Avaliação da Atividade Antimicrobiana de Dentifrícios Infantis: Estudo *In Vitro*

Antimicrobial Activity Of Dentifrices Used In Children's Oral Hygiene: In Vitro Study

SOUZA-GUGELMIN, Maria Cristina Monteiro de*
SILVA, Francisco Wanderley Garcia de Paula e**
QUEIROZ, Alexandra Mussolino de***
AMARAL, Thais Helena Andreolli do**

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a ação antimicrobiana de diferentes dentifrícios utilizados na higiene bucal infantil frente a 16 cepas de *S. mutans* isoladas da saliva de crianças. Os dentifrícios foram classificados quanto à presença/ concentração de flúor e associação ou não a produtos naturais em: A- fluoreto de sódio- 1100 ppm; B- fluoreto de sódio- 1000 ppm e própolis; C- fluoreto de sódio- 500 ppm; D- fluoreto de sódio 500 ppm e extrato de malva; E- monofluorofosfato de sódio- 0,76%; F- monofluorofosfato de sódio- 1000 ppm; G- aloe-vera/ própolis/ complexo cobre-clorofila. A atividade antimicrobiana foi avaliada pelo método da difusão em Agar (técnica do disco). Após o preparo da suspensão microbiana no padrão 0,5 da escala de McFarland e semeadura por inundação, 20 µl do sobrenadante de cada dentifrício foram pipetados em discos de papel e aplicados sobre o meio de cultura BHIA. Os halos de inibição ao redor dos discos foram medidos e os valores analisados pelo teste de Quade. Os dentifrícios A, B e G inibiram 100% das cepas, revelando ação antimicrobiana significativamente maior que os demais dentifrícios avaliados ($p < 0,05$). O dentifrício E (44%) não diferiu significativamente dos dentifrícios C (69%) e D (56%), que por sua vez mostraram ação antimicrobiana significativamente menor que o dentifrício F (87%).

PALAVRAS-CHAVE:

Dentifrícios. Crianças. Atividade antimicrobiana. *S. Mutans*.

INTRODUÇÃO

O principal método de remoção do biofilme dental é a escovação. Entretanto, frente ao conhecimento das limitações dos métodos mecânicos de higiene bucal, pesquisas têm sido realizadas para avaliar a importância dos agentes químicos no controle do biofilme (MODESTO *et al.*, 2001). Essas substâncias podem agir de diferentes formas na microbiota, interferindo na adesão bacteriana à superfície dental por meio de agentes anti-adesivos ou na síntese de polissacarídeo extra-celular (PEC) (IKENO *et al.*, 1991; ADDY *et al.*, 1992).

Dentre os agentes químicos para higienização bucal estão os dentifrícios, considerados os principais agentes químicos de auxílio na remoção do biofilme. Esses produtos apresentam ainda as funções de remover manchas dos dentes, fornecer sensação de frescor e limpeza e servir como veículo para agentes terapêuticos (FEJERSKOV; KIDD, 2005).

Existem disponíveis no mercado diversos tipos de dentifrícios, que diferem tanto no seu modo de apresentação como na sua composição. Os fabricantes oferecem muitas opções, algumas com o objetivo específico

de estimular a criança a escovar os dentes. Existem dentifrícios com cores, listras, brilhos, os que fazem espuma ou não e os com ou sem sabor e fluoretados ou não (MOSS, 1993).

Contudo, existem poucos trabalhos que avaliam a atividade antimicrobiana de dentifrícios rotineiramente utilizados por crianças frente a cepas de *Streptococcus mutans*. Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana de dentifrícios infantis frente a cepas isoladas de *S. mutans* de crianças de 3 a 12 anos.

MATERIAL E MÉTODO

A partir de 16 cepas de *Streptococcus mutans* isoladas da saliva de 16 crianças atendidas na clínica de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo foram realizados os testes de sensibilidade frente a diferentes dentifrícios. Foram selecionados para a pesquisa crianças na faixa etária de 3 a 12 anos, sem discriminação de raça ou sexo, que livremente concordaram em participar da pesquisa (processo nº11 - CEP/FCFRP-USP). Para inclusão na pesquisa, os responsáveis pelas crianças assinaram um

termo de consentimento livre e esclarecido sobre a participação do menor, conforme estabelecido pela Portaria 196/96.

