

Avaliação antimicrobiana de três dentifrícios para uso infantil: estudo *in vitro*

Antimicrobial evaluation of three children dentifrices: in vitro analysis

Marina Dias Vieira

Especialista em Odontopediatria pela ABO-RJ
1º Ten Dentista do Corpo de Bombeiros Militar do Rio de Janeiro

Rafael Hirata Júnior

Doutor em Microbiologia pela UFRJ
Professor Adjunto de Microbiologia da Uerj

Anna Renata Schneider Barbosa

Mestre em Odontopediatria pela UFRJ
Professora Assistente do Curso de Especialização em Odontopediatria

Resumo

Este estudo avaliou a atividade antimicrobiana *in vitro* de três dentifrícios infantis, sendo um sem fluoreto, um contendo 500 e outro 1100 ppm de NaF. Os microrganismos utilizados foram: *S. aureus* (S.a.), *S. mutans* (S.m.), *E. faecalis* (E.f.), *E. coli* (E.c.). Empregou-se a Concentração Inibitória Mínima (MIC) e diluições seriadas (1:2 a 1:128). Não se observou atividade antimicrobiana para o dentifrício sem fluoreto. As diluições correspondentes às MICs dos dentifrícios contendo 500 e 1100 ppm de NaF foram, respectivamente: S.a. (4,4), E.f. (64,128), S.m. (4,8) e E.c. (2,2). Concluiu-se que o dentifrício sem fluoreto não apresentou atividade antimicrobiana e que os dentifrícios contendo fluoreto apresentaram MICs similares e atividade antimicrobiana para todos os microrganismos.

Palavras-chave: Creme dental; compostos de flúor; testes de sensibilidade microbiana.

Abstract

This study evaluated the *in vitro* antimicrobial activity of three children dentifrices: with lack of fluoride, 500 and 1100ppm of NaF, using the following microorganisms: *S.aureus* (S.a.), *S. mutans* (S.m.), *E. faecalis* (E.f.), *E. coli* (E.c.). The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was used with serial dilutions (1:2 to 1:128) and negative controls were incubated without toothpaste. Antimicrobial activity for non-fluoride toothpaste couldn't be observed. The MIC obtained for the dilutions for 500 and 1100 ppm of the NaF dentifrice were respectively: S.a. (4,4), E.f. (64,128), S.m. (4,8) and E.c. (2,2). All negative controls presented growth. It was concluded that the non-fluoride dentifrice didn't present antimicrobial activity. Both fluoride-containing toothpastes present similar MICs and antimicrobial activity.

Keywords: Toothpaste; fluorine compounds; microbial sensitivity tests.

Agradecimentos

Ao laboratório de Microbiologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro por permitir que toda a parte laboratorial pudesse ser concluída em suas instalações.

Introdução e Revisão da Literatura

Os cremes dentais infantis sofreram grandes modificações com os avanços da Odontologia. Estes consistiam em dentifrícios com alto percentual de flúor (1.100 ppm) e, como atrativo, apenas embalagens com temas lúdicos e sabor de guloseimas (9). Mesmo com alto teor de flúor, estes ainda podem ser comercializados para o público com mais de sete anos, pelo reduzido risco de fluorose desta faixa etária e, por esta concentração de fluoreto, ser comprovadamente eficaz contra a doença cárie (12). Em crianças de baixa idade, onde o risco de fluorose afeta dentes primordiais para a aparência estética, as indústrias introduziram no mercado formulações com baixa dosagem de fluoreto para que a ingestão acidental do produto não causasse grandes danos.

Os dentifrícios para uso em bebês, em sua maioria, não apresentam fluoreto, abrasivos ou agentes espumantes em sua composição e os agentes terapêuticos que substituem o fluoreto podem ser a camomila, enzimas, o xilitol, dentre outros. No entanto, pouca evidência científica existe para justificar o emprego destes agentes e pouco se conhece de suas reações adversas nesta faixa etária. Mesmo não possuindo atividade antimicrobiana, podem servir de estímulo para o hábito de manter limpa a cavidade bucal, além disso os agentes flavorizantes fazem com que a sensação de limpar a boca seja sentida de forma agradável pelo bebê (8).

