

COLONIZAÇÃO E RETENÇÃO MICROBIANA EM SUPERFÍCIES COM OU SEM FENDAS SIMULADAS FRENTE AO USO DE CLOREXIDINA E FLÚOR

MASKE, Tamires Timm¹
NASCIMENTO, Camila Neunfedt²
VAN DE SANDE, Françoise Hélène³
OLIVEIRA, Elenara Ferreira⁴

¹ Acadêmica de Odontologia UFPel. tamirestmaske@hotmail.com

² Acadêmica de Odontologia UFPel. camilann_28@hotmail.com

³ Doutoranda em Dentística FO-UFPel. fvandesande@gmail.com

⁴ Professor de Dentística FO-UFPel. f.elelara@gmail.com

CENCI, Maximiliano Sérgio⁵

⁵ Professor de Dentista FO-UFPel(cencims@gmail.com)

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, em decorrência da redução da incidência de cárie, a maioria das lesões cariosas localizam-se na superfície oclusal. (SILVA et al. 2001). Paralelamente, tem sido relatado que uma parcela considerável dessas lesões mostram-se, clinicamente, fechadas na superfície do esmalte, apesar de apresentarem extensão radiográfica em dentina. Elas tem sido referidas, como cárie oculta (WEERHEIJM et al., 1992; RICKETTS et al., 1997) uma vez que poderiam passar despercebidas ao exame clínico devido a variabilidade da perda de substância na superfície do esmalte; caracterizadas por ser quase imperceptível ou por apresentar microfendas com diâmetros variados de abertura.

Quando lesões fechadas são diagnosticadas o tratamento restaurador tem sido preconizado, no entanto, não se têm investigado outras alternativas de intervenção clínica. Todavia, é notável, que o desenvolvimento do biofilme relacionado à progressão de cárie desse tipo poderia ser influenciado pela utilização de substâncias antimicrobianas como a clorexidina e o flúor uma vez que atuam no metabolismo celular das bactérias. (SANABE et al., 2010; BOWDEN, 1990).

Diante disso, o presente trabalho visa avaliar a ação da Clorexidina 0,12% (CLX) e Flúor Fosfato Acidulado 1,23% (FFA) em superfícies dentárias simuladas com ausência ou presença de microfendas em esmalte e estendendo-se até dentina nas quais foram desenvolvidos biofilmes a partir de um modelo de biofilme de microcosmos.

2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

2.1. Delineamento experimental

Os biofilmes foram formados, em placas de 24 micropoços, a partir de inóculo de saliva humana sobre os espécimes divididos em dois grupos (esmalte superficial íntegro e fendas de 500 µm). Utilizou-se como meio de crescimento o DMM - meio definido enriquecido com mucina, suplementado com 1% de sacarose em regime intermitente. (VAN de SANDE, 2010). Os biofilmes foram cultivados em anaerobiose a 37°C durante 10 dias Os espécimes dos subgrupos (presença fenda X tipo de tratamento; n=9) foram tratados individualmente por imersão diária em CLX ou solução salina (controle); ou semanal em suspensão de FFA (1:3, p/v) por 1 min

antes dos desafios com sacarose (Fig.1). Os resultados foram obtidos através da quantificação em microorganismos totais (MT) e estreptococos do grupo mutans (EM) realizada através da coleta de biofilmes 24h após o último tratamento.

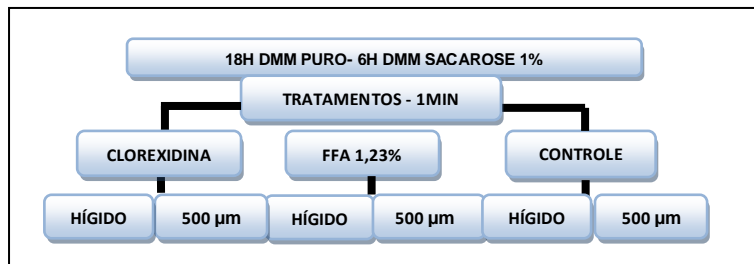


Figura 1. Representação esquemática do delineamento do estudo. Regime intermitente de exposição à sacarose, tratamentos com 1 min de imersão na solução de clorexidina (CHX), flúor fosfato acidulado (FFA) e controle (solução salina).