A identificação perfunctória das colônias de *Streptococcus mutans* foi realizada observando-se as características morfológicas das colônias, de acordo com Davey e Rogers (1984) e Azevedo (1988), como a seguir:

- Colônias cor branca-acinzentadas ou creme-amareladas, superfície granular, semelhante a vidro moído, com aspecto fragmentado a partir do centro; podendo apresentar ou não gotícula cintilante de polissacarídeo extracelular no topo. Tais colônias, algumas vezes mucóides, são, geralmente duras, esmigalhando-se quando tocadas com agulha de platina. Podem apresentar-se circundadas por um halo incolor, visível a olho nu.

- Colônias firmes, opacas, que não se desintegram, quando tocadas com agulha de platina, sendo, portanto, deslocadas facilmente. Apresentam com frequência, gotícula cintilante de polissacarídeo no topo. São circundadas por um halo branco leitoso, visível a olho nu.

A avaliação da atividade antimicrobiana de dentifrícios foi realizada pela técnica de

* Professora Doutora da Disciplina de Microbiologia do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

** Alunos do Curso de Pós-Graduação em Odontopediatria do Departamento de Clínica Infantil, Odontologia Preventiva e Social da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

*** Professora Assistente da Disciplina de Odontopediatria do Departamento de Clínica Infantil, Odontologia Preventiva e Social da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

difusão em ágar pelo sistema do disco (Método de Kirby & Bauer) em duplicata. Para a realização dos testes, as cepas de *Streptococcus mutans* mantidas em Tioglicolato sem Dextrose e sem Indicador- Difco (TIO'S-Difco) e sangue foram descongeladas, e transferidos 50 µL destas, para um tubo de ensaio contendo Tioglicolato sem Dextrose e sem Indicador- Difco (TIO'S-Difco). Estes inóculos foram incubados a 37°C por 48 horas. Após observado o crescimento da cepa, 0,5 mL do inóculo foi transferido para um tubo de ensaio contendo 5,0 mL de Brain Heart Infusion-Difco (BHI-Difco), e incubado a 37°C por 24 horas. Decorrido este período, realizou-se a suspensão do inóculo em solução fisiológica esterilizada correspondente ao padrão 0,5 da escala de MacFarland. A semeadura foi realizada pela técnica de inundação (3,0 mL da suspensão padronizada) em placas de Petri contendo 40,0 mL de Brain Heart Infusion Ágar- Difco (BHIa-Difco) em um único dia. Após a secagem das placas, foram aplicados sobre estas, 7 discos de papel, embebidos com 20 µL dos dentifrícios descritos na Tabela 1.

Tabela 1- Componentes antimicrobianos dos dentifrícios avaliados

Componente antimicrobiano	
A	Fluoreto de Sódio (1100 ppm)
B	Fluoreto de Sódio (1000 ppm) e Extrato de Própolis
C	Fluoreto de Sódio (500 ppm)
D	Extrato de Malva, Fluoreto de Sódio (500 ppm) e Xilitol
E	Xilitol e Monofluorofosfato de sódio (0,76%)
F	Monofluorofosfato de Sódio (1000 ppm)
G	Aloe Vera, Própolis e Complexo de Cobre-clorofila

Para uma melhor padronização da quantidade de dentifrício aplicada aos discos, cada dentifrício foi pesado (3,0 g) e diluído em 3,0 mL de água destilada esterilizada, homogeneizado por 5 minutos em agitador mecânico (Mixer-Toptronix, Brasil) e centrifugado (centrífuga Excelsa Baby - Fanen, Brasil) a 4.000 rpm por 15 minutos.

As placas foram mantidas à temperatura ambiente, para a difusão do dentifrício por 2 horas, e depois foram incubadas em microaerofilia a 37°C por 24 horas. A leitura e a interpretação dos resultados foram realizadas considerando a frequência e o tamanho dos halos de inibição do crescimento bacteriano ao redor dos discos. A comparação da média dos diâmetros dos halos de inibição (em mm) entre os 7 dentifrícios testados foi realizada empregando-se o teste estatístico de Quade, ao nível de significância de 5%,

utilizando-se o software GMC 8.0 (MAIA-CAMPOS, 2006).

