

# Efeito de componentes de dentifrícios infantis sobre *Streptococcus mutans* cultivados em biofilmes

*Children's dentifrices components effect in Streptococcus mutans grown in biofilms*

Wagner Pereira Coutinho Filho

Mestrando em Microbiologia pela Faculdade de Ciências Médicas/Uerj

Ana Luiza de Mattos Guaraldi

Raphael Hirata Junior

Professores Adjuntos de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Ciências Médicas/Uerj

Mariana Passos

Professora das Disciplinas de Saúde Bucal e Sociedade I e II da Unesa Professora Substituta de Saúde Bucal Coletiva da Uerj

Sergio de Carvalho Weyne

Coordenador das Disciplinas de Saúde Bucal e Sociedade I e II da Unesa

## Resumo

O estudo objetivou avaliar a capacidade de formação de biofilme *de novo* por *S. mutans* após tratamento de biofilmes pré-formados com composições de dentifrícios: I- base contendo 500 ppm NaF<sub>2</sub> e 2,5% xilitol; II- base contendo 500 ppm NaF<sub>2</sub>; III- base contendo 10% xilitol; IV- base sem aditivos; V- solução salina fisiológica. Todas as formulações inibiram a formação *de novo* do biofilme por *S. mutans*. Maiores inibições foram encontradas para os tratamentos I e II. A composição III também foi efetiva na inibição. As formulações contendo xilitol e/ou NaF<sub>2</sub> modularam a formação do biofilme por *S. mutans in vitro*.

**Palavras-chave:** dentifrícios infantis; xilitol; *Streptococcus mutans*.

## Abstract

The investigation aimed to evaluate the ability of *S. mutans* to form biofilms *de novo* after treatment of pre-formed biofilms with different dentifrice compositions: I- base with 500ppm NaF<sub>2</sub> and 2.5% xylitol; II- base with 500ppm NaF<sub>2</sub>; III- base with 10% xylitol; IV- base alone; V- saline solution. All formulations inhibited the formation *de novo* of *S. mutans* biofilm. The most effective inhibition was found in formulations I and II. The formulation III also inhibited the formation of *S. mutans* biofilm. Thus, formulations of dentifrices with xylitol and/or NaF<sub>2</sub> modulated the biofilm formation by *S. mutans in vitro*.

**Keywords:** children's dentifrice; xylitol; *Streptococcus mutans*.

## Introdução

Na cavidade oral de seres humanos, os estreptococos do grupo *mutans* (EGM) são capazes de constituir, associados a outros microrganismos, biofilmes em superfícies não descamativas, tais como sobre as estruturas dentárias e materiais restauradores. O processo de cárie dentária é multifatorial, sendo consequência da desmineralização da estrutura dentária induzida pelos biofilmes onde ocorre o predomínio de EGM e quando são fornecidas as condições apropriadas. A redução do pH da estrutura do biofilme, especialmente na interface esmalte/biofilme, decorre da produção de metabólitos, em especial o ácido láctico, responsável pela dissolução do esmalte dentário (5).

A estrutura do biofilme dental bacteriano, ao contrário do que se imaginava até a década de 90, apresenta-se constituído de seios e canais capazes de gerar gradientes de substratos, íons, potencial redox e metabólitos que retroalimentam as espécies constituintes da biomassa. Análises utilizando kits que identificam a relação bactérias viáveis/inviáveis demonstraram variação na viabilidade bacteriana ao longo do biofilme, apresentando tendência ao aumento da viabilidade microbiana nas porções centrais do biofilme bacteriano *in vivo* (6).

Microrganismos cultivados em biofilmes apresentam diferenças importantes das células livres nos meios de cultura (células planctônicas). Bactérias de biofilmes apresentam maior tendência a resistir às intempéries do meio de crescimento, são mais resistentes aos diferentes agentes antimicrobianos e anti-sépticos e capazes de resistir a diversos mecanismos de defesa imunológicos. Os EGM são capazes de expressar a formação do biofilme *in vitro*, quando cultivados em meio de cultura contendo sacarose (3).

Muitos dos ensaios que avaliam propriedades antimicrobianas *in vitro* e *in vivo* ainda não avaliaram a capacidade de recolonização de superfícies rígidas por EGM após a exposição a agentes químicos presentes em diversas formulações de utilização na cavidade oral incluindo soluções enxaguatórias ou dentifrícios. O presente estudo avaliou a atividade de uma base de dentifrício infantil, associada ao íon fluoreto e xilitol quanto à capacidade dos *Streptococcus mutans* ATCC 25175 em formar biofilme *de novo* sobre superfície rígida (não descamativa).

