

AVALIAÇÃO DA ADERÊNCIA *IN VITRO* DE *Streptococcus mutans* EM SELANTES OCLUSAIS

**Milena Cristina Mineiro Gonçalves¹, Luciane Dias de Oliveira²,
Carla Zanini Kantorski², Antonio Olavo Cardoso Jorge², Marcos Augusto do Rego³**

¹UNIVAP, Especialista em Odontopediatria

²Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP

²UNIVAP e UNITAU, Curso de Odontologia. Rua José Pereira dos Santos, 233 – URBANOVA – São José dos Campos, SP. CEP 12 244 484 marcosreg@uol.com.br

Resumo- O objetivo deste trabalho foi analisar a aderência, *in vitro*, de *Streptococcus mutans* a um selante com carga e flúor, um selante sem carga e flúor e um adesivo, comparando-se com esmalte humano. Foram confeccionados espécimes padronizados (discos de 5 mm diâmetro e 2,5 mm espessura) dos materiais e de esmalte humano, os quais foram imersos em cultura de *S. mutans* (ATCC 35688) em caldo sacaroso (37°C/ 24 h / 5% CO₂). A seguir, os espécimes foram inseridos em tubos contendo soro fisiológico esterilizado e após agitação, a quantidade de *S. mutans* aderido foi calculado, pela obtenção de unidades formadoras de colônias por mililitro (log₋₁₀UFC/ml). Os resultados demonstraram menor aderência de *S. mutans* (5,44± 0,365 log₋₁₀ UFC/ml) para o selante com carga e flúor seguido pelo adesivo (5,47±0,274), pelo selante sem carga flúor (5,68±0,272) e pelo esmalte (6,53±0,172). Todos os materiais demonstraram menor aderência de *S. mutans*, com significância estatística, em relação ao esmalte humano. Pôde-se concluir que a aderência de *S. mutans* foi similar nos diferentes materiais avaliados (selante com flúor e com carga, selante sem flúor e sem carga e adesivo), não havendo diferença estatística significativa entre eles.

Palavras-chave: Selantes oclusais. *Streptococcus mutans*. Aderência bacteriana.

Área de Conhecimento: Odontologia

Introdução

A cárie dentária constitui, ainda nos dias de hoje, uma doença que desafia a odontologia no nosso país. Por ser um problema que atinge quase que a totalidade da população torna-se necessária à implementação de métodos que venham prevenir ou controlar essa doença (JORGE, 2007).

A utilização de fluoretos, em variadas formas, associadas a outras medidas como a orientação da população quanto ao consumo de carboidratos e quanto à importância da escovação, pode contribuir positivamente para o declínio da doença cárie. Outro aspecto importante é que as superfícies oclusais dos dentes são oito vezes mais susceptíveis à cárie que as superfícies lisas.

Essa alta frequência deve-se à configuração destas áreas anatômicas (cicatriculas e fissuras), que facilitam a retenção de resíduos alimentares e microrganismos (HERZBERG, 2000). Nas fossas e fissuras, ao contrário das demais regiões da boca, não ocorre facilmente a autolimpeza, dificultando até mesmo a ação da capacidade tampão da saliva. Este aspecto é aguçado devido a dificuldade de limpeza mecânica com a escova. Mesmo uma terapia intensiva com flúor não sobrepõe a susceptibilidade à cárie das

superfícies oclusais, pois a maior atuação do flúor se dá sobre superfícies lisas.

Reconhecendo, portanto, a vulnerabilidade das superfícies oclusais à cárie, pesquisas odontológicas introduziram uma variedade de técnicas com a finalidade de preveni-la ou diminui-la, dentre elas o uso dos selantes oclusais. O emprego dos selantes teve início em 1955 por Buonocore, que os descrevia como materiais restauradores capazes de formar ligações fortes com as estruturas dentárias, não havendo necessidade de preparo cavitário para seu uso, formando uma barreira física que impede a deposição de resíduos alimentares e a invasão bacteriana.

Levando-se em consideração que a colonização da superfície de materiais odontológicos por bactérias cariogênicas, particularmente *S. mutans*, favorece a criação de condições ambientais adequadas para o desenvolvimento da doença cárie (PEDRINI et al., 2001; MONTANARO et al., 2004), o objetivo do presente estudo foi avaliar a aderência microbiana de *S. mutans* a um selante com flúor e com carga, um selante sem flúor e sem carga e um adesivo, comparando-se com esmalte humano.

