

THAÍS THOMÉ

**ANÁLISE *IN VITRO* DO EFEITO DO MONÔMERO ANTIBACTERIANO
MDPB SOBRE A ADESÃO BACTERIANA À RESINA COMPOSTA**

São Paulo

2005

Thaís Thomé

**Análise *in vitro* do efeito do monômero antibacteriano MDPB sobre
a adesão bacteriana à resina composta**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Área de Concentração: Dentística

Orientadora: Profa Dra Márcia Martins Marques

São Paulo

2005

Catálogo-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Thomé, Thaís

Análise *in vitro* do efeito do monômero antibacteriano MDPB sobre a adesão bacteriana à resina composta / Thaís Thomé; orientador Márcia Martins Marques. -- São Paulo, 2005.

83p. : tab., graf., 30 cm.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Dentística) -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

1. Metilmetacrilatos – Resinas compostas – Efeitos 2. Resinas compostas – Adesão bacteriana

CDD 617.675
BLACK D2

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE E COMUNICADO AO AUTOR A REFERÊNCIA DA CITAÇÃO.

São Paulo, ____/____/____

Assinatura:

E-mail:

FOLHA DE APROVAÇÃO

Thomé T. Análise *in vitro* do efeito do monômero antibacteriano MDPB sobre a adesão bacteriana à resina composta [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2005.

São Paulo, 02/06/2005

Banca Examinadora

1) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

2) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

3) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho com todo meu amor...

...ao meu grande amor, **Luis Otavio Feldens**, que acompanhou cada passo desta conquista. Sorriu e chorou comigo. Participou diretamente de todas as fases deste trabalho: me alimentando e medicando, perdendo o sono comigo, fazendo figuras e fotos. Por me fazer sentir amada e especial.

...aos meus pais **Jorge Gilberto e Maria Ignêz** e meus irmãos **Thêmis e Thales** por minha formação como ser humano. Por meus princípios e ambições. Por senti-los perto, apesar de estarem longe. Pelo amor que nos une e que a distância aumenta.

..aos meus "dindos" **Sérgio e Diana Schnack** e minha afilhada **Benirá** com gratidão por me acolherem com extremo carinho e serem minha família em São Paulo. Pelas conversas que amenizaram a saudade e pelos ensinamentos que enriqueceram minha alma.

A vocês agradeço pelo incentivo e pelas orações. Pelo apoio e torcida. Por agüentarem meus desabafos e compartilharem minhas alegrias, sofrerem com os fracassos e vibrarem com as conquistas. E por terem orgulho de mim.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À minha orientadora **Prof^a. Dr^a. Márcia Martins Marques** e à **Prof^a. Dr^a. Márcia Pinto Alves Mayer**. Obrigada pelo voto de confiança, pelo incentivo e pelo apoio nos momentos mais críticos. Por dividirem comigo seus conhecimentos e por terem paciência com minha inexperiência. Vocês são exemplos de mulheres fortes, corajosas e poderosas, sem perderem a delicadeza feminina. Tenham certeza de que sempre as admirarei e tentarei me tornar uma mulher e uma profissional tão competente quanto vocês.

AGRADECIMENTOS

A todos que torceram e rezaram por mim desde o momento da seleção para o mestrado.

Ao Professor Dr. Satoshi Imazato pelo envio do material restaurador testado.

Aos meus sogros, Sueli e Miguel Feldens, e cunhados Felipe, Fernanda, Miguel, Manuela, Jeferson e Carolina pelo incentivo e pela torcida à distância.

Ao meu cunhado Raphael Loro pelo incentivo.

Ao meu primo Joabe Schnack e sua esposa Renata pela amizade, torcida e ajuda na compra do computador.

Ao engenheiro químico e amigo Sr. Roberto Centurion pela ajuda com os cálculos químicos e a sua esposa Marília Centurion pela amizade e torcida.

À minha dinda Silvana Eckert pelo exemplo de dedicação à Odontologia.

Aos meus grandes amigos Thais, Roberto, Rafael, Vivian e Maira pelo apoio, torcida e pela amizade que a distância não abalou.

Ao Prof. Dr. Marcos Túlio Mazzini de Carvalho por ser meu primeiro incentivador e por me fazer confiar de que esta conquista seria possível.

Às gurias que ajudaram a cuidar de mim e das minhas coisas Cida, Célia e Verônica.

À Cláudia Magdanello por cuidar da minha saúde.

Aos colegas do laboratório de Microbiologia Oral do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo pela forma carinhosa com que me acolheram, pela ajuda e paciência. Sem vocês este trabalho não poderia ser realizado.

Aos amigos do Curso de Pós-Graduação em Dentística, pela amizade e incentivo, e, em especial, ao Washington e à Alessandra pela ajuda direta.

À nova amiga Anna Liubushka pela ajuda com os artigos e com a impressão da dissertação.

Ao Sr. João Paulo, técnico do laboratório de Microbiologia Oral, pela ajuda no preparo dos meios de cultura.

Aos Professores do Departamento de Dentística da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pela amizade e convivência científica compartilhada.

Aos funcionários do Departamento de Dentística da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo Neuza, Davi e Ana pela atenção dispensada durante o curso.

À Sônia, técnica do laboratório do Departamento de Dentística, pela atenção a mim dispensada.

Aos doadores de saliva.

Aos amigos e professores da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul que participaram da minha formação profissional e continuaram me apoiando na busca por conhecimento.

À Vânia, bibliotecária, pela atenção na correção da dissertação.

Ao CNPq pela bolsa de Mestrado no programa Demanda Social.

Thomé T. Análise *in vitro* do efeito do monômero antibacteriano MDPB sobre a adesão bacteriana à resina composta [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2005.