## Material e Método

### • Cepa Bacteriana

Foi utilizada a cepa de *S. mutans* ATCC 25175 isolada originalmente de dentina humana cariada. A cepa, mantida através de congelamento a -20°C em solução de leite desnatado a 10% (Skim milk, Difco Laboratories Detroit – MI), foi descongelada e analisada para a pureza através de métodos bioquímicos e de coloração de Gram. Durante os ensaios, as amostras foram mantidas em placas de agar Mitis – Salivarius (Difco) contendo 20% de sacarose e 0,25 UI/mL de bacitracina (Sigma Chemical Co, St Louis, USA). Todos os experimentos foram conduzidos no interior de câmaras de fluxo laminar.

### • Formação de Biofilme sobre a Superfície do Vidro

O método de formação de biofilme sobre superfície de vidro seguiu o protocolo desenvolvido por KAWABATA & HAMADA (3). As amostras foram cultivadas durante 24h/37°C em tubos 13 X 100 contendo 0,5 mL de TSB sem glucose (Difco) suplementado com 1% de sacarose. O cultivo foi realizado durante 72 horas com trocas de meio de cultura a cada 24 horas para a formação de biofilme coeso. Os biofilmes aderidos ao vidro foram lavados em solução salina fisiológica estéril e utilizados para a exposição às diferentes formulações de dentifrícios e aos controles. A formação do biofilme na presença do meio de cultura contendo diferentes monossacarídeos também foi monitorada através do cultivo das amostras em placas de 24 orifícios para cultura de células (Nunclon delta surface, Nunc) contendo lamínulas de vidro de 13 mm de diâmetro.

### • Desenho Experimental

O biofilme, formado na superfície de tubos 13 X 100, foi exposto por 2 minutos às formulações dos dentifrícios, diluídos em água destilada estéril, na razão de 1:1 (vol/vol), com o intuito de liquefazer os cremes dentais e permitir melhor contato entre o biofilme e as formulações. Os dentifrícios contendo os diferentes agentes foram cedidos pelo Laboratório Daudt Oliveira e enviados à Disciplina de Microbiologia e Imunologia da FCM/Uerj codificados para que os ensaios fossem desenvolvidos sem o conhecimento prévio dos componentes.

**I** – Fórmula contendo base do creme dental, 2.5% de xilitol e 500 ppm de fluoreto de sódio\*;

**II** – fórmula contendo a base do creme dental e 500 ppm de fluoreto de sódio;

**III** – fórmula contendo a base do creme dental e 10% de xilitol\*\*;

**IV** – fórmula contendo a base do creme dental sem fluoreto de sódio e sem xilitol;

**V** – tratamento do biofilme com solução salina fisiológica estéril. (Preparações correspondentes aos produtos \*Malvatrikids F e \*\*Malvatrikids Baby – Laboratório Daudt Oliveira Ltda.).

Após o tratamento dos biofilmes formados na superfície interna do tubo de ensaio com as formulações diluídas em partes iguais por 2 minutos em temperatura ambiente, as formulações diluídas foram retiradas e os tubos lavados cuidadosamente com solução salina fisiológica estéril, de modo a não ocorrer o descolamento do biofilme da superfície interna dos tubos de vidro. Em seguida, foram adicionados 0,5 mL de solução fisiológica estéril e aproximadamente 100 µg de pérolas de vidro de

0,25 mm de diâmetro (Sigma) estéreis. O biofilme foi então agitado em agitador de tubos para que as células aderidas fossem removidas e homogeneizadas. Em seguida, 50 µL da suspensão foram adicionados a 450 µL de caldo TSB sem glucose, acrescentado de 1% de sacarose em poços de placas de cultura de células de 24 orifícios. As placas foram seladas e incubadas a 37°C por 48 horas. Os meios de cultura foram então removidos e os biofilmes foram fixados com metanol (Merck Darmstadt, DE) e corados com cristal violeta a 1% durante 10 minutos. Após a lavagem dos poços e subsequente secagem, os biofilmes foram fotografados. Adicionalmente, o cristal violeta incorporado aos biofilmes foi eluído com solução de ácido acético (Merck) a 33% e 50 µL foram transferidos para microplacas de elisa e aferidos em espectrofotômetro em comprimento de onda de 570 nm. A intensidade da formação do biofilme pela cepa bacteriana foi correlacionada à incorporação do cristal violeta (8). Os experimentos foram realizados em triplicata e a média de cada grupo comparada pelo teste de Anova e análise múltipla comparativa de Tukey, através do Programa GraphPad Prism (versão 4.0).