Metodologia

Dois selantes odontológicos, um adesivo e esmalte humano foram utilizados para o experimento. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP (038/2003-PH/CEP). Os materiais utilizados, marcas comerciais e indicações estão apresentados no Quadro 1.

Dez espécimes padronizados de cada material foram confeccionados, apresentando 5 mm de diâmetro e 2,5 mm de espessura. As amostras foram confeccionadas utilizando-se uma matriz metálica, a qual foi colocada sobre uma placa de vidro e primeiramente foi inserido resina composta nos espaços da matriz de forma incremental (2 camadas de 1 mm), recebendo cada camada polimerização de 60 segundos (Fotopolimerizador Gnatus). Em seguida, as amostras receberam os materiais que foram avaliados no estudo, os quais foram inseridos em camada única de 1 mm e polimerizados por 60 segundos. Todas as amostras foram confeccionadas conforme recomendação dos respectivos fabricantes.

As amostras de esmalte foram obtidas a partir de dentes humanos extraídos por motivos ortodônticos. A forma e o tamanho padronizados foram obtidos usando broca diamantada cônica (4137, KG Sorensen), montada em aparelho de alta-rotação.

Quadro1- Materiais avaliados no estudo, segundo sua constituição, produto e indicação:

Grupo	Constituição	Produto
Selante 1	Selante odontológico com carga e com flúor.	Fluorshield
Selante 2	Selante odontológico sem carga e sem flúor.	Helioseal Clear Chromo
Adesivo	Adesivo dentinário.	Adesivo dentinário 3M
Esmalte	Esmalte humano	-

Posteriormente, os espécimes foram desgastados com broca diamantada cilíndrica nº1092 (KG Sorensen), montada em aparelho de alta rotação (Kavo) sob constante refrigeração em água até obtenção da espessura estabelecida. As superfícies desgastadas não foram avaliadas no estudo sendo que cada amostra apresentou apenas uma superfície de teste que receberam acabamento com broca diamantada cilíndrica F número 1091 (KG Sorensen).

Antes do experimento, somente a superfície teste de cada amostra permaneceu exposta, sendo as demais superfícies cobertas com

esmalte de unha (Colorama Maybelline, São Paulo, Brasil). As amostras foram imersas em água destilada no interior de tubos de ensaio e autoclavadas a 121°C por 15 minutos.

Para avaliação da aderência, cepa padrão de *S. mutans* (ATCC35688) foi semeada em meio de cultura BHI ágar (*Brain Heart Infusion*, Merck, Whitehouse Station, NJ, EUA). As placas foram incubadas a 37°C/ 48 h em teor de 5% de CO₂. Após crescimento, as colônias formadas foram transferidas com alça de platina para tubo de ensaio contendo 10 ml de solução salina (NaCl 0,9%) esterilizada. A suspensão obtida foi padronizada em espectrofotômetro (Shimadzu UV-1203, Kuoto, Japão), obtendo-se de 10⁶ células/ml de *S. mutans*. Os parâmetros de densidade óptica e de comprimento de onda utilizados para padronização foram de 0,620 e 398 nm, respectivamente.

A seguir, os espécimes foram colocadas em placas estéreis de cultura de células contendo 24 poços (TPP[®], Suíça). Uma placa foi utilizada para cada material, sendo que cada amostra foi colocada em um dos poços da placa. A cada poço, foi adicionado 2 ml de caldo sacarado (GIBBONS; NYGAARD, 1968), e 0,2 ml de suspensão padronizada com 10⁶ células /ml de *S. mutans*.

A placa foi mantida em temperatura de 37°C/24 h e 5% de CO₂. Decorrido este período, os espécimes foram retirados das placas e imediatamente inseridos, individualmente, em tubos de ensaio contendo 1,5 ml de solução salina (0,9% NaCl) esterilizada e pérolas de vidro (solução inicial). Os tubos foram agitados em agitador de tubos (Vortex modelo AP 56) por 30 s, a fim de destacar as bactérias aderidas.