RESUMO

Um novo monômero, brometo de metacrilóiloxidodecílpiridínio (MDPB), com efeito antibacteriano e capacidade de co-polimerizar com outros monômeros, foi apresentado por Imazato, Torii e Tsuchitani (1993). Este estudo avaliou a adesão bacteriana, em 16, 40 e 64 horas, à resina composta contendo ou não o monômero antibacteriano MDPB. A adesão foi testada para *Streptococcus sanguinis* e *Streptococcus sobrinus*. Após as amostras terem sido submetidas à incubação, o biofilme foi coletado e a contagem de UFCs foi realizada. Os dados foram comparados pelo método ANOVA complementado por teste de Tukey. Os resultados demonstraram que, para o *S. sanguinis*, a adesão sobre o MDPB foi significativamente maior ($p < 0.05$) quando comparado ao controle em 16 horas, mas diminuiu significativamente em 40 horas, não apresentando diferenças quando comparado ao controle neste tempo ($p < 0.01$). Para o *S. sobrinus*, o controle apresentou aumento significativo da adesão bacteriana em 64 horas quando comparado com 16 horas ($p < 0.01$), sendo significativamente maior que para o MDPB em 64 horas ($p < 0.05$). Assim, o estudo mostrou que o MDPB é capaz de inibir a adesão de *S. sobrinus* sem interferir na adesão do *S. sanguinis*. Portanto, nas condições deste estudo os resultados sugerem que a incorporação do MDPB a resinas compostas pode ser de importância na prevenção de cáries secundárias favorecendo a adesão de bactérias comensais em detrimento de bactérias com potencial cariogênico.

Palavras-Chave: MDPB – Resina Composta – Adesão Bacteriana – *Streptococcus mutans* – *Streptococcus sobrinus*

Thomé T. Influence of the MDPB monomer on the *in vitro* bacterial adherence to resin composite [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2005.

ABSTRACT

A new antibacterial monomer, Methacryloyloxydodecylpyridinium bromide (MDPB), with antibacterial property and ability to co-polymerize with other monomers, was introduced by Imazato, Torii and Tsuchitani (1993). This study aimed to analyze the effect of MDPB on bacterial adherence to resin composites containing or not MDPB. *Streptococcus sanguinis* and *Streptococcus sobrinus* were used. The biofilms were collected from the samples and the colony forming units (CFUs) were counted after 16, 40 e 64 h of incubation. The data were compared by ANOVA complemented by the Tukey's test. The results showed that the adhesion of *S. sanguinis* to MDPB-containing resin composite was significantly higher ($p < 0.05$) than to control samples at 16 h, but significantly diminished at 40 h, reaching values similar to those of control samples ($p < 0.01$). The adherence of *S. sobrinus* to control samples significantly increased throughout the experimental time ($p < 0.01$) and was considerably higher than to MDPB at 64 h ($p < 0.05$). Thus, the study showed that MDPB is capable of inhibit adhesion of *S. sobrinus* with no interference on the adhesion of *S. sanguinis*. Thus, at the conditions of this study we suggest that MDPB incorporated to resin composites could be of importance to prevent secondary caries favoring adhesion of commensal bacteria and impairing adhesion of cariogenic bacteria.

Key-works: MDPB – Composite resin – Bacterial adherence – *Streptococcus sanguinis* – *Streptococcus sobrinus*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2.1 - Diagrama ilustrando os possíveis papéis da co-agregação bacteriana no desenvolvimento de biofilme multi-espécies.....	18
Figura 2.2 - Fórmula estrutural do MDPB.....	32
Figura 4.1 - Diagrama ilustrativo do experimento	50
Figura 4.2 - Ilustração representativa da Técnica da Got a.....	52
Figura 4.3 - Fotos representativas do experimento.....	54
Quadro 5.1 – Análise de Variância para o número de UFCs de <i>S. sanguis</i>	56
Figura 5.1 - Representação gráfica do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) de <i>Streptococcus sanguinis</i> nos grupos experimentais em função do tempo.	57
Quadro 5.2 – Análise de Variância para o número de UFCs de <i>S. sobrinus</i>	58
Figura 5.2 - Representação gráfica do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) de <i>Streptococcus sobrinus</i> nos grupos experimentais em função do tempo.	59

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

pH	Potencial de Hidrogênio
EGM	Streptococcus grupo mutans
S.	<i>Streptococcus</i>
CO ₂	Dióxido de Carbono
MDPB	Brometo de metacrilóiloxidodecilpiridínio
PPRF	Resina Pré-Polimerizada de Preenchimento
FUM	Meio Fluído Universal
mFUM	Meio Fluído Universal modificado
NaCl	Cloreto de Sódio
KNO ₃	Nitrato de Potássio
K ₂ HPO ₄	Fosfato de Potássio dibásico
KH ₂ PO ₄	Fosfato de Potássio monobásico
(NH ₄) ₂ SO ₄	Sulfato de Amônia
MgSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de Magnésio heptahidratado
Na ₂ HPO ₄	Fosfato de Sódio
N ₂	Nitrogênio
H ₂	Hidrogênio
Na ₂ CO ₃	Carbonato de sódio
DDT	Ditiotreitol
rpm	Rotações por minuto

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
nm	Nanômetro
mm	Milímetro
%	Porcentagem
ml	Mililitro
mW/cm ²	Mili Wats por Centímetro Quadrado
μl	Micro Litro
mmol	Micro-mol
mmol/L	Micro-mol por Litro
céls/ml	Células por Micro Litro
A ₅₅₀	Densidade Óptica no comprimento de onda de 550 nanômetros
>	Maior que
<	Menor que

SUMÁRIO

p.

