

A influência do peróxido de carbamida sobre a formação de colônias de estreptococos do grupo mutans

The influence of carbamide peroxide on the formation of colonies of mutans streptococci

Vitor Hugo Silva Nunes

Especialista em Periodontia pela Odontoclínica Central do Exército (OCEX)

Aurimar de Oliveira Andrade

Doutorando em Endodontia da FO/Uerj

Rowan do Vale Vilar

Cirurgião-Dentista

Rudá França Moreira

Especialista em Dentística pela FO/Uerj

Raphael Hirata Jr.

Professor Doutor em Microbiologia e Imunologia pela FCM/Uerj

Antônio Fernando Monnerat

Professor Doutor de Dentística da FO/Uerj

Ricardo Carvalhaes Fraga

Professor Coordenador de Pós-graduação da FO/UFF

RESUMO

Com o desenvolvimento da terapia clareadora, tornou-se necessária uma avaliação acerca da segurança de sua utilização com relação à microbiota oral. Este trabalho teve como objetivo verificar a influência de agentes clareadores contendo diferentes concentrações de peróxido de carbamida sobre a colonização de quatro amostras de estreptococos do grupo mutans. Foram testados os géis clareadores contendo 10%, 15%, 20% e 35% de peróxido de carbamida, além dos controles positivo (clorexidina 0,2%) e negativo (solução salina estéril). A maior parte das amostras apresentou sensibilidade superior se comparados ao controle positivo, sendo a resposta concentração dependente. Concluímos que o peróxido de carbamida modula negativamente a colonização por estreptococos do grupo mutans em todas as concentrações testadas.

Palavras-chave: clareamento; peróxido de carbamida; estreptococos do grupo mutans.

ABSTRACT

Due to the development of bleaching therapy, the evaluation about the safety of its activity on the oral microbiota became necessary. This study aimed to test the effect of bleaching agents containing different concentrations of carbamide peroxide on the colonization of four strains of mutans streptococci. It was tested the bleaching gels containing 10%, 15%, 20% and 35% carbamide peroxide, in addition to the positive control (chlorhexidine 0,2%) and negative control (sterile saline solution). Most of the samples showed higher sensibility compared to the positive control, being the answer concentration dependent. We conclude that the carbamide peroxide makes a bad regulation the colonization by mutans streptococci at all concentrations tested.

Keywords: bleaching; carbamide peroxide; mutans streptococci.

Introdução

A utilização da terapia clareadora encontra-se cada vez mais difundida na prática odontológica, desde quando foi descrita em 1989 (1). No entanto, quase que concomitantemente surgiram as preocupações acerca dos efeitos biológicos de seu uso. Questionamentos devido ao potencial efeito carcinogênico e a capacidade de injúrias aos tecidos mineralizados e moles foram levantadas (2). Diversos autores afirmaram que a técnica é segura desde que utilizada corretamente e realizada sob a supervisão de um profissional da Odontologia (2, 3). A terapia clareadora consiste em utilização tópica, sobre o dente, de um agente oxidante (peróxido de carbamida ou de hidrogênio) capaz de quebrar macromoléculas que pigmentam o mesmo. De uma maneira geral a concentração utilizada desses agentes depende da técnica empregada. Quando o gel é aplicado diariamente com auxílio de moldeiras individuais, os géis mais utilizados contêm peróxido de carbamida com concentrações entre 10 e 22%, ou peróxido de hidrogênio apresentando concentrações entre 5 e 11%. Quando a técnica de consultório é empregada, as concentrações mais utilizadas são de 35 e 37% de peróxido de carbamida (4).

É importante ressaltar também que os Estreptococos do Grupo Mutans (EGM) são capazes de constituir, associados a outros micro-organismos, 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 dos tecidos dentários induzida pelo ácido produzido por biofilmes, onde ocorre o predomínio de EGM e quando são fornecidas as condições apropriadas (5).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana de agentes clareadores contendo peróxido de carbamida em diferentes concentrações frente a amostras diversas de Estreptococos do Grupo Mutans.