## Resultados

Interferência dos cremes dentais na formação *de novo* do biofilme

Conforme demonstrado na figura 1, o biofilme coeso foi induzido na superfície do vidro, observado em lamínulas de 13 mm de diâmetro. O biofilme espesso e coeso, ou seja, resistente à lavagem vigorosa com solução salina foi formado apenas na superfície das lamínulas quando do cultivo dos *S. mutans* na presença de TSB sem glucose con-

tendo 1% de sacarose. O biofilme não foi formado quando a cepa foi cultivada na presença de xilitol a 1%.

O tratamento do biofilme formado *in vitro* com as diversas formulações foi capaz de interferir de maneira variada com a formação *de novo* do biofilme pelos *S. mutans* ATCC 25175 (Tabela I e figura 2). Foi possível observar que as formulações que mais interferiram com a capacidade de formação do biofilme *de novo* foram as que contiveram o íon fluoreto a 500 ppm ( $P < 0.001$ ). Quando associado ao xilitol a 2,5%, foi possível observar uma redução da capacidade de formação de biofilme (apesar de não significativa  $P > 0.05$ ) quando comparado com o tratamento do biofilme com a base contendo apenas fluoreto a 500 ppm. Apesar de apresentar menor efetividade, quando comparada com as bases contendo íons fluoretos ( $P < 0.05$ ), o pré-tratamento do biofilme com a formulação contendo apenas xilitol a 10% também interferiu com a formação *de novo* do biofilme, quando comparado com o controle (base sem xilitol e sem íons fluoreto) ( $P < 0.001$ ). Também foi observado que a base sem xilitol e sem flúor também modulou a expressão de formação de biofilme pela cepa *S. mutans* ATCC 25175, quando comparada com o controle negativo para a base, constituído do tratamento do biofilme com solução salina a 0,9%, indicando que os componentes da base já apresentariam efeitos sobre a capacidade dos *S. mutans* em formar biofilme *in vitro* sobre superfície não descamativa.

## Discussão

A prevalência de cárie dentária vem decrescendo na maioria dos países industrializados em virtude de programas específicos dentre eles a fluoretação das

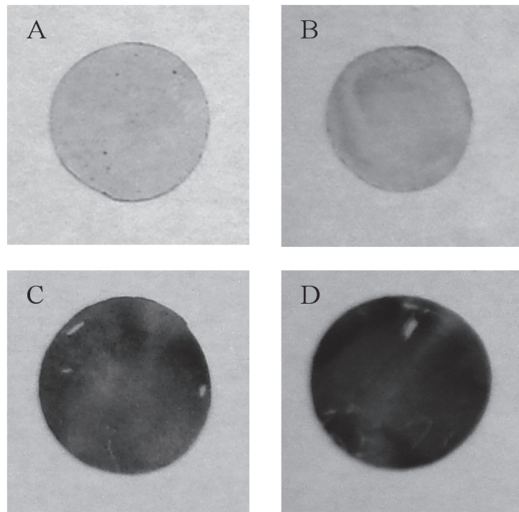
águas de abastecimento, aliado à melhoria das condições higiênico-sanitárias e sócio-econômicas. Na presente investigação, foi analisada a intensidade de formação *de novo* do biofilme por *S. mutans* após pré-tratamento de biofilmes com formulações de cremes dentais, através da incorporação de cristal violeta. Foi observado que a base de creme dental interferiu significativamente com a formação do biofilme quando comparado com o tratamento com solução salina ( $P < 0.001$ ). Estudos *in vivo* demonstraram que detergentes tais como o laurilsulfato de sódio foi efetivo no deslocamento de bactérias co-aderentes de superfícies expostas à saliva, sendo o mecanismo inibido quando em combinação com o fluoreto de estanho. A formação *de novo* do biofilme dos estreptococos ocorreu mais lentamente quando da utilização de dentifrícios contendo NaF, acompanhado de agregados de tamanho menor constituído de *Actinomyces sp* e estreptococos (1).