Para crianças com mais de três anos, os cremes dentais devem conter um nível reduzido de fluoreto. Embora sua eficácia não tenha sido totalmente comprovada, trabalhos científicos, *in vitro*, revelam que há atividade antimicrobiana comparável, inclusive ao dentifrício convencional. Ao comparar um dentifrício com dose de 550 ppm e pH reduzido de 5,5 com um convencional (1100 ppm de fluoreto) NEGRI & CURY (10) concluíram que o dentifrício teste era equivalente em quantidade de glóbulos de fluoreto de cálcio (CaF₂) formado sobre o esmalte, com a vantagem de ser seguro contra a fluorose.

PANG & VANN (12) ressaltaram a necessidade de mais evidências acerca da eficácia, bem como das indicações e efeitos adversos dos dentifrícios fluoretados com dosagem reduzida de flúor, tanto *in vitro* como *in vivo*, para que a prescrição destes seja conscienciosa e de acordo com evidências bem comprovadas. Há ainda que se acrescentar que a quantidade do dentifrício a se colocar na escova, para se obter um bom efeito, deve ser ainda estabelecida.

Portanto, devido à escassez de estudos científicos avaliando a eficácia dos cremes dentais infantis com baixa concentração e até mesmo sem flúor, este estudo descritivo teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana, *in vitro*, de três dentifrícios infantis disponíveis no mercado nacional.

Material e Método

• Amostra

Foram usadas amostras de três cremes dentais recomendados para uso infantil, adquiridos no mercado da cidade do Rio de Janeiro. Os componentes contidos nas respectivas formulações, segundo informações dos fabricantes, encontram-se descritos no Quadro I.

• Cultivo Microbiológico

Os microrganismos testados foram: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). A fase laboratorial foi realizada no laboratório de microbiologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).

Quadro I. Componentes contidos nas fórmulas dos cremes dentais avaliados

Nome comercial	Especificações	Componentes	Concentração de fluoreto
Calêndula Kinder® (Welleca S.A., Boulogne, Argentina)	Lote: 30813 Validade: 08/2005 Fabricação: 08/2002	Água, ácido sílico, extrato de calêndula hidroalcoólico, alginato, esclulina, fragrância, óleos essenciais naturais	Sem fluoreto
Colgate Baby® Barney (Colgate-Palmolive, São Paulo-SP, Brasil)	Lote: S# Validade: 09/2006 Fabricação: 22/09/03	Sorbitol, sílica, lauril sulfato de sódio, polietilenoglicol, carbometilcelulosos, sacarina sódica, corante, água	500 ppm fluoreto de sódio
Tandy® (Colgate-Palmolive, São Paulo-SP, Brasil)	Lote: S3-Validade: 09/2006 Fabricação: 24/09/03	Água, sílica, lauril sulfato de sódio, polietilenoglicol, composição aromática, corante, sacarina sódica, sorbitol	1.100 ppm de fluoreto de sódio

As cepas bacterianas foram cultivadas em *Tripticase Soy Ágar* (TSA, Oxid Basingstoke, Hampshire UK) e ressuspensos em solução salina (0,9% NaCl) em turvação correspondente à escala 0,5 de *McFarland*. Foram inoculados nos tubos de ensaio contendo as diluições dos cremes dentais 10 µl das suspensões.

Análise Microbiológica

O método utilizado foi o de Concentração Inibitória Mínima (MIC), que estabelece como resultado a máxima diluição (onde o soluto encontra-se mais diluído) capaz de se observar inibição do crescimento bacteriano. As diluições foram preparadas com o meio *Tripticase Soy Broth* (TSB, Oxoid Basingstoke, Hampshire, UK) a partir do creme dental com volume medido em uma seringa plástica estéril. Diluições foram

preparadas no fluxo laminar, nas proporções de 1:2 a 1:128, somando-se 7 diluições ao todo e homogeneizadas por agitação por 60 segundos no agitador de tubos. Após a inoculação dos microrganismos, as amostras foram para a estufa a 37°C durante 48 h.