A partir da solução inicial foram obtidas diluições decimais (10⁻¹ a 10⁻³) e a alíquotas de 0,1 mL das diluições foram semeadas em duplicata em placas contendo BHI ágar. As placas foram incubadas a 37°C/48h, 5% de CO₂. A seguir, foram selecionadas placas em que o número de colônias situou-se entre 30 e 300 UFC/mL (JORGE, 2007) e calculou-se a quantidade de microrganismos, que foram convertidos para logaritmos (base 10) de UFC/mL. Os resultados foram analisados estatisticamente pela Análise de Variância (ANOVA) e teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

Resultados

Os valores médios de aderência de *S. mutans* nos corpos-de-prova de cada grupo experimental estão apresentados na Tabela 1. Após análise estatística, não foi verificada

diferença estatisticamente significativa, sendo que os três grupos de materiais avaliados apresentaram aderência similar se *S. mutans* ($p > 0,05$). Todos os grupos apresentaram, entretanto, diferença estatística em relação ao esmalte humano (Tabela 2).

Tabela 1 – Valores médios de aderência de *S. mutans* (\log_{10} UFC/ml) apresentados por cada espécime dos grupos experimentais

	G1 Selante com carga e flúor	G2 Adesivo	G3 Selante sem carga sem flúor	Esmalte humano
1	5,77	5,31	5,98	6,71
2	5,69	5,85	5,55	6,46
3	4,80	5,30	5,78	6,26
4	5,30	5,38	5,25	6,77
5	5,60	5,55	5,64	6,43
6	5,71	5,14	5,80	6,74
7	4,80	5,07	5,92	6,45
8	5,50	5,64	5,90	6,36
9	5,74	5,83	5,20	6,62
10	5,44	5,66	5,80	6,53

Tabela 2 – Valores médios \pm desvio-padrão de UFC/mL (\log_{10}) de *Streptococcus mutans* apresentados pelos grupos experimentais

	Média	Desvio-padrão	Estatística*
Selante com carga e flúor	5,44	0,365	A
Adesivo	5,47	0,274	A
Selante sem carga e flúor	5,68	0,272	A
Esmalte humano	6,53	0,172	B

* ANOVA, Teste Tuckey ($p \geq 0,05$). Letras diferentes: significância estatística

Discussão

A cárie dentária é considerada uma doença multifatorial, na qual a infecção com estreptococos do grupo mutans têm grande influência (SUHONEY et al., 1995). Por esse motivo optou-se por utilizar *S. mutans* nos ensaios de aderência realizados no presente trabalho, pois a adesão bacteriana aos materiais restauradores desempenha papel fundamental na patogênese da cárie e doença periodontal (QUIRYNEN et al., 1990). Vários estudos na literatura também utilizaram *S. mutans* para estudo de aderência bacteriana em diferentes materiais restauradores (PEDRINI et al. 2001; ZALKINI et al. 1998; MACHADO et al. 1997; SHAHAL et al. 1998; MONTANARO et al. 2004).

A existência de grande variedade de materiais restauradores, com características físico-químicas diferentes, cria uma grande preocupação quanto à capacidade de acúmulo de biofilme relacionada a sua superfície. (TULLBERG, 1986), o que nos levou a avaliar biofilme formado *in vitro* em selantes oclusais. Não observamos, entretanto, diferenças significativas entre os materiais testados.

Machado et al. (1997) também não verificaram diferenças na aderência de *S. mutans* ao amálgama, resina composta híbrida e cimento de ionômero de vidro (foto e quimicamente ativado). Shahal et al. (1998) não observaram diferença na aderência de *S. mutans* entre resinas compostas híbridas, microparticuladas, fortemente particuladas e cimentos ionoméricos. Zalkind et al. (1998) descreveram aderência similar entre resinas compostas (microparticuladas e macroparticuladas) e resinas com diferentes tipos de acabamento e polimento, resultados que corroboram os encontrados no presente estudo. Por outro lado, Montanaro et al. (2004) testaram a aderência de *S. mutans* a três resinas micro-híbridas, três resinas fluidas, um compômero e dois ionômeros modificados por resina, e também concluíram não haver diferença na adesão entre esses materiais, com exceção de um dos ionômeros de vidro que apresentou maior aderência. Como não foi avaliado cimento de ionômero de vidro em nosso estudo, os dados de Montanaro et al., concordam com nossos resultados.

Pedrini et al. (2001), observaram que *S. mutans* aderiu-se ao cimento ionomérico (Vitremmer) e que a aplicação tópica de flúor não influenciou nesta adesão. Montanaro et al. (2004) também verificaram em seu estudo que mesmo nos materiais conhecidos pela liberação de flúor (ionômeros de vidro e compômeros), esta liberação foi insignificante, não sendo capaz de reduzir a aderência de *S. mutans*. No presente estudo a presença de flúor no selante Fluorshild, também não influenciou na adesão de *S. mutans*, visto que o mesmo apresentou a mesma quantidade de UFC/ml quando comparado com selante sem carga e sem flúor e o adesivo.