Material e Método

Cepas Bacterianas e Condições de Cultivo

Para a realização dos ensaios foram utilizadas quatro cepas de estreptococos do grupo mutans: *S. mutans* ATCC 25175 e os isolados clínicos *S. mutans* GB1, *S. mutans* FB1 e *S. sobrinus* AR1. As amostras foram mantidas congeladas a -20°C na bacterioteca da Disciplina de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Ciências Médicas/Uerj. Durante os ensaios as amostras bacterianas foram cultivadas em meio Agar Soja Trypticaseína (TSA, Difco Laboratories, Detroit, MI) a 37°C/24h em capnofilia e estocados sob refrigeração (-10°C). Para a realização dos ensaios, as amostras bacterianas foram cultivadas em meio líquido (caldo) soja trypticaseína (TSB, Difco) 37°C/24h.

Preparo do Inóculo Bacteriano

Para a realização dos ensaios, o crescimento recente (37°C/24h) foi diluído em caldo TSB para a obtenção de uma turvação correspondente ao padrão 0,5 da escala nefelométrica de McFarland. Este inóculo foi utilizado para a

semeadura na superfície das placas para a realização do ensaio de difusão em Agar.

Realização dos Ensaio

Os ensaios foram realizados em placas de Petri contendo Agar TSA (Difco). Micro-organismos diluídos em turvação correspondente ao padrão 0,5 da escala de McFarland foram semeados em confluência na superfície das placas de Agar, com auxílio de um *swab* estéril. Em seguida, poços de 4 mm de diâmetro foram preparados com auxílio de cilindros estéreis, os quais foram preenchidos com 20 µL dos clareadores em concentrações diferentes. Foram utilizados clareadores contendo diferentes concentrações de peróxido de carbamida variando 10% a 35%: Opalescence (contendo de 10%, 15 e 20% de peróxido de carbamida, Ultradent, SP-Brasil) e White Gold (35%, Dentisply, RJ-Brasil). Após o preenchimento dos orifícios, as placas foram mantidas em ambiente de capnofilia (técnica da jarra fechada com a vela acesa no interior) e incubadas por 48 horas a 37°C. As zonas de inibição bacteriana foram mensuradas com auxílio de uma régua milimetrada rígida. O controle positivo consistiu de gel de clorexidina a 0,2% (Peroxidin, Gross), enquanto o controle negativo consistiu de poços contendo solução salina estéril (Figura 1). Cada formulação de clareador foi testada em triplicata e os valores dos diâmetros dos halos de inibição tratados estatisticamente utilizando-se de teste t de Student para as análises paramétricas e Anova para análises de variância através do programa GraphPad Prism (versão 5.0).

Resultados

A análise dos valores dos halos de inibição (Tabela I) demonstrou inibição de todas as amostras de estreptococos do grupo mutans, mostrando a sensibilidade desta espécie aos componentes dos clareadores. Além disso, foi observado um aumento da sensibilidade das amostras, dependente da concentração do peróxido de carbamida. A análise dos valores dos halos de inibição mostrou-se significativa para cada amostra quando variada a concentração do peróxido de carbamida (teste t com $P < 0,05$), excetuando-se os valores para a cepa *S. mutans* ATCC 25175 quando submetidas às concentrações de 10% e 15% do agente químico (teste t, $P = 0,0688$). Para todas as outras situações o peróxido de carbamida a 35% mostrou o maior perfil inibitório para cada amostra bacteriana (teste t, $P < 0,01$). Quando comparados ao controle positivo (clorexidina gel 0,2%) a maior parte das amostras apresentaram halos de inibição superiores.

Tabela I. Média e desvio padrão dos diâmetros das zonas de inibição gerados pelos diferentes clareadores, contendo concentrações diversas de peróxido de carbamida, sobre estreptococos do grupo mutans

| | CHX1 0,2% | Op ² 10 | Op ² 15 | Op ² 20 | WG3 35 |
|------|--------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------|
| ATCC | 20.33 ± 0.33 | 18.00 ± 0.58 | 16.33 ± 0.33 | 21.33 ± 0.67 | 43.00 ± 0.58 |
| FB1 | 17.00 ± 0.57 | 23.67 ± 0.33 | 27.33 ± 0.33 | 29.67 ± 0.33 | 36.00 ± 0.57 |
| GB1 | 17.00 ± 0.57 | 15.67 ± 0.33 | 23.00 ± 0.57 | 22.67 ± 0.33 | 36.00 ± 0.58 |
| AR1 | 18.00 ± 0.57 | 17.67 ± 0.33 | 19.33 ± 0.33 | 25.00 ± 0.58 | 37.33 ± 0.67 |