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	15
3 PROPOSIÇÃO	38
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	39
5 RESULTADOS.....	56
6 DISCUSSÃO	60
7 CONCLUSÕES	68
REFERÊNCIAS.....	69
APÊNDICES.....	74
ANEXOS.....	77

1 INTRODUÇÃO

A incidência de cáries recorrentes em restaurações de resina composta preocupa os cirurgiões-dentistas, uma vez que a cárie secundária é considerada a principal razão para a troca de restaurações. Bactérias que infiltrem por micro-fendas entre a restauração e a parede dental induzem a formação de cárie secundária, podendo causar danos à polpa. É importante, para manutenção da saúde bucal, prover materiais restauradores dentais com atividade antibacteriana e, assim, prevenir os efeitos nocivos causados pelas bactérias bucais. Por este ponto de vista, numerosas tentativas de produzir sistemas adesivos dentinários e materiais restauradores que apresentem atividade antibacteriana têm sido realizadas.

Um novo monômero, brometo de metacrilóiloxidodecílpiridínio (MDPB), com efeito antibacteriano e capacidade de co-polimerizar com outros monômeros, foi apresentado por Imazato, Torii e Tsuchitani (1993). Acrescentado a materiais resinosos – resinas e sistemas adesivos – o MDPB demonstrou significativa atividade na inibição do crescimento bacteriano e do acúmulo de biofilme formado por *Streptococcus mutans* em sua superfície. Porém a presença de saliva parece atenuar esta inibição, embora a resina composta com MDPB ainda exiba menor acúmulo de biofilme quando comparada à resina controle.

O efeito do MDPB sobre o *S. mutans* está estabelecido. Na seqüência da análise deste novo monômero antibacteriano, este trabalho visa analisar a modulação da adesão de outras bactérias do biofilme bucal – *Streptococcus sanguinis* e *Streptococcus sobrinus* – sobre uma resina composta contendo o MDPB.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Microbiologia da cárie e adesão bacteriana

A microbiota desempenha importante papel na saúde de humanos e animais, contribuindo no desenvolvimento do sistema imunológico e promovendo resistência a microorganismos patogênicos. Mas também constitui um reservatório de bactérias com potencial patogênico que podem infectar os tecidos do hospedeiro. Na cavidade bucal as bactérias estão associadas às duas principais doenças bucais: cárie e doença periodontal (MARCOTTE; LAVOIE, 1998).

Os microorganismos pioneiros na colonização da cavidade bucal de recém-nascidos são *Streptococcus mitis* biovar 1, *S. oralis* e *S. salivarius*. Estes microorganismos ocupam nichos deste novo ambiente modificando o habitat e, como resultado, favorecem o desenvolvimento de uma nova população, aumentando a diversidade e complexidade da comunidade microbiana. Quando não existem mais nichos disponíveis para novas populações a sucessão termina – esta é a chamada comunidade clímax (MARCOTTE; LAVOIE, 1998).

A cavidade bucal – um ambiente úmido, com temperatura relativamente constante mantida pela saliva entre 35 e 36 °C e com o pH entre 6.75 e 7.25 na maioria das áreas – favorece o desenvolvimento de uma variedade de microorganismos (MARSH, 2003a), mas não deve ser considerada um meio homogêneo. Diferentes fatores físico-químicos caracterizam diversos habitats

distintos, assim suportando o desenvolvimento de diferentes comunidades microbianas (MARCOTTE; LAVOIE, 1998).

Antonie van Leeuwenhoek – o primeiro pesquisador a examinar o biofilme dental por meio de um microscópio – sugeriu, no século XVI, o possível envolvimento de microorganismos em sua composição. Muitos estudos sucederam aos de van Leeuwenhoek e, atualmente, pode-se afirmar que o biofilme dental é uma diversificada comunidade de microorganismos que se acumula em tecidos duros (dentes) como um filme, embebidos em uma matriz extracelular de polímeros do hospedeiro e de origem microbiana, compreendendo mais de 500 espécies de bactérias (BECKER et al., 2002; MARSH, 2004; ROSAN; LAMONT, 2000). Mas, apesar de todos os estudos, a estrutura e atividades biológicas das bactérias associadas à dentição humana ainda necessitam ser mais bem elucidadas (ROSAN; LAMONT, 2000).

A colonização do corpo humano por microorganismos depende de uma série de fatores interagidos. O primeiro fator seria uma associação frouxa com a superfície de um tecido, permitindo uma adesão mais forte e permanente estabelecida pelas atividades de ligação das adesinas, encontradas na superfície celular, aos receptores complementares encontrados na superfície do tecido hospedeiro (JENKINSON; LAMONT, 1997). No caso da cavidade bucal, a película adquirida formada pela saliva imediatamente após a erupção dental ou após completa limpeza dos dentes influencia diretamente a colonização microbiana inicial. Esta fase corresponde à adsorção de moléculas do hospedeiro e das bactérias à superfície dental (MARSH, 2004) (Figura 2.1a). Se as condições forem favoráveis, os colonizadores primários – primeiros organismos a aderirem à película adquirida –

podem multiplicar-se no substrato e formar micro-colônias (Figura 2.1b) (RICKARD et al., 2003).

A adesão inicial de uma célula bacteriana a uma superfície é considerada um evento ao acaso. Se células aderem, se dividem e se acumulam é produzido um filme no qual nova adesão e acúmulo de células podem ocorrer. Bactérias bucais geralmente possuem mais de um tipo de adesina em suas superfícies celulares e podem participar de interações com moléculas do hospedeiro e receptores similares em outras bactérias (MARSH, 2004). Durante o desenvolvimento de populações formadas por múltiplos microorganismos – como o biofilme dental – cada célula aderida ao filme representa uma nova superfície e, portanto, serve de base para a co-adesão de definidos grupos de organismos. A co-adesão é o processo pelo qual bactérias geneticamente distintas ligam-se umas às outras via moléculas específicas (JENKINSON; LAPPIN-SCOTT, 2001). Receptores específicos estão envolvidos na co-adesão dos colonizadores tardios aos colonizadores primários no biofilme bucal e conduzem a um incremento da diversidade do biofilme (MARSH, 2004) (Figura 2.1c). Os microorganismos multiplicam-se, tornando o biofilme uma comunidade multi-espécies, organizada funcionalmente e com arranjo tridimensional. A produção de polímeros resulta na formação de uma complexa matriz extracelular formada por glucanos, solúveis e insolúveis, e polímeros diversos (Figura 2.1d). Esta matriz contribui para a manutenção da integridade estrutural e resistência geral do biofilme, sendo biologicamente ativa e retendo nutrientes, água e enzimas (MARSH, 2004).