Estudos foram realizados por Keenan et al. (1980) e Dummer e Harrison (1982), visando comparar a importância da rugosidade superficial dos materiais na formação do biofilme dentário. Os resultados mostraram que em superfícies mais rugosas, se acumula mais biofilme, significativamente. Porém em pesquisas realizadas por Zalkini et al. (1998); Machado et al. (1997); Shahal et al. (1998), a rugosidade superficial dos materiais testados não influenciou na aderência bacteriana. No presente estudo, não

foi avaliada a rugosidade superficial dos selantes, entretanto, esta pode representar um fator de importância. Sugere-se que novos ensaios de aderência com *S. mutans*, comparando-se com rugosidade superficial em selantes, sejam realizados.

Baseado nos resultados obtidos sugere-se que novos estudos sejam conduzidos a fim de avaliar os diversos tipos de selantes existentes, visto que, a adesão de microrganismos a este material é um assunto pouco avaliado e discutido. Novos estudos poderiam ser realizados também para a comparação de adesão de microrganismos em selantes “*in vitro*” e “*in vivo*”.

Conclusões

Com base nos resultados obtidos neste estudo, pôde-se concluir que a aderência de *S. mutans* foi similar nos materiais avaliados (selante com flúor e com carga, selante sem flúor e sem carga e adesivo), não havendo diferença estatística significativa entre eles. Todos os materiais analisados apresentaram, entretanto, menor adesão de *S. mutans* em relação ao esmalte humano, com diferença significativa.

Referências

- BUONOCORE, M.G. A simple method of increasing the adhesion of acrylic filling materials to enamel surface. **J. Dent. Res.** v.34, n.6, p.849-853, 1955.
- DUMMER, P.M.H.; HARRISON, K.A. *In vitro* plaque formation on commonly used dental materials. **J. Oral Rehabil.** v.9, n.5, p.413-417, 1982.
- GIBBONS, R.J.; NYGAARD, M. Synthesis of insoluble dextran and its significance in the formation of gelatinous deposits by plaque-forming streptococci. **Arch. Oral Biol.** v.13, n.10, p.1249-1262, 1968.
- HERZBERG, M.C. Oral streptococci in health and disease. In: STEVENS, D.; KAPLAN, E.L. **Streptococcal infections clinical aspects, microbiology, and molecular pathogenesis.** New York: Oxford University Press 2000. Cap. 18, p.333-370.
- JORGE, A.O.C. **Microbiologia:** atividades práticas. 3.ed. São Paulo: Livraria e Editora Santos, 2007. 198p.
- KEENAN, M.P. et al. Effects of cast gold surface finishing on plaque retention. **J. Prosthet. Dent.** v.43, n.2, p.168-173, 1980.
- MACHADO, W.A.S. et al. Análise *in situ* da formação de placa bacteriana em diferentes materiais restauradores. **Rev. Bras. Odontol.** v.54, n.6, p.362-367, 1997.
- MONTANARO, L. et al. Evaluation of bacterial adhesion of *Streptococcus mutans* on dental restorative materials. **Biomaterials** v.25, p.4457-4463, 2004.
- PEDRINI, D.; GAETTI-JARDIM Jr., E.; MORI, G.G. Influência da aplicação de flúor sobre a rugosidade superficial do ionômêro de vidro Vitremer e a adesão microbiana e esse material. **Pesqui. Odontol. Brás.** v.15, n.1, p.70-76, 2001.
- QUIRYNEN, M. et al. The influence of surface free energy and surface roughness on early plaque formation. An *in vivo* study in man. **J. Clin. Periodontol.** v.17, n.3, p.138-144, 1990.
- SHAHAL, Y. et al. *In vitro* bacterial adherence onto pellicle-coated aesthetic restorative materials. **J. Oral Rehabil.** v.25, n.1, p.52-58, 1988.
- SUHONEY, J. et al. A prevenção primária da cárie: evitar à infecção bacteriana. **Cecade News** v.3, n.3, p.13-27, 1995.
- TULLBERG, A. An experimental study of adhesion of bacterial layers to some restorative dental materials. **Scand. J. Dent. Res.** v.94, n.5, p.164-173, 1986.
- ZALKIND, M.M. et al. Accumulation of *Streptococcus mutans* on light-cured composites and amalgam: an *in vitro* study. **J. Esthet. Dent.** v.10, n.4, p.187-190, 1998.