¹CHX- gel de clorexidina a 0,2%; ²Op- Opalescence; ³WG- White Gold

Foram observadas variações na sensibilidade das amostras de estreptococos do grupo mutans, oriundas de indivíduos diferentes, ao peróxido de carbamida, em especial quando utilizadas baixas concentrações do agente químico. A análise de variância (Anova acompanhado do teste de Tukey) demonstrou que, a exceção da comparação entre as amostras ATCC25175 e AR1 ($P > 0,05$), os halos de inibição apresentaram diferenças estatísticas ($P < 0,05$) quando utilizados os valores gerados pela formulação contendo peróxido de carbamida a 10%. Os valores foram ainda mais significativos quando da análise dos halos apresentados pelas cepas de estreptococos do grupo mutans com gel de peróxido de carbamida a 15% ($P < 0,05$ para todas as amostras). Ao passo que ocorre o aumento do peróxido de carbamida nas formulações, ocorre tendência a uniformidade da sensibilidade entre as amostras. Quando da utilização da formulação contendo peróxido de carbamida a 35%, a amostra mais sensível foi *S. mutans* ATCC 25175 ($P < 0,001$). Os halos apresentados pelas outras amostras não mostraram diferenças estatisticamente significativas. Tal resultado reforça que ocorrem variações na sensibilidade das amostras que colonizam indivíduos diferentes, e que o uso constante de agentes clareadores poderia modular o processo de colonização dos sítios orais por amostras de *S. mutans* e *S. sobrinus*.

Discussão

Estudos *in vitro* constataram que os peróxidos de carbamida e de hidrogênio possuem potente efeito antimicrobiano, frente a algumas espécies presentes na cavidade oral (6). Esses resultados, que coadunam com os obtidos no presente trabalho. Estudos *in vivo* demonstram que diversos aspectos da saúde bucal parecem melhorar quando utilizado soluções contendo peróxidos como elemento de controle químico do biofilme (7, 8, 9, 10). Os mesmos demonstram também que o uso do peróxido de hidrogênio (produto final do peróxido de carbamida) como agente antimicrobiano, assim como evidenciado

neste trabalho, precede ao seu uso como agente clareador (2, 7, 8, 9, 10).

No entanto, a utilização do peróxido de carbamida parece não alterar a contagem total de micro-organismos e a contagem de EGM dos indivíduos (5) Esse hiato entre resultados *in vitro* e *in vivo* ocorre devido à estrutura do biofilme, que demonstra ser uma unidade de colonização muito complexa capaz de conferir resistência à aplicação tópica de diversos elementos que possuem ação antimicrobiana quando utilizados sobre culturas planctônicas (11). Outro fator que pode explicar tal diferença é o efeito dos agentes clareados na superfície do esmalte (12, 13, 14, 15, 16). Mesmo que estes trabalhos não sejam conclusivos acerca do efeito do clareamento na lisura do esmalte, principalmente devido a diferenças com relação às metodologias empregadas, os mesmos parecem convergir no que tange ao aumento da colonização por *S. Muttans* à superfície do esmalte (12, 13, 14). GURSOY *et al.* (13) propuseram inclusive que alterações na superfície de esmalte eram capazes de alterar o acúmulo de placa em dentes clareados. Em 2003, HOSOYA *et al.* (12) demonstraram que o clareamento vital aumenta a rugosidade do esmalte. Não obstante, os trabalhos parecem convergir no que diz respeito ao aumento da adesão das colônias de EGM à superfície do esmalte (12, 14). Esses estudos, contudo, avaliaram a mesma posteriormente ao clareamento realizado, sem que houvesse, no entanto, a interferência dos géis diretamente sobre a colonização, diferentemente do que ocorre na cavidade oral durante o clareamento. Como visto em nosso trabalho, o peróxido de carbamida, em todas as concentrações comercialmente disponíveis, modula negativamente a colonização por estreptococos do grupo mutans. No trabalho de GURSOY *et al.* (13), o aumento do acúmulo de placa foi percebido apenas cinco dias após a terapia clareadora, que utilizava gel contendo 35% de peróxido de carbamida. Nos três primeiros dias, no entanto, foi observado um menor acúmulo de placa nos grupo clareado do que no grupo controle (13). É necessário lembrar que na observância da técnica preconizada em literatura, devemos realizar um polimento, logo após o término do clareamento, o que não foi observado em nenhum dos trabalhos supracitados (12, 13, 14).