A avaliação do crescimento bacteriano foi realizada através do cultivo de alíquotas de 10 µl de cada tubo contendo as diluições, semeadas em placas de petri de 20ml com TSA que, posteriormente, foram levadas à estufa a 37°C por mais 48 horas.

Os resultados foram avaliados a partir da observação das placas de petri contendo as diluições finais, após a incubação. Foram obtidas as Concentrações Inibitórias Mínimas para cada microrganismo em cada creme dental, através da observação da máxima diluição onde não havia crescimento bacteriano detectável.

Resultados

Para o creme dental Welleca® não houve inibição de nenhum dos microrganismos avaliados. O creme dental Colgate Baby® (500 ppm de fluoreto) apresentou concentração inibitória mínima de 1:32 para o microrganismo *E. faecalis*, 1:4 para o *S. aureus*, 1:2 para a *E. coli* e 1:4 para o *S. mutans*. O creme dental Tandy® (1100 ppm de fluoreto) apresentou uma maior taxa de inibição para dois microrganismos (*E. faecalis* e *S. mutans*). As concentrações inibitórias mínimas deste creme dental foram: 1:128 para o microrganismo *E. faecalis*, 1:4 para o *S. aureus*, 1:2 para a *E. coli* e 1:8 para o *S. mutans*. Os resultados encontram-se resumidos no Quadro II.

Quadro II. Concentração Inibitória Mínima dos dentifrícios infantis para os microrganismos testados

Quadro de resultados				
Bactérias	Dentifrícios			
	Welleda®	Colgate Baby®	Tandy®	Controle
<i>E.faecalis</i>	<2	32	128	+
<i>S.aureus</i>	<2	4	4	+
<i>E.coli</i>	<2	2	2	+
<i>S.mutans</i>	<2	4	8	+

<2 = não foi observado efeito antimicrobiano

+ = houve crescimento

Nota: Os números relacionam-se às Concentrações Inibitórias Mínimas, ou seja, às diluições máximas onde foi observado o efeito inibitório de crescimento bacteriano

Discussão

Apesar da importância da validação da atividade antimicrobiana de dentifrícios e enxaguatórios bucais, até o presente momento ainda não foi estabelecida uma metodologia padrão para a avaliação da eficácia de tais produtos. Um método bastante usual consiste na análise da atividade antimicrobiana livre no sobrenadante de suspensões preparadas contendo o dentifício selecionado em água estéril. Além disso, os métodos utilizados para a realização dos testes de atividade antimicrobiana dos cremes dentais *in vitro*, normalmente empregam o teste de difusão em agar através da inoculação de suspensão ou sobrenadante do creme dental em placas de petri (7).

Alguns dentifrícios, em virtude de serem utilizados em superfícies vivas e apresentarem atividade antimicrobiana *in vitro*, podem ser enquadrados no conceito de substâncias anti-sépticas. Apesar de existir uma distinção clara entre agentes desinfetantes e agentes anti-sépticos (os desinfetantes são utilizados em superfícies inanimadas, enquanto os anti-sépticos utilizados em tecidos vivos), alguns agentes químicos podem ser utilizados em ambas as situações (4). Desta forma, os protocolos para a realização de testes de atividade de agentes anti-sépticos são di-

ferentes daqueles empregados para os agentes desinfetantes. Um dos métodos propostos por BRUCH (2) inclui a determinação da MIC do agente antimicrobiano testado, que foi o utilizado neste trabalho (6).

Na realização do teste, optou-se por utilizar o dentifício total diluído no meio de cultura apropriado (suspensão) e, não apenas, o sobrenadante da suspensão deste em água destilada. Através do método utilizado, as propriedades antimicrobianas associadas às partículas são avaliadas, simulando o que ocorre quando do uso dos cremes dentais. Além disso, suspensões apresentam maior atividade antimicrobiana *in vitro* na interface entre a solução aquosa e as partículas insolúveis (1). O teor de flúor dos cremes dentais pode estar associado, também, às partículas insolúveis que podem ser liberadas por alteração do pH ou pela dissolução dos sais de fluoreto de cálcio no meio bucal, durante a escovação dentária (10).