2.2. Preparo dos Espécimes

Foram selecionados para o estudo cinquenta e quatro dentes incisivos bovinos irrompidos e livres de falhas, os quais foram seccionados, com auxílio de uma furadeira de bancada, ao nível do terço médio para obtenção de discos padronizados de esmalte e dentina. Através de uma cortadeira de precisão foram seccionados, também, ao nível da junção amelocementária separando, assim, discos de dentina e esmalte. Destes, selecionou-se vinte e sete discos de esmalte que foram seccionados, no mesmo dispositivo, em duas porções iguais em forma de semicírculo.

Os discos de dentina foram divididos em dois grupos (esmalte superficial íntegro ou com fendas) e fixados através de cera pegajosa em matrizes de acetato. Sobre esses discos foram adaptados os discos de esmalte íntegros ou os semicírculos simulando fendas de 500 µm até a dentina. A interface discos-matriz foi vedada lateralmente com cera pegajosa e superficialmente com esmalte de unha. (Fig. 2).



Figura 2. Estrutura esquemática dos espécimes.

2.3. Coleta de Saliva

Após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia (UFPEL) sob parecer N° 076/2009, 20 mL de saliva estimulada por filme de parafina foi coletada de um voluntário (sexo feminino, 22 anos) saudável, que não havia estado sob terapia antibiótica por um ano e que se absteve de higiene oral por 24 h e da dieta alimentar por 2 h prévias a coleta. A saliva foi depositada em um coletor graduado estéril e transportada em gelo ao Laboratório de Microbiologia (FO-UFPEL).

2.4. Processo de inoculação e formação do biofilme

A saliva foi inoculada em volumes de 400 µL sobre os espécimes em placas de 24 micro-poços. Após 1 h em repouso, foi delicadamente aspirada da base dos poços e 1,8 mL de meio (DMM) com 1% de sacarose foram adicionados em cada poço, e as placas incubadas. Após 6 h, os espécimes foram enxaguados através de

imersão em 2 mL de solução salina estéril, inseridos em uma nova placa contendo DMM e novamente incubados por 18 h. Os biofilmes foram formados de forma individualizada sobre os corpos de prova em cada micro-poço. As placas foram incubadas em jarras de anaerobiose (5-10% CO₂) sob temperatura controlada (37°C) e mantida em repouso na incubadora.

2.5. *Tratamentos:*

Os tratamentos consistiram de imersão diária durante um minuto em 2 mL de solução de CLX 0,12% e imersão semanal em 2 mL de FFA (1/3pV). Eles iniciaram no segundo dia do experimento e foram aplicados antes das exposições à sacarose. Após os tratamentos, os espécimes eram lavados em solução salina estéril, por imersão durante 10 s. O grupo controle assim como o grupo do FFA nos demais dias da semana foram tratados com soro fisiológico estéril sob o mesmo protocolo.

2.6. *Análise do crescimento dos Biofilmes e dos Perfis Microbianos*

Após o período experimental (10 dias) cada espécime foi transferido para um tubo falcon codificado contendo 1 mL de solução NaCl 0,9%. Após sonicação, por 30 seg a 7 w, foram obtidas diluições seriadas até a concentração a 10⁻⁷ e 20 µL de cada uma das concentrações plaqueadas em meio de cultura Ágar sangue e MSB. As placas de meio inoculadas foram incubadas em anaerobiose a 37° por 96 h para posterior análise do crescimento microbiano. De cada Tubo Falcon sonicado, retirou-se, também uma alíquota 300 µL que foi repassada a um eppendorf pré-pesado e codificado, contendo 0,90 µL de álcool absoluto. A solução foi centrifugada por 5 min, 10000 g a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o tubo com o precipitado foi levado ao dessecador por 24-48 h com P₂O₅. Cada eppendorf foi pesado novamente a fim de obter-se o peso seco do biofilme.

A partir disso, as unidades formadoras de colônia (UFC) foram contadas e os resultados expressos em UFC/mg de biofilme (peso seco) e em porcentagem de estreptococos do grupo mutans em relação aos microrganismos totais cultiváveis.

2.7. *Análise estatística:*

Os dados foram analisados com ANOVA e teste Holm-Sidak (p<0,05), utilizando o programa SAS v. 9.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, E.U.A.).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Analisando os dados, pode-se observar que a CLX diminuiu as contagens de MT em relação ao tratamento com FFA, independente da presença ou ausência de fendas (p<0,05).