No entanto, em um estudo *in vitro*, foi avaliada a atividade antimicrobiana de diferentes tipos de gel de clareamento contendo peróxido de carbamida em diferentes concentrações, sobre seis diferentes patógenos presentes na cavidade oral, dentre os quais o *S. muttans* (6). Nesse trabalho, foram encontrados halos de inibição tão grandes ou maiores que o controle contendo clorexidina a 0,2%, sugerindo uma grande atividade antimicrobiana destes géis, principalmente sobre as colônias de *S. muttans* que apresentaram os maiores halos inibitórios, indo ao encontro dos resultados obtidos no presente estudo. Vale ressaltar, que ambos os estudos avaliam a atividade do peróxido de carbamida sobre colônias não inseridas dentro do biofilme dentário.

Em 2007, foi realizada uma avaliação *ex vivo* da influ-

ência do clareamento no aparecimento de lesões similares a lesões cariosas em terceiros molares recém-extraídos (4). Os elementos dentários foram expostos a um grande desafio cariogênico, após serem submetidos a diversas técnicas de clareamento. O trabalho concluiu que o clareamento de consultório não teve grande influência no aparecimento de lesões cariosas. O clareamento caseiro, no entanto, modulou negativamente o aparecimento dessas lesões, levando os a concluir que o este diminuía susceptibilidade do elemento dentário ao aparecimento de lesões cariosas (4).

Por fim, um estudo clínico avaliou o efeito da terapia clareadora sobre a microbiota oral (5). Os pacientes foram separados em quatro grupos: no primeiro foi realizado clareamento caseiro com peróxido de carbamida a 10%, num segundo grupo foi realizado o clareamento em consultório, num terceiro grupo foi realizado clareamento combinado e, por fim, um quarto grupo recebeu clareamento combinado com gel de placebo. As amostras de saliva para contagem foram colhidas logo antes e imediatamente depois do clareamento, 12 horas depois e por fim 15 dias depois. Não houve alteração na contagem total de micro-organismos e na contagem de EGM. O trabalho concluiu que nenhum gel de clareamento disponível poderia reduzir a microbiota oral (5). Com relação a alterações do pH salivar, um outro trabalho avaliou o efeito do clareamento utilizando peróxido de carbamida a 10% e observou que o pH encontrado aumentou, após os 15 minutos iniciais de clareamento, mantendo-se no mesmo patamar por todas as duas horas de experimento (17), revelando não haver nenhuma tendência à desmineralização devido a alteração de pH. A atividade antimicrobiana do peróxido de carbamida encontrada pelos presentes autores parece ter menor influência do que quando a colonização se dá por meio de biofilme, como encontrado na cavidade oral (5), sendo necessários mais estudos para ratificar tais achados.



Figura 1. Grupos testados: controle positivo - clorexidina 0,2% (Peroxidin, Gross); grupos de teste - peróxido de carbamida - 10%, 15%, 20% (Opalescence, Ultradent, SP-Brasil) e 35% (White Gold, Dentisply, RJ-Brasil). O controle negativo utilizado foi uma solução salina estéril

Conclusão

O presente trabalho explicita a existência de atividade antimicrobiana dos géis clareadores sobre diferentes espécimes dos EGM e que essa é diretamente proporcional a concentração utilizada. Contudo, mais estudos clínicos e laboratoriais se fazem necessários para que possamos compreender mais claramente o papel modulador da terapia clareadora sobre a colonização de EGM na cavidade oral. 