Os microrganismos selecionados para o teste são considerados modelo de microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos, usualmente utilizados para análises com este método, como *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Foi também incluída uma amostra de *Enterococcus faecalis*, por ser este um

microrganismo extremamente resistente ao meio bucal (1). O *E.faecalis*, pode causar monoinfecção dos canais, determinando a necessidade de retratamento do sistema de canais radiculares (15). A atividade antimicrobiana dos cremes dentais também foi analisada sobre uma cepa de *Streptococcus mutans*. A importância da inclusão desta espécie nos testes realizados é decorrente do fato deste microrganismo estar envolvido nos estágios iniciais da doença cárie (5).

Pelo fato dos constituintes dos dentifrícios nas menores diluições apresentarem turvação, amostras de cada diluição foram transferidas para placas de petri.

O resultado do presente trabalho demonstra que o dentifício Welleda®, que contém extrato de calêndula, não apresentou efeito inibitório sobre qualquer dos microrganismos testados (Figura 1). O creme dental Welleda® deve ser indicado, portanto, para adaptação do bebê à higienização e manipulação da cavidade bucal. Destituído de atividade antimicrobiana, o uso deste dentifício poderia favorecer a manutenção da microbiota benéfica.

Os resultados obtidos com dentifrícios contendo fluoreto, em relação à capacidade antimicrobiana destes, apresentaram-se semelhantes para a maioria dos microrganismos analisados. Deve ser destacado que tais dentifrícios apresentam fórmula muito semelhante no que tange os agentes detergentes (Lauril sulfato de sódio), ausente na formulação do Welleda®. O Lauril sulfato de sódio é um derivado do dodecil sulfato de sódio, um detergente capaz de lisar microrganismos Gram-negativos (13) (Figura 2).

Vale destacar ainda que algumas espécies do grupo mutans, incluindo os *S. mutans* e *S. rattus*, são capazes de metabolizar a esculina, que segundo o fabri-

cante seria o adstringente usado no creme dental Welleda®, embora o sabor adocicado deste dentífrico seja conseguido pela combinação de óleos essenciais contidos em sua fórmula (5).

Os cremes dentais Tandy® e Colgate Baby® apresentam como adoçantes o sorbitol e a sacarina sódica, que também são metabolizados em longo prazo por EGM de algumas espécies, como o *rattus* e mutans, o que pode prejudicar o efeito destes dentífricos (5). Com tantos adoçantes não cariogênicos, os fabricantes deveriam escolher um tipo que não fosse metabolizado por bactérias bucais ou que sua metabolização não consistisse vantagem ecológica, como é o caso do xilitol (14).

Os resultados encontrados sobre o creme dental Tandy® em relação ao *S. mutans* (Figura 3) foram semelhantes aos observados por MODESTO, LIMA, UZEDA (7), ou seja, inibição do crescimento microbiano até a concentração 1:8, embora a metodologia empregada (difusão em agar do sobrenadante, avaliando placas bucais de bebês) tenha sido diferente. O presente estudo também evidenciou a atividade antimicrobiana deste creme dental sobre outros microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos (*E.coli*).

O creme dental Tandy® possuía impresso em sua embalagem os dizeres: “Escove os dentes após as refeições.”, “Recomenda-se não ingerir.” e “Manter o produto fora do alcance das crianças menores de 6 anos quando não estiver em uso”. Portanto, embora em local de difícil visualização, o fabricante se preocupou em alertar os usuários sobre o melhor horário de utilização, para que o flúor ingerido seja menos absorvido e quanto à prevenção da ingestão acidental de creme, concordando com as observações de BUZALAF, BASTOS, LAURIS et al. (3).

O dentífrico Colgate Baby® apresenta menor concentração de fluoreto relatada pelo fabricante (500 ppm de NaF). Sua atividade contra o *S. mutans* foi comprovada até a concentração de 1:4 (Figura 4), demonstrando a eficácia deste dentífrico na inibição dos microrganismos testados. Sua menor concentração de flúor pode oferecer maior segurança.