Os dados demonstram que a CLX obteve efeito antimicrobiano quantitativo e eficaz na desorganização do biofilme dental, corroborando com dados da literatura que demonstram a sua efetividade na prevenção da placa dental devido sua propriedade inibitória da aderência microbiana. (MOREIRA et. al, 2008). Além disso, a pesar da CLX desempenhar uma maior inibição dos MT, o tratamento com FFA também demonstrou-se efetivo quando comparado ao grupo controle, confirmando que o íon fluoreto tem capacidade de influenciar na ecologia do biofilme dentário.(ALVES, 2010).

Os dados ainda explicitam que a presença de fendas causou maiores contagens de MT apenas para o controle (p=0,024), indicando que a presença das

mesma não gera maior colonização microbiana frente aos tratamentos com FFA e CLX.

Observou-se ainda, que a CLX gerou maiores contagens de EM em relação aos outros tratamentos ($p=0,026$). Os dados demonstraram que a CLX não proporcionou a diminuição esperada de EM e de encontro à literatura ela não se mostrou qualitativa em reduzir EM, a pesar de serem considerados sensíveis a esta substância. (RIBEIRO et al., 2007). Diante disso, explana-se a idéia de que utilização de um modelo de biofilme no qual são feitas duas trocas diárias de meio de cultura tenha neutralizado o efeito de substantividade da mesma influenciando a sua efetividade frente a esses microorganismos.

4 CONCLUSÃO

Demonstra-se assim que a presença de fendas não gera maior colonização microbiana sob tratamento com CLX ou FFA e o uso de CLX não inibe a colonização por EM das superfícies com ou sem fendas.

5 REFERÊNCIAS

- RICKETTS, D.; KIDD, E.; WEERHEIJM, K.; SOET, H. *Hidden caries: What is it? Does it exist? Does it matter?* **Int Dent J** 1997; 47: 259-265.
- SILVA, B. B.; MALTZ, M. Prevalência de cárie, gengivite e fluorose em escolares de 12 anos de Porto Alegre - RS, Brasil, 1998/1999. **Pesqui Odontol Bras**, v. 15, n. 3, p. 208-214, jul./set. 2001.
- WEERHEIJM, K.L.; GRUYTHUYSEN, R.; VAN AMERONGEN, W.E: Prevalence of hidden caries. **ASDC J Dent Child** 1992; 59:408–412.
- SANABE, Mariane Emi; MOTISUKI, Cristiane; NEGRINI, Thais de Cássia; MADALENA, Denise; SPOLIDORIO, Palomari, HELBLING, Josimeri. Efeito da Aplicação da Clorexidina no Controle de Estreptococos Mutans do Biofilme Oclusal. **Brazilian Journal of Health**, São Paulo, v. 1, n. 1, p. 37-46, 2010.
- MOREIRA, Ana Cristina Azevedo; SANTOS, Tiago Afonso Maltez dos Santos; CARNEIRO, Milena Couto; PORTO, Mariana Ribeiro. Atividade de um enxaguatório bucal com clorexidina a 0,12% sobre a microbiota sacarolítica da saliva. **R. Ciências médicas biológicas**, Salvador, v.7, n.3, p. 266-272, 2008.
- VAN de SANDE, Françoise Hélène Leite. **Desenvolvimento de um modelo de biofilme para estudos de desmineralização do esmalte**. 2010. Dissertação (Mestrado em Dentística) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2010.
- RIBEIRO, Luciana Gazaniga Maia; HASHIZUME, Lina Naomi, MALTZ, Marisa. The effect of different formulations of chlorhexidine in reducing levels of mutans streptococci in the oral cavity: A systematic review of the literature. **Journal of Dentistry**, n.35 359–370.
- ALVES, Tallyta Maria Santos; SILVA, Camila Alves; SILVA, Naiana Braga da; MEDEIROS, Eliane Baista de; VALENÇA, Ana Maria Gondim. Atividade Antimicrobiana de Produtos Fluoretados sobre Bactérias Formadoras do Biofilme Dentário: Estudo in vitro. **Pesq Bras Odontoped Clin Integr**, João Pessoa, v.10, n.2, 209-216, 2010.
- BOWDEN, G.H.W. Effects of fluoride on the microbial ecology of dental plaque. **J. Dent. Res.** v. 69, p.653-59. 1990.