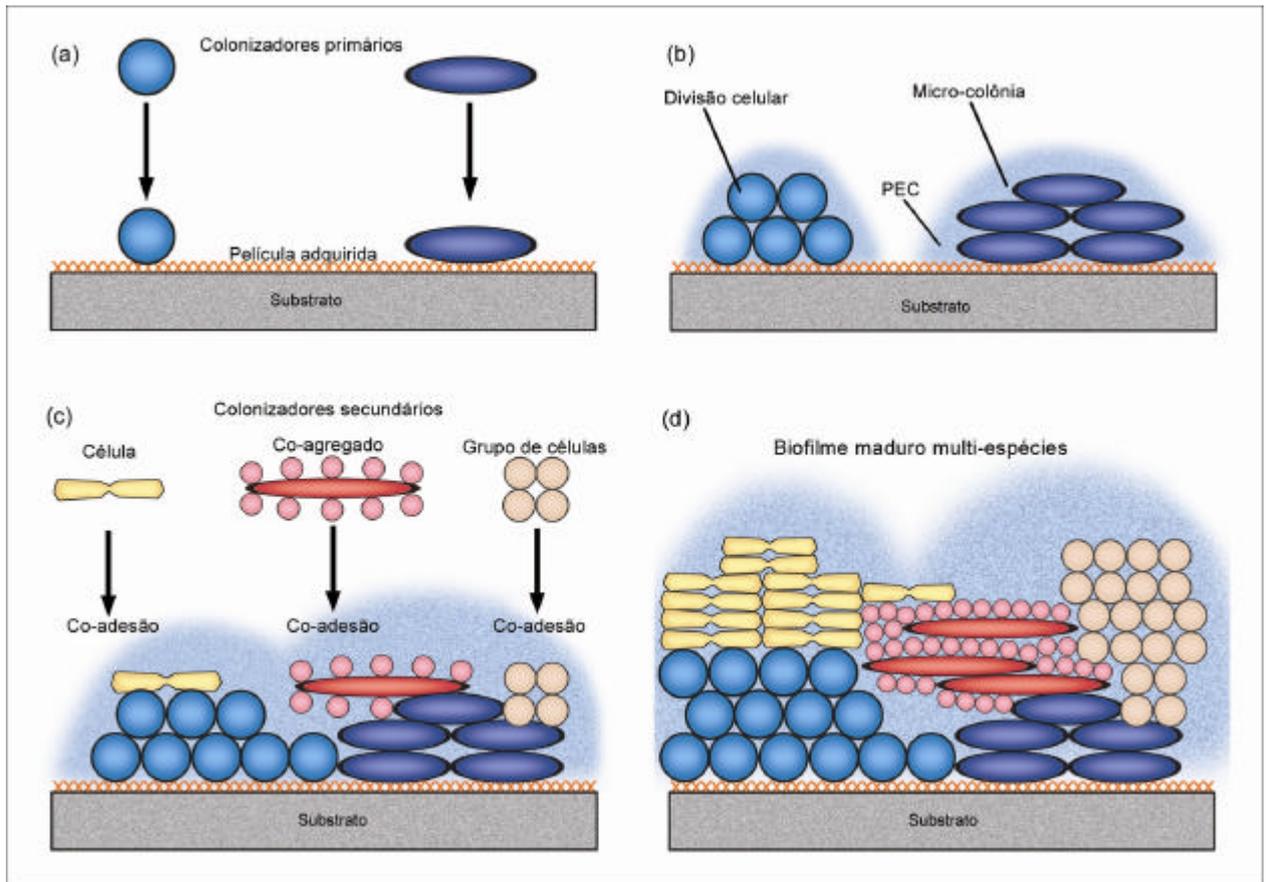


Figura 2.1 – Diagrama ilustrando os possíveis papéis da co-agregação bacteriana no desenvolvimento de biofilme multi-espécies. (a) Colonização primária do substrato recoberto pela película adquirida, composta de polissacarídeos e proteínas; (b) crescimento e divisão celular e produção de polissacarídeo extracelulares (PEC) conduzindo ao desenvolvimento de micro-colônias; (c) co-adesão de células, co-agregados celulares e grupos de células idênticas ao biofilme multi-espécies jovem; e maturação e formação de mosaicos clonais dentro do biofilme multi-espécies (adaptado do diagrama de RICKARD et al., 2003)