Devido à posologia, os dentífricos de uso freqüente (duas a três vezes ao dia) podem determinar a exposição dos microrganismos aos agentes antimicrobianos, em diferentes momentos e por intervalos de tempo de 5 a 10 minutos. A exposição breve ou por períodos de tempo prolongados de microrganismos a substâncias antimicrobianas determina alterações de superfície com modificação nos perfis de aderência microbiana a uma diversidade de substratos (11).

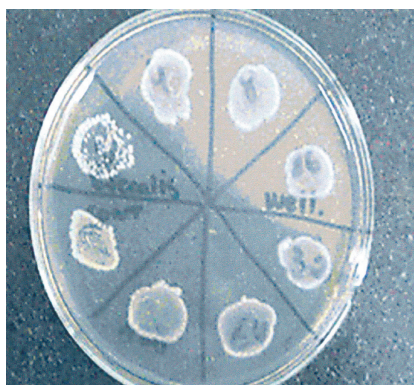


Figura 1. Diluições do creme dental Welleda® para o microrganismo *E. faecalis*

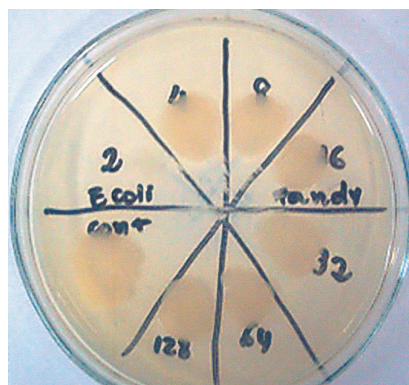


Figura 2. Diluições do creme dental Tandy® em relação a *E.coli*

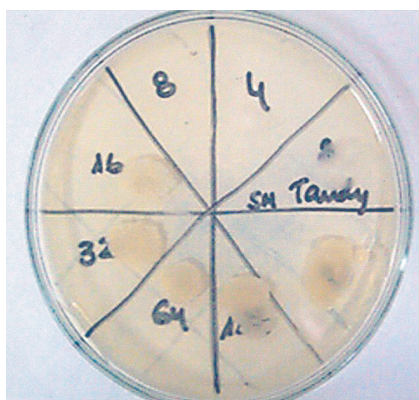


Figura 3. Diluições do creme dental Tandy® em relação ao *S.mutans*

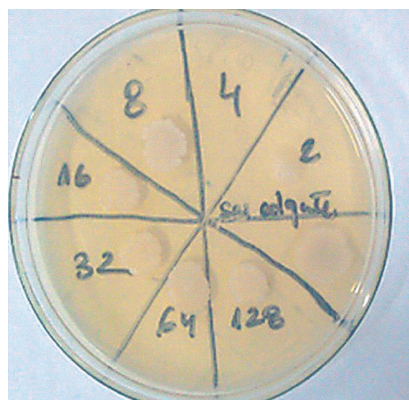


Figura 4. Diluições do creme dental Colgate Baby® em relação ao *S. mutans*

Conclusão

Através da análise dos resultados obtidos, concluiu-se que o creme dental da marca Wellela® não possui atividade antimicrobiana contra os microrganismos avaliados sendo então indicado para bebês sem risco a doença cárie, para a adaptação da manipulação e limpeza da cavidade, mantendo assim a microbiota benéfica.

Por outro lado, o creme den-

tal Colgate Baby® possui boa atividade antimicrobiana contra os patógenos estudados, inclusive os EGM, mostrando eficácia *in vitro*. Este creme dental deveria ser indicados para bebês com risco de cárie e crianças até 7 anos de idade por apresentar reduzido risco para a fluorose.

O creme dental Tandy® possui alta eficácia antimicrobiana em relação aos microrganismos estudados e principalmente ao EGM, podendo ser usado para

crianças maiores de 7 anos e com restrições para as menores.

Mais estudos deveriam ser feitos para atestar a eficácia dos cremes dentais infantis, que na maioria das vezes são estudados como consequência de trabalhos realizados com dentifrícios utilizados para adultos, porém estes estudos não levam em consideração aspectos específicos de crianças, como o risco da fluorose, a composição do dente decíduo e dentes permanentes em erupção.