RESULTADOS

Os dentifrícios **A, B e G** inibiram 100% das cepas, revelando ação antimicrobiana significativamente maior que os demais dentifrícios avaliados (Tabela 2). Com relação à medida dos halos de inibição bacteriana, os dentifrícios **A, B e G** não diferiram significativamente entre si ($p > 0,05$), no entanto, apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação aos dentifrícios **C, D e E**. Em relação ao dentifrício **F**, verificou-se diferença estatística quando comparado aos dentifrícios **A e G** ($p < 0,05$). O dentifrício **E** não apresentou halos de inibição estatisticamente diferentes dos mostrados pelos dentifrícios **C e D** ($p > 0,05$), que por sua vez mostraram ação antimicrobiana significativamente maior que o dentifrício **F** ($p < 0,05$) (Tabela 3).

DISCUSSÃO

Diversos dentifrícios indicados para a higiene bucal de bebês e crianças estão disponíveis no mercado nacional, entretanto os profissionais não conhecem o efeito desses produtos sobre os microrganismos cariogênicos. Embora este trabalho apresente algumas limitações, por ser um estudo *in vitro*, como a concentração de dentifrício presente no disco uso para o teste do halo de inibição ser consistentemente maior que aquela atingida na cavidade bucal e, ainda que na cavidade bucal esse dentifrício será diluído pela ação da saliva, acreditamos ser importante avaliar se isoladamente esses dentifrícios apresentam alguma ação antimicrobiana. Dessa maneira, propusemos este trabalho com o objetivo de avaliar as propriedades antimicrobianas de alguns dentifrícios que, segundo os fabricantes, possuem componentes benéficos na prevenção e controle da doença cárie.

A escolha do *S. mutans* como microrganismo contra os quais foram testados os diferentes dentifrícios baseou-se no fato desses microrganismos serem considerados os agentes etiológicos primários da cárie dental, uma doença bucal de alta prevalência (HAMADA; SLADE, 1980; LEE *et al.*, 2004).

Os dentifrícios com menor conteúdo de flúor são indicados para a higiene bucal de crianças (MODESTO *et al.*, 2001). Entretanto, nesse estudo, o menor conteúdo de flúor pareceu ser o responsável pela menor atividade antimicrobiana dos dentifrícios infantis.

Os dentifrícios contendo fluoreto de sódio a 1000 ppm (A e B) apresentaram ação antimicrobiana significativamente maior que os demais dentifrícios avaliados, inibindo 100% das cepas de *S. mutans*. O fluoreto é

Tabela 2 - Determinação da incidência de ação antimicrobiana de diferentes dentifrícios frente a cepas de Streptococcus mutans.

Dentifrícios	Frequência	%
A	16	100
B	16	100
C	11	69
D	9	56
E	7	44
F	14	87
G	16	100

Tabela 3 - Média do diâmetro dos halos de inibição do crescimento microbiano (mm), medidos após a ação dos diferentes dentifrícios infantis frente a 16 cepas de Streptococcus mutans, isoladas da saliva de crianças.

Amostras	Dentifrícios						
	A	B	C	D	E	F	G
1	14	16	0	0	10	10	23
2	14	45	0	0	0	25	32
3	15	30	15	0	0	18	16
4	40	22	12	14	10	25	15
5	36	32	9	0	0	10	30
6	38	45	15	0	0	38	40
7	32	24	9	10	10	9	24
8	27	30	0	10	12	0	34
9	40	41	12	10	12	12	35
10	16	15	10	11	12	0	29
11	34	44	14	0	0	14	33
12	30	24	12	0	0	30	24
13	21	32	10	12	0	10	30
14	22	35	10	12	12	13	26
15	34	35	0	0	0	18	27
16	23	17	0	12	0	15	18

um agente antimicrobiano que atua como inibidor de diversas enzimas bacterianas responsáveis pela metabolização de açúcares (PRESTON, 1998). Modesto *et al.* (2001) indicam esses dentifrícios para crianças de alto risco à cárie e para aquelas com atividade cariogênica presente.