Envolvida na adesão inicial das bactérias à superfície dental pela formação da película adquirida, a saliva desempenha ainda inúmeras funções na manutenção da saúde bucal e na proteção dos dentes. Diversas glicoproteínas salivares previnem a adesão de microorganismos à película adquirida do esmalte e inibem seu crescimento. A superfície dos tecidos bucais é constantemente protegida por um grande número de proteínas salivares como lactoferrina, lactoperoxidase, imunoglobulinas, aglutininas e mucinas. Além disso, numerosos peptídeos com ação bactericida tem sido identificados (van NIEUW AMERONGEN; BOLCHERS; VEERMAN, 2004). Um grupo de proteínas salivares, lisozimas, lactoferrinas e

peroxidases agem em conjunto com outros componentes salivares para limitar o crescimento ou eliminar bactérias. A lisozima é uma proteína catiônica que está presente nos principais fluídos corporais. Esta proteína pode matar algumas espécies de bactérias. *In vitro*, o sistema formado por lisozimas interagindo com ânions monovalentes – como tiocinato, perclorato, iodo, brometo, bicarbonato, nitrato e flúor – e proteases componentes da saliva, apresentou efeito bacteriolítico contra *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus casei* e *Fusobacterium nucleatum*. Além disso, lisozimas podem co-agregar células bacterianas e inibir sua colonização em mucosas e superfícies dentais. A lactoferrina é uma proteína que se liga ao ferro e pode inibir o crescimento bacteriano, provavelmente seqüestrando o ferro do meio. As peroxidases salivares removem o peróxido de hidrogênio tóxico produzido pelas bactérias bucais e podem reduzir a produção de ácido pelo biofilme (MARCOTTE; LAVOIE, 1998). As imunoglobulinas salivares pertencem principalmente à sub-classe imunoglobulina A (IgA) e, em menor extensão, à sub-classe imunoglobulina G (IgG). Estas imunoglobulinas correspondem a 5-15 % das proteínas salivares (MARSH, 2004) e agem como anticorpos diretos contra uma variedade de microorganismos bucais. Estes anticorpos podem influenciar na microbiota bucal interferindo na adesão ou inibindo o metabolismo bacteriano. Mas os componentes salivares não atuam de forma isolada. Interações sinérgicas ou antagonistas podem influenciar suas ações antimicrobianas. Mucinas atuam concentrando outras substâncias antibacterianas – até mesmo lisozima e IgA – na superfície da mucosa. IgAs acentuam a atividade antimicrobiana de lactoferrinas, peroxidases, aglutininas e mucinas. Efeitos antimembrana de lisozimas podem ser realçados por peroxidases salivares e histaminas. Em oposição, peroxidases salivares podem bloquear o efeito bactericida de lactoferrinas (MARCOTTE; LAVOIE, 1998). O sistema tampão salivar

é responsável pela rápida neutralização dos ácidos (van NIEUW AMERONGEN; BOLCHERS; VEERMAN, 2004). Quando ocorre a ação de ácidos bacterianos, estes são neutralizados por íons de bicarbonato e pelo peptídeo sialina presente na saliva (BALAKRISHNAN; SIMMONDS; TAGG, 2000). Com o início do processo cariioso, as proteínas da película adquirida, promovem a remineralização do esmalte atraindo íons cálcio. A desmineralização é retardada pelas proteínas da película, em combinação com os íons cálcio e fosfato da saliva e do fluído do biofilme (van NIEUW AMERONGEN; BOLCHERS; VEERMAN, 2004).

O biofilme dental produz benefícios ao seu hospedeiro. Animais livres de microorganismos apresentam a superfície das mucosas alteradas e têm as defesas do hospedeiro diminuídas. A microbiota reduz o risco a infecções agindo como uma barreira para colonização por agentes exógenos, freqüentemente patogênicos. Contribuem para esta resistência à colonização fatores como uma competição mais efetiva por nutrientes e sítios aos quais as bactérias possam aderir e a criação de condições não favoráveis para o crescimento de espécies invasoras. Portanto, ao considerar-se o uso de agentes antimicrobianos é importante que os benefícios desta flora residente sejam mantidos (MARSH, 2003b).

O grupo de bactérias conhecidas como estreptococos está entre os predominantes no biofilme bucal. Mais de 20 espécies de estreptococos estão atualmente identificadas, todas associadas exclusivamente a mamíferos (JENKINSON; LAMONT, 1997). Grande parte das espécies de estreptococos é considerada comensal, organismos que, em sua maioria, vivem em harmonia com o hospedeiro e são tolerados por este. Usualmente, estreptococos são encontrados em mucosas – cavidade bucal, trato respiratório e trato gastro-intestinal – e, quando as condições fornecidas por estes sítios são favoráveis, podem desenvolver doenças

sistêmicas ou localizadas. Jenkinson e Lamont (1997) atribuem o sucesso da colonização por estreptococos a três fatores: (1) a habilidade destes organismos em aderir a quase todas as superfícies presentes em seu ambiente natural; (2) sua habilidade em utilizar rapidamente nutrientes disponíveis sob oscilações nas condições do meio; e (3) sua habilidade em tolerar, resistir ou mesmo destruir as defesas imunológicas do hospedeiro.

Entre os estreptococos envolvidos na formação do biofilme encontra-se o *Streptococcus sanguinis*, sendo a primeira bactéria a aderir seletivamente e colonizar a superfície dental (CAUFIELD et al., 2000; DECKER et al., 2003; KAWASHIMA et al., 2003; LAMONT et al., 1991; MURRAY et al., 1992). A espécie anteriormente conhecida como *S. sanguis* foi dividida em duas espécies: *S. sanguinis* e *S. gordonii* (CAUFIELD et al., 2000). O *S. sanguinis* é o estreptococo não-mutans predominante na microflora do biofilme bucal (TAKAHASHI; YAMADA, 1999). A densidade de *S. sanguinis* encontrado na saliva é de 1×10^5 céls/ml (KAWASHIMA et al., 2003). A colonização por *S. sanguinis* depende da presença dos dentes (KAWASHIMA et al. 2003), sendo assim, não coloniza a criança até a erupção do primeiro dente (CAUFIELD et al., 2000). Caufield et al. (2000) apontam a existência de uma discreta janela de infectividade, por volta dos nove meses de idade, coincidindo com a erupção do primeiro dente decíduo. Seria nesta janela que a colonização por *S. sanguinis* ocorreria, variando de acordo com a época de erupção do primeiro dente.

