequenos Movimentos Ortodônticos para o Clínico Geral

Ministrador: Prof. Dr. Jorge Abrão

Teórico-laboratorial

Carga horária: 64 horas

Período de realização: 16/03 a 29/06/2001

Horário: 6^{as} feiras das 19 h às 23 h

Valor: R\$ 50,00 de inscrição e 4 mensalidades de R\$ 350,00

Continua na página 63.