Concordamos com Manso-Júnior *et al.* (2002), que observaram que os dentifrícios que contém fluoreto apresentam atividade antimicrobiana aumentada em relação aos que não contém. Os dentifrícios contendo fluoreto de sódio (A e B) também apresentaram ação antimicrobiana significativamente maior que aqueles que continham monofluorofosfato de sódio (E e F).

Os dentifrícios contendo própolis, associado ao flúor (B) ou não (G) apresentaram ação antimicrobiana significativamente maior que os demais. Em 1991, Ikeno *et al.*

demonstraram que a própolis apresentava ação antimicrobiana sobre *S. mutans*, por meio da inibição da formação de glicanos insolúveis a partir da sacarose. Concordamos com Komiyama *et al.* (2004) que observaram em seu estudo que os dentifrícios que contém própolis apresentam boa atividade antimicrobiana em relação aos demais dentifrícios sem própolis, sugerindo ainda, que tal substância esteja relacionada ao aumento da atividade antimicrobiana dos dentifrícios testados.

Os produtos odontológicos que contém substâncias naturais apresentam boas perspectivas no mercado, devido à aceitação popular da fitoterapia, porém só devem ser introduzidos após a comprovação científica de sua eficácia, por meio de estudos laboratoriais e clínicos específicos (GEBARA *et al.*, 1996; LEE *et al.*, 2004). Gebara *et al.* (1996) demonstraram que a tintura de própolis foi efetiva na inibição de *S. mutans*, ao passo que o malva não apresentou atividade antimicrobiana. Em nosso estudo, o dentifrício contendo malva (D) também apresentou baixa atividade antimicrobiana.

Como observado no estudo de Lee *et al.* (2004), os dentifrícios contendo extratos naturais apresentaram diferente capacidade de inibir o crescimento de *S. mutans*. Por um lado, a própolis apresentou alta atividade antimicrobiana (G), enquanto a malva apresentou baixa atividade antimicrobiana (D).

Com relação ao xilitol, por exemplo, apresenta um efeito inibidor sobre *S. mutans* e tem sido incorporado a dentifrícios disponíveis no comércio. Sintes *et al.* (1995) demonstrou que a utilização de um dentifrício contendo xilitol foi capaz de reduzir o índice de cárie em crianças de 8 a 10 anos quando comparado com crianças que não fizeram uso desse dentifrício. Entretanto, Petersson *et al.* (1991) não observaram diferença quando compararam dentifrícios com xilitol e aqueles com monofluorofosfato de sódio e fluoreto de sódio. No nosso estudo os dentifrícios com xilitol (D e E) não apresentaram atividade antimicrobiana significativamente maior que os outros dentifrícios. Concordamos com Fejerskov, Kidd (2005) quando afirmam que o uso de xilitol como agente anti-cárie ainda não é justificado, uma vez que as evidências existentes ainda não são suficientes para comprovar seus efeitos anticariogênicos.

CONCLUSÃO

Os dentifrícios A, B e G apresentaram maior atividade antimicrobiana que o dentifrício F que se mostrou superior aos dentifrícios C, D e E.

ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate the antimicrobial activity of different dentifrices used in children's oral hygiene against 16 *S. mutans* strains isolated from children's saliva. The dentifrices were categorized according to the presence/concentration of fluoride and the addition or not of natural products in their compositions, as follows: A - sodium fluoride- 1100 ppm; B- sodium fluoride- 1100 ppm and propolis; C- sodium fluoride- 500 ppm; D- sodium fluoride- 500 ppm and mallow extract; E- 0.76% sodium monofluorophosphate; F- sodium monofluorophosphate -1000 ppm; G- aloe-vera/ propolis/ copper-chlorophyll complex. The antimicrobial activity was evaluated using the agar diffusion method (disc technique). After preparation of the microbial suspension according to the 0.5 density of McFarland scale and seeding, 20 µL of supernatant of each dentifrice were pipetted in paper discs and taken to a BHIA culture medium. The inhibition halos surrounding the discs were measured and the values were analyzed statistically using the Quade test. Dentifrices A, B and G inhibited 100% of the strains, denoting a significantly higher antimicrobial activity than the other dentifrices evaluated ($p < 0.05$). Dentifrice E (44%) did not differ statistically from dentifrices C (69%) and D (56%), which, in turn, had significantly lower antimicrobial activity than dentifrice F (87%).