O *S. sanguinis* é considerado uma bactéria associada à saúde (BECKER et al., 2002) que apresenta baixo potencial cariogênico (CAUFIELD et al., 2000; CHESTNUTT; MACFARLANE; STEPHEN, 1994). Com a maturação do biofilme os níveis de *S. sanguinis* aumentam, decrescendo após a colonização do biofilme por

EGM. Caufield, Cutter e Dasanayake (1993) observaram que a proporção entre *S. mutans* e *S. sanguinis* pode servir de indicador de risco à cárie. Crianças com níveis de EGM não-detectáveis apresentaram maior nível de *S. sanguinis* na saliva do que as crianças colonizadas por EGM. Este dado indica que pode haver uma competição entre estas espécies na colonização das superfícies dentais e que um pode afetar a colonização do outro. Por ser antecessor, o *S. sanguinis* poderia competir com EGM pela colonização de sítios na superfície dental. A colonização precoce por *S. sanguinis* e a presença de níveis elevados desta bactéria na saliva estariam relacionadas a um significativo atraso na colonização por EGM.

O *S. sanguinis* apresenta uma forte associação aos componentes da saliva. Sua capacidade de aderir às proteínas e glicoproteínas salivares é importante no desenvolvimento do biofilme bucal. As descobertas de Kawashima et al. (2003) indicam que a adesão do *S. sanguinis* aos componentes salivares poderia competir com a ação adesiva do *S. mutans* a estes componentes na cavidade bucal. Sendo assim, desempenharia um papel benigno, senão benéfico, na cavidade bucal (CAUFIELD et al., 2000).

Em contrapartida, Takahashi e Yamada (1999) consideram que cepas de estreptococos não pertencentes ao grupo mutans, até mesmo o *S. sanguinis*, por serem pioneiras na formação do biofilme bucal, podem agir como modificadores deste meio tornando-o ácido e, subseqüentemente favorecendo a colonização por bactérias tolerantes aos ácidos e acidogênicas como estreptococos do grupo mutans (EGM) e lactobacilos. Estudos demonstram que cepas específicas de *S. sanguinis* foram capazes de desenvolver cáries em ratos (BALAKRISHNAN; SIMMONDS; TAGG, 2000). Além disso, *S. mutans* e *S. sobrinus* poderiam ter sua adesão às superfícies dentárias facilitada co-agregando com cepas de *S. sanguinis* já

instaladas (LAMONT et al., 1991; DECKER et al., 2003). No entanto, um estudo que avaliou a adesão de *S. mutans* e *S. sobrinus* em bactérias colonizadoras primárias da cavidade bucal demonstrou que mais bactérias patogênicas aderem ao *Actinomyces viscosus* do que ao *S. sanguinis*, o que poderia indicar que os EGM apresentam maior avidez em aderir aos actinomicetos do que aos estreptococos (LAMONT; ROSAN, 1990).

As pesquisas realizadas na primeira metade do século XX concentraram-se na função dos lactobacilos no desenvolvimento do processo carioso (FEJERSKOV, 2004). Por um tempo pensou-se que os lactobacilos fossem os principais agentes etiológicos da cárie dental, uma vez que estas bactérias metabolizam rapidamente os açúcares da dieta produzindo grandes quantidades de ácidos (LOESCHE, 1986; MARSH, 2003a) e são capazes de sobreviver em meio com valor de pH muito baixo (BALAKRISHNAN; SIMMONDS; TAGG, 2000; MARCOTTE; LAVOIE, 1998; MARSH 2003a). Alguns lactobacilos se mostraram capazes de desenvolver cárie experimental em animais (van HOUTE, 1980). Apesar de não detectados em lesões brancas (van HOUTE, 1980), os lactobacilos estão presentes em 85 por cento das lesões progressivas (BOYAR; BOWDEN, 1985), o que leva a crer que provavelmente desenvolvam um papel importante na progressão da cárie dental (BALAKRISHNAN; SIMMONDS; TAGG, 2000). Mas lactobacilos geralmente têm uma afinidade relativamente baixa às superfícies dentais e não se acumulam em grande número no biofilme. Eles colonizam principalmente a mucosa bucal (van HOUTE, 1980) e o dorso da língua (TANZER; LIVINGSTON; THOMPSON, 2001).

Na segunda metade do século XX as pesquisas voltaram-se para o papel dos estreptococos do grupo mutans (EGM) no desenvolvimento do processo carioso (GIBBONS; COHEN; HAY, 1986; LOESCHE, 1986; van HOUTE, 1980). Partindo de

um estado comensal, grande parte dos estreptococos pode desenvolver doenças. Os fatores definitivos na indução de doenças são, pelo menos em parte, aqueles que perturbam o equilíbrio entre hospedeiro e microorganismo. Estes fatores incluem influências do meio, como dieta e colapso das defesas do hospedeiro, ou determinantes microbianos como fatores de virulência (JENKINSON; LAMONT, 1997). Os EGM são os microorganismos mais intensamente relacionados à cárie.

São conhecidas sete espécies de EGM, que demonstraram heterogeneidade genética. Os *Streptococcus mutans* são os estreptococos mais freqüentemente isolados. *Streptococcus sobrinus* são geralmente encontrados em associação com os *S. mutans* e parecem ser responsáveis principalmente pelas cáries em superfícies lisas. *Streptococcus ratus*, apesar de terem sido primeiramente isolados de ratos, também foram detectados em amostras retiradas de humanos, sendo mais comuns na população africana. *Streptococcus cricetus* foram encontrados primeiramente em hamsters, mas também foram isolados em humanos. *Streptococcus ferus* inicialmente foram isolados em ratos selvagens e *Streptococcus macacae* e *Streptococcus downei* foram isolados de macacos. As três últimas espécies não foram isoladas em humanos (BALAKRISHNAN; SIMMONDS; TAGG, 2000).