O tratamento do biofilme com a formulação contendo xilitol a 10% também interferiu de forma significativa com a formação do biofilme quando comparado com os dois controles: base sem componentes e solução salina, indicando que o xilitol teria a capacidade de interferir com o metabolismo/aderência dos *S. mutans* à superfície rígida. Estudos demonstraram a relação da colonização bucal por *S. mutans* em pares mãe-filho (crianças com 18 meses e 3 anos de idade) enfatizando a importância dos componentes dietéticos na transmissibilidade, justificando medidas preventivas primárias de ação direta nas mães com altos níveis de colonização por *S. mutans* (10). Métodos de redução dos níveis salivares de estreptococos do grupo *mutans* foram aplicados para mães apre-

sentando alta probabilidade de transmissão dos Estreptococos do grupo *mutans*. Ficou estabelecido que o uso de gomas de mascar contendo xilitol foi mais efetivo na redução da transmissibilidade das mães para os filhos do que os outros métodos incluindo o uso de soluções de bochechos contendo clorexidina e fluoreto de sódio (9). Estudo mais recente revelou que o uso de produtos contendo xilitol, incluindo cremes dentais, permitiu a manutenção do carboidrato em concentrações variadas de 8,2 mg ( $\pm 4,9$  mg) por pelo menos 8 minutos após a aplicação na cavidade oral (4).

As formulações contendo fluoreto de sódio a 500 ppm foram capazes de interferir significativamente com a formação do biofilme após o pré-tratamento dos *S. mutans*. Apesar de não ter apresentado diferenças estatisticamente significativas entre os sistemas contendo fluoreto de sódio a 500 ppm e fluoreto sódio a 500 ppm + 2,5% de xilitol, ocorreu menor incorporação de cristal violeta, ou seja, menor formação de biofilme *de novo*, quando do tratamento dos *S. mutans* com a formulação contendo 500 ppm de fluoreto de sódio associado a 2,5% de xilitol, sugerindo um efeito sinérgico entre os dois componentes em tais concentrações. Em virtude da formação do biofilme estar intimamente associada à produção de polissacarídeo por cepas de *S. mutans*, estudo recente evidenciou inibição de formação de polissacarídeo extracelular quando do tratamento dos *S. mutans* com preparação contendo laurilsulfato de sódio e fluoreto de sódio, sugerindo um efeito inibitório sinérgico (7). Apesar de estudos demonstrarem menor atividade inibitória na formação de placa quando do uso de concentrações abaixo de 600 ppm de flúor, quando comparado com uso de

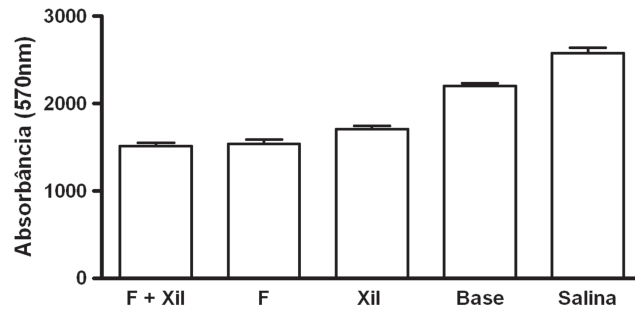
formulações contendo 1100 ppm (2), investigações *in vivo* ainda permanecem necessárias para a avaliação da eficácia das associações de dentifícios contendo fluoreto de sódio a 500 ppm e xilitol em diferentes concentrações (2,5% e 10%).



**Figura 1.** Formação do biofilme após 72 horas com trocas de meios de cultura TSB com sacarose. **A-** Ausência de formação de biofilme em meio TSB sem monossacarídeos (controle negativo); **B-** incubação do microrganismo durante 72 horas com meio TSB adicionado de glicose a 1%; **C-** incubação do microrganismo em meio contendo sacarose a 1%; **D-** incubação em meio contendo os açúcares glicose a 1% + sacarose a 1%. Após a incubação, as lamínulas foram removidas, lavadas em PBS e fixadas com metanol. O biofilme foi evidenciado, após coloração com cristal violeta a 1%

## Conclusão

Todas as formulações foram capazes de inibir em graus variados a formação do biofilme *de novo* por *S. mutans*, sendo significativamente mais pronunciado para as fórmulas contendo 500 ppm de flúor e 500 ppm + 2,5% de xilitol.