KEYWORDS:

Dentifrice. Children. Antimicrobial activity. *S. mutans*.

REFERÊNCIAS

ADDY, M.; SLAYNE, M.A.; WADE, W.G. The Formation and Control of Dental Plaque - an Overview. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 73, no.4, p.269-278, 1992.

AZEVEDO, R.V.P. **O Emprego da Bacteriocinotipagem (Mutacinotipagem) no Rastreamento Epidemiológico de Estreptococos do Grupo Mutans**. 1998. 110f. Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Biomédicas da USP, São Paulo.

CURY, J.A. Dentifrícios: Como Escolher e Como Indicar. In: CARDOSO, R.J.A.; GONÇALVES, E.A.N. **Odontopediatria: Prevenção**. São Paulo: Artes Médicas. 2002. Cap 16, p.281-295.

DAVEY, A.L.; ROGERS, A.H. Multiple Types of the Bacterium *Streptococcus mutans* in the Human Mouth and Their Intra-Family Transmission. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v.29, p.453-60, 1984.

FEJERSKOV, O.; KIDD, E. **Cárie Dentária: A Doença e Seu Tratamento Clínico**. São Paulo: Santos, 2005. 352p.

GAETTI-JARDIM-JUNIOR, E. et al. Atividade Inibitória de Dentifrícios sobre Bactérias Anfibióticas da Cavidade Bucal. **Rev. Odontol. UNESP**, Araraquara, v.27, n.1, p.185-192, 1998.

GEBARA, E.C.E.; ZARDETTO, C.G.D.C.; MAYER, M.P.A. Estudo *in vitro* da Ação Antimicrobiana de Substâncias Naturais sobre *S. mutans* e *S. sobrinus*. **Rev. Odontol. Univ. São Paulo**, São Paulo, v.10, n.4, p.251-256, 1996.

HAMADA, S.; SLADE, H.D. Biology, Immunology and Cariogenicity of *Streptococcus mutans*. **Microbiol. Rev.**, Washington, v.44, p.331-384, 1980.

IKENO, K.; IKENO, T.; MIYAZAWA, C. Effects of Propolis on Dental Caries in Rats. **Caries Res.**, Basel, v.25, no.5, p.347-351, 1991.

KOMIYAMA, E.Y. et al. Estudo *in vitro* de Dentifrícios Comercialmente Disponíveis no Brasil: Efeito Inibitório sobre *Streptococcus mutans*. **Rev. Fac. Odontol. UNICID**, São Paulo, v.16, n.1, p.21-24, 2004.

LEE, S.; ZHANG, W.; LI, Y. The Antimicrobial Potencial of 14 Natural Herbal Dentifrices. **J. Am. Dent. Assoc.**, Chicago, v.135, p.1133-1141, 2004.

MAIA-CAMPOS, G. Bioestatística. Programa GMC: Pesquisa Biológica. Versão 2004. Disponível em <http://www.forp.usp.br/restauradora/gmc/gmc.html>. Acesso em: 17 fev. 2006.

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.** São Paulo, v.55, n.1, p.43-48, 2001.

MOSS, S.J. **Growing-up Cavity-free: A Parent's Guide to Prevention**. Chicago: Quintessence Books, 1993. 212p.

PETERSSON, L.G. et al. Caries-Preventive Effect of Dentifrices Containing Various Types and Concentrations of Fluorides and Sugar Alcohols. **Caries Res.**, Basel, v.25, no.1, p.74-79, 1991.

PRESTON, A.J.A. A Review of Dentifri-

ces. **Dent. Update**, Guildford, v.6, p.247-253, 1998.

SINTES, J.L. et al. Enhanced Anticaries Efficacy of a 0.243% Sodium Fluoride/ 10% Xylitol/Silica Dentifrice: 3-year Clinical Results. **Am. J. Dent.**, Weston, v.8, no.5, p.231-235, 1995.

Endereço para correspondência:

Prof. Maria Cristina Monteiro de Souza
Gugelmin
FCFBP/USP
Av. do Café, s/n
Ribeirão Preto/SP
CEP: 140040-904