Embora o biofilme dental seja constituído de numerosas espécies de bactérias, acredita-se que existam evidências consideráveis do envolvimento de EGM – especialmente *S. mutans* e *S. sobrinus* – e *Lactobacillus* no desenvolvimento inicial e na progressão das lesões de cárie (BALAKRISHNAN; SIMMONDS; TAGG, 2000; GIBBONS; COHEN; HAY, 1986; LOESCHE, 1986; MARCOTTE; LAVOIE, 1998; MARSH, 2003a; TANZER; LIVINGSTON; THOMPSON, 2001). Segundo van Houte (1980), a cárie induzida por EGM é mais severa que a causada por outras

espécies de estreptococos. Experiências com animais e estudos epidemiológicos com humanos indicam que os *Streptococcus mutans* são os principais agentes etiológicos de cáries de esmalte e cáries de raiz e que populações com alta incidência de cárie têm índices de EGM relativamente mais altos do que populações com baixa incidência de cárie (van HOUTE, 1980). Loesche et al. (1984), em um estudo longitudinal, encontraram que os níveis de *Streptococcus mutans* no biofilme aumentaram entre 6 e 24 meses antes da detecção clínica da cárie. Brown, Billings e Kaster (1986) realizaram uma comparação quantitativa dos microorganismos potencialmente cariogênicos encontrados em superfícies cariadas ou não de raízes e coroas dentais. As frequências do isolamento de *Streptococcus mutans* foram 94 % em raízes não cariadas; 98 % em lesões de cárie de raiz; 84 % em esmalte não cariado; 100 % em lesões de cárie em esmalte e representaram a maior proporção do total de microorganismos anaeróbicos cultivados na microflora. Um aumento na proporção de *Streptococcus mutans* foi observado antes do desenvolvimento de lesões de cáries radiculares ou quando estas lesões tornaram-se ativas (BOWDEN, 1990). Tem sido demonstrado que o *S. sobrinus* é mais acidogênico e mais altamente cariogênico que os outros EGM, sendo considerado mais virulento que o *S. mutans* por produzir maior quantidade de polímeros insolúveis glucanos a partir da sacarose que o *S. mutans*, propiciando a alteração físico-química do ambiente da placa e promovendo sua adesão e agregação. O *S. sobrinus* é usado em vários experimentos *in vitro* e em animais para testar medidas preventivas (BALAKRISHNAN; SIMMONDS; TAGG, 2000).

Mas a relação entre EGM e cárie não é absoluta (FEJERSKOV, 2004). Contrariando a teoria de que a cárie seja uma infecção por EGM, pesquisas demonstraram que superfícies de esmalte sadias podem ser colonizadas com um

nível relativamente alto de *Streptococcus mutans* (LOESCHE et al., 1984) e algumas populações livres de cárie apresentam uma contagem de *Streptococcus mutans* relativamente alta (EMILSON; CARLSSON; BRATTHALL, 1987). Nestas situações, a cárie pode não ter se desenvolvido por o dente ser relativamente resistente ao ataque ácido ou porque os indivíduos não apresentam uma dieta cariogênica (BALAKRISHNAN; SIMMONDS; TAGG, 2000). Becker et al. (2002), estudando a cárie infantil, relataram que o *S. sobrinus* foi encontrado em baixos níveis quando comparado ao *S. mutans*, não sendo encontrado na maioria dos sítios infectados. Assim, os autores consideraram que o *S. sobrinus* não está significativamente associado à cárie.

Estudos longitudinais indicam que os EGM têm transmissão vertical entre os humanos, especialmente de mãe para filho (TANZER; LIVINGSTON; THOMPSON, 2001). A saliva é um veículo para a transferência das bactérias e a troca pode ocorrer pelo beijo ou via comida contaminada com saliva. Se o nível de EGM na saliva da mãe for maior que 10^6 /ml, existem 70 por cento de chances de a criança receber o EGM da mãe antes dos três anos. Ao contrário, se o nível de EGM na saliva da mãe for menor que 3×10^5 /ml, as chances de a criança adquirir o EGM da mãe antes dos três anos caem para 20 por cento (KÖHLER; BRATTALL; KRASSE, 1983). Os EGM colonizam o hospedeiro apenas após a erupção do primeiro dente e é este o principal sítio de colonização (BALAKRISHNAN; SIMMONDS; TAGG, 2000; TANZER; LIVINGSTON; THOMPSON, 2001). Após a extração dos dentes, os EGM desaparecem, mas reaparecem com o uso de dentaduras. Estas observações sugerem que superfícies duras são essenciais para a colonização por EGM (BALAKRISHNAN; SIMMONDS; TAGG, 2000). A primeira colonização por EGM ocorre entre 19 e 31 meses de idade. Este período foi descrito por Caufield, Cutter e

Dasanayake (1993) como janela de infectividade. Foi sugerido que crianças que não adquirem EGM neste período, geralmente não são colonizadas até por volta dos 6 anos de idade quando o primeiro molar permanente começa a erupcionar.

Os EGM são encontrados principalmente no biofilme dental. Os dentes molares são mais colonizados que os dentes anteriores e as fissuras destes dentes são mais suscetíveis à colonização do que as faces proximais, vestibular e lingual. Também, com exceção das faces oclusais, dentes com restaurações abrigam mais EGM que aqueles com esmalte intacto (BALAKRISHNAN; SIMMONDS; TAGG, 2000). Lesões de cárie se desenvolvem em locais em que exista a possibilidade de o biofilme amadurecer e permanecer por períodos prolongados, portanto lesões cariosas ocorrem preferencialmente em superfícies oclusais, faces interproximais abaixo do ponto de contato, junto à margem gengival e, quando exposta, na junção cimento-esmalte (FEJERSKOV, 2004).