Recebido em: 18/07/2007

Aprovado em: 05/10/2007

Anna Renata Schneider Barbosa
Rua Santo Afonso, 131/504 - Tijuca
Rio de Janeiro/RJ - CEP.: 20511-170
E-mail: annareschneider@hotmail.com

Referências Bibliográficas

1. BLOCK, S. S. *Disinfection, Sterilization and Preservation*. 4th ed., Pennsylvania: Lea & Febiger, 1991.
2. BRUCH, M. K. In: BLOCK, S. S. *Disinfection, Sterilization and Preservation*. 4th ed., Pennsylvania: Lea & Febiger, 1991, p. 1028-1046.
3. BUZALAF, M. A. R., BASTOS, J. R. M., LAURIS, J. R. P. *et al.* Associação entre o consumo precoce de dentifrício e outras variáveis com fluorose dentária: um estudo transversal retrospectivo. *Rev. Fac. Odontol. Bauru*, v. 10, n. 3, p. 196-200, jul./set., 2002.
4. FAVERO, M. S. In: LENNETTE, E. H., BALOWS A., HAUSLER JR., W. J. *et al. Manual of Clinical Microbiology Sterilization, disinfection and antiseptics in the hospital*. 4th ed., Washington: American Society for Microbiology, 1985, p. 129-137.
5. HOLT, J. G., KRIEG, N. R., SNEITH, P. H. *et al. Bergey's Manual® of determinative bacteriology*. 9th ed., Baltimore, Maryland: Williams & Wilkins, 1994.
6. McBAIN, A. J., BARTOLO, R. G., CATRENICH, C. E. *et al.* Effects of a clorexidine gluconate-containing mouthwash on the vitality and antimicrobial susceptibility of in vitro oral bacterial ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 69, n. 8, p. 4770-4776, Aug., 2003.
7. MODESTO, A., LIMA, K. C., UZEDA, M. Atividade antimicrobiana de três dentifrícios utilizados na higiene oral de bebês: estudo *in vitro*. *Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent.*, v. 55, n. 1, p. 43-48, jan./fev., 2001.
8. MODESTO, A., LIMA, K. C., UZEDA, M. Determinação da atividade antimicrobiana de soluções utilizadas na higiene bucal de bebês. *J. Bras. Odontopediatr. Odontol. Bebê*, v. 6, n. 29, p. 18-23, jan./fev., 2003.
9. MOTTA, L. G., MOTTA, R. G., BASTAZINI, O. Flúor total e pH de dentifrícios do mercado do Rio de Janeiro. *RBO*, v. 59, n. 2, p. 136-138, mar./abr., 2002.
10. NEGRI, H. M. T., CURY, J. A. Efeito dose resposta de uma formulação de dentifrício com concentração reduzida de fluoreto – estudo *in vitro*. *Pesqui. Odontol. Bras.*, v. 16, n. 4, p. 361-365, dez., 2002.
11. NOMURA, S., MURATA, K., NAGAYAMA, A. Effects of sub-minimal inhibitory concentrations of antimicrobial agents on the cell surface of *Klebsiella pneumoniae* and phagocytic killing activity. *J. Chemother.*, v. 7, n. 5, p. 406-413, oct., 1995.
12. PANG, D. T., VANN, W. F. Jr. The use of fluoride containing toothpastes in young children: the scientific evidence for recommending a small quantity. *Pediatr. Dent.*, v. 14, n. 6, p. 384-387, nov./dec., 1992.
13. REES, P., WATSON, J., CUMMING, R. H. *et al.* Effects of heat shock on gram negative bacteria: use of lyses by sodium dodecyl sulphate as a probe for the integrity of DNA. *Bioseparation*, v. 6, n. 2, p. 125-132, Apr., 1996.
14. ROBERTS, M. C., RIEDY, C. A., COLDWELL, S. E. *et al.* How xylitol-containing products affect cariogenic bacteria. *J. Am. Dent. Assoc.*, v. 133, n. 5, p. 435-441, Apr., 2002.
15. SALEH, I. M., RUYTER, I. E., HAAPASALO, M. *et al.* Survival of *Enterococcus faecalis* in infected dentinal tubules after root canal filling with different root canal sealers *in vitro*. *Int. Endod. J.*, v. 37, n. 3, p. 193-198, Mar., 2004.