Referências Bibliográficas

1. HAYWOOD, V. B., HEYMANN, H. O. Nightguard vital bleaching. *Quintessence Int.* 1989; 20 (3): 173-6.
2. HAYWOOD, V. B., HEYMANN, H. O. Nightguard vital bleaching: how safe is it? *Quintessence Int.* 1991; 22 (7): 515-23.
3. WALSH, L. J. Safety issues relating to the use of hydrogen peroxide in dentistry. *Aust Dent. J.* 2000; 45 (4): 257-69.
4. ALVES, E. A., ALVES, F. K., CAMPOS, E. J. *et al.* Susceptibility to carieslike lesions after dental bleaching with different techniques. *Quintessence Int.* 2007; 38 (7): e404-9.
5. FRANZ-MONTAN, M., RAMACCIATO, J. C., RODRIGUES, J. A. *et al.* The effect of combined bleaching techniques on oral microbiota. *Indian. J. Dent. Res.* 2009; 20 (3): 304-7.
6. NAPIMOGA, M. H., DE OLIVEIRA, R., REIS, A. F. *et al.* In vitro antimicrobial activity of peroxide-based bleaching agents. *Quintessence Int.* 2007; 38 (6): e329-33.
7. ZINNER, D. D., DUANY, L. F., CHILTON, N. W. Controlled study of the clinical effectiveness of a new oxygen gel on plaque, oral debris and gingival inflammation. *Pharmacol Ther Dent* 1970; 1: 7-15, apud HAYWOOD, V. B., HEYMANN, H. O. Nightguard vital bleaching: how safe is it? *Quintessence Int.* 1991; 22 (7): 515-23.
8. SHAPIRO, W. B., KASLICK, R. S. Chasens AI, *et al.* The influence of urea peroxide gel on plaque, calculus and chronic gingival inflammation. *J. Periodontol.* 1973; 44: 636-39. Apud HAYWOOD, V. B., HEYMANN, H. O. Nightguard vital bleaching: how safe is it? *Quintessence Int.* 1991; 22 (7): 515-23.
9. SHIPMAN, B., COHEN, E., KASLICK, R. S. The effect of a urea peroxide gel on plaque deposits and gingival status. *Periodontol.* 1971; 42: 283-5. Apud HAYWOOD, V. B., HEYMANN, H. O. Nightguard vital bleaching: how safe is it? *Quintessence Int.* 1991; 22 (7): 515-23.
10. FOGEL, M. S., MAGILL, J. M. Use of an antiseptic agent in orthodontichygiene. *Dent Survey.* 1971; 50-54. Apud HAYWOOD, V. B., HEYMANN, H. O. Nightguard vital bleaching: how safe is it? *Quintessence Int.* 1991; 22 (7): 515-23.
11. MARSH, P. D. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology.* 2003; 149: 279-94.
12. HOSOYA, N., HONDA, K., IINO, F. *et al.* Changes in enamel surface roughness and adhesion of *Streptococcus mutans* to enamel after vital bleaching. *J. Dent.* 2003; 31 (8): 543-8.
13. GURSOY, U. K., EREN, D. I., BEKTAS, O. O. *et al.* Effect of external tooth bleaching on dental plaque accumulation and tooth discoloration. *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal.* 2008; 13 (4): e266-9.
14. GÜRGAN, S., BOLAY, S., ALAÇAM, R. In vitro adherence of bacteria to bleached or unbleached enamel surfaces. *J. Oral Rehabil.* 1997; 24 (8): 624-7.
15. HAYWOOD, V. B., LEECH, T., HEYMANN, H. O. *et al.* K. Nightguard vital bleaching: effects on enamel surface texture and diffusion. *Quintessence Int.* 1990; 21 (10): 801-4.
16. PRETTY, I. A., EDGAR, W. M., HIGHAM, S. M. The effect of bleaching on enamel susceptibility to acid erosion and demineralization. *Br. Dent. J.* 2005; 198: 285-90.
17. LEONARD, R. H., Jr., BENTLEY, C. D., HAYWOOD, V. B. Salivary pH changes during 10% carbamide peroxide bleaching. *Quintessence Int.* 1994; 25 (8): 547-50.

Recebido em: 22/02/2011 / Aprovado em: 05/05/2011

Vítor Hugo S. Nunes

Av. Vicente de Carvalho, 1117/201

Vila da Penha/RJ, Brasil - CEP 21210-003

E-mail: vitornunes136@hotmail.com