**Figura 2.** Absorbância ( $1_{570nm}$ ) do cristal violeta eluído do biofilme formado *de novo* após tratamento por 2 minutos de biofilme de *S. mutans* ATCC 25175 com bases de dentifício contendo 2,5% de xilitol + 500 ppm de fluoreto de sódio (F + Xil); 500 ppm de fluoreto de sódio (F); 10% de xilitol (Xil), sem aditivos (base) e solução 0,9% de cloreto de sódio (salina)

**Tabela I.** Efeito de composições de dentifícios sobre a formação *de novo* do biofilme de *S. mutans* ATCC 25175 após pré-tratamento de biofilmes com diferentes composições de cremes dentais (Grupos I a IV), através de método de coloração do biofilme e aferição após eluição do cristal violeta em espectrofotômetro

Grupos	Absorbância do cristal violeta* ( $DO_{1.570nm}$ )	Biofilme corado
Grupo I: base contendo 500 ppm de fluoreto de sódio e 2,5% de xilitol	1.515 ( $\pm 0.372$ )	
Grupo II: base contendo 500 ppm de fluoreto de sódio	1.539 ( $\pm 0.493$ )	
Grupo III: base contendo 10% de xilitol	1.710 ( $\pm 0.380$ )	
Grupo IV: base sem os componentes	2.202 ( $\pm 0.320$ )	
Grupo V <sup>**</sup> : solução salina fisiológica (0,9% de NaCl)	2.580 ( $\pm 0.580$ )	

\* Absorbância do eluato do cristal violeta com solução aquosa de ácido acético 33%.

\*\* Grupo controle negativo: pré-tratamento do biofilme com solução fisiológica.

Recebido em: 25/10/2007  
Aprovado em: 19/11/2007

Raphael Hirata Junior  
Av. 28 de Setembro, 87 - fundos - Vila Isabel  
Rio de Janeiro/RJ - CEP.: 20551-030  
E-mail: hirata@uerj.br

## Referências Bibliográficas

1. BUSSCHER, H. J., WHITE, D. J., ATEMA-SMIT, J. *et al.* Efficacy and mechanisms of non-antibacterial, chemical plaque control by dentifrices-an in vitro study. *J. Dent.*, v. 35, n. 4, p. 294-301, 2007.
2. DAVIES, R. M., ELLWOOD, R. P., DAVIES, G. M. The rational use of fluoride toothpaste. *Int. J. Dent. Hyg.*, v. 1, n. 1, p. 3-8, 2003.
3. KAWABATA, S., HAMADA, S. Studying biofilm formation of mutans streptococci. *Methods Enzymol.*, v. 310, p. 513-523, 1999.
4. LIF HOLGERSON, P., STECKSEN-BLICKS, C., SJOSTROM, I. *et al.* Xylitol concentration in saliva and dental plaque after use of various xylitol-containing products. *Caries Res.*, v. 40, n. 5, p. 393-397, 2006.
5. MARSH, P. D. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology*, v. 149, n. 2, p. 279-294, 2003.
6. MARSH, P. D. Dental plaque as a microbial biofilm. *Caries Res.*, v. 38, n. 3, p. 204-211, 2004.
7. PETERSEN, F. C., ASSEV, S., SCHEIE, A. A. Combined effects of NaF and SLS on acid- and polysaccharide-formation of biofilm and planktonic cells. *Arch. Oral Biol.*, v. 51, n. 8, p. 665-671, 2006.
8. STEPANOVIC, S., VUKOVIC, D., DAKIC, I. *et al.* A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J. Microbiol. Methods*, v. 40, n. 2, p. 175-179, 2000.
9. THORILD, I., LINDAU, B., TWETMAN, S. Effect of maternal use of chewing gums containing xylitol, chlorhexidine or fluoride on mutans streptococci colonization in the mothers' infant children. *Oral Health Prev. Dent.*, v. 1, n. 1, p. 53-57, 2003.
10. THORILD, I., LINDAU, B., TWETMAN, S. Salivary mutans streptococci and dental caries in three-year-old children after maternal exposure to chewing gums containing combinations of xylitol, sorbitol, chlorhexidine and fluoride. *Acta Odontol. Scand.*, v. 62, n. 5, p. 245-250, 2004.