A presença de EGM, açúcares (especialmente sacarose) e a susceptibilidade da superfície dental são fatores importantes no desenvolvimento de cáries. Os EGM possuem propriedades que os permite serem predominantes no biofilme dental e induzir o desenvolvimento da cárie. Estas características são: síntese de polissacarídeos extracelulares, acidogenicidade (produção de ácidos), aciduricidade (habilidade de sobreviver em meios ácidos), síntese de polissacarídeos intracelulares e produção de endodextranase (BALAKRISHNAN; SIMMONDS; TAGG, 2000). EGM podem fermentar vários açúcares para produzir ácido láctico. O ácido láctico é o mais importante ácido envolvido na etiologia da cárie dental (BECKER et al., 2002), já que é o ácido mais forte produzido em altas quantidades pelos EGM. A ação do ácido láctico sobre o cálcio presente nos cristais de hidroxiapatita na superfície do dente pode causar a desmineralização. Valores de pH

abaixo de 5 são considerados críticos para a desmineralização do esmalte. Se a exposição ao açúcar for freqüente, o índice de desmineralização do dente irá exceder o índice de remineralização e a cárie irá ocorrer. Se a exposição ao açúcar é limitada, o índice de remineralização do dente irá superar o índice de desmineralização e o desenvolvimento da cárie será contido (BALAKRISHNAN; SIMMONDS; TAGG, 2000). Outros ácidos orgânicos não agem sobre o cálcio com a mesma intensidade, então não promovem o mesmo grau de desmineralização que o ácido láctico. O nível de colonização no biofilme por EGM é aumentado pelo consumo de sacarose. Estas bactérias sintetizam certas macro-moléculas da sacarose que favorecem sua fixação ao dente (TANZER; LIVINGSTON; THOMPSON, 2001). Outros açúcares, além da sacarose, como glicose e lactose, também podem induzir a formação de cáries. Apesar disso, estes açúcares são menos cariogênicos do que a sacarose porque, além de ser convertida em metabólicos ácidos, a sacarose é unicamente utilizada na síntese de polissacarídeos extracelulares (PEC). O amido é menos cariogênico do que outros açúcares porque não difunde imediatamente para dentro do biofilme e não é prontamente hidrolisado. Na presença de carboidratos, não necessariamente sacarose, alguns EGM sintetizam polissacarídeos intracelulares (PIC) que se assemelham ao glicogênio. Quando não existem carboidratos exógenos, PIC podem ser metabolizados levando à continua produção de ácidos. Estudos têm demonstrado que *S. mutans* que não possuem a habilidade de sintetizar PIC, apesar de ainda serem aptos a colonizar dentes de ratos, são relativamente menos cariogênicos que a cepa mãe. Contudo, *Streptococcus sobrinus* não sintetizam PIC (BALAKRISHNAN; SIMMONDS; TAGG, 2000).

Os EGM podem desenvolver-se em baixos valores de pH (TAKAHASHI; YAMADA, 1999; TANZER; LIVINGSTON; THOMPSON, 2001). Alguns se

desenvolvem em pH inferior a 4. Estes estreptococos produzem altas quantidades de ATPase associada à membrana, capazes de atuar em baixo pH, que ajudam a bombear íons de H^+ da célula reduzindo a acidificação intracelular (BALAKRISHNAN; SIMMONDS; TAGG, 2000).

Os componentes salivares revestem a superfície dental, células epiteliais bucais e linguais, além de todas as superfícies biológicas ou não – como próteses, por exemplo – da cavidade bucal. A adesão de EGM aos dentes ocorre em duas etapas. Inicialmente a adesão é reversível e mediada pelos componentes da superfície dos EGM. A adesão dos estreptococos às superfícies bucais resulta, primeiramente, da ligação das células aos componentes salivares depositados (película adquirida). A adesão reversível é seguida pela adesão irreversível sacarose-dependente. Na presença de sacarose os EGM sintetizam moléculas de poliglicose, referidas como glucanos, tanto solúveis (ligação predominantemente α 1-6) quanto insolúveis em água (ligação predominantemente α 1-3). Várias glucosiltransferases (GTF) estão envolvidas nesta síntese de glucanos. Alguns dos glucanos recém sintetizados permanecem ligados à glucosiltransferase, que pode estar ligada à superfície celular. Glucanos podem ainda se ligar a uma proteína na superfície celular. Apenas a sacarose pode ser utilizada na produção destes polissacarídeos extracelulares. Muitos estudos têm demonstrado que, em comparação com sua cepa mãe, mutans que estão incapazes de sintetizar glucano insolúvel em água têm a capacidade de adesão ao dente reduzida e induzem a um menor índice de cáries testes em animais. Estes experimentos indicam que glucanos insolúveis em água são um importante fator de virulência (BALAKRISHNAN; SIMMONDS; TAGG, 2000). Ainda que algumas bactérias como, *S. sanguinis*, *S. oralis* e *S. gordonii*, produzam glucanos solúveis em água na cavidade bucal, o

papel dos glucanos sintetizados por GTF de *S. sanguinis* e *S. mutans* na formação do biofilme não foi elucidada (TAMESADA et al., 2004).

Aglutininas salivares podem se ligar à hidroxiapatita e mediar a aderência do *S. mutans* a esta superfície sólida. No entanto, *S. sobrinus* apresentam baixa afinidade aos componentes salivares (KAWASHIMA et al., 2003) e não parecem interagir com aglutininas (LAMONT et al., 1991) diferindo do *S. mutans* na adesão à película. Gibbons, Cohen e Hay (1986) descrevem que o *S. sobrinus* liga-se a um receptor diferente do *S. mutans* na película, podendo apresentar padrão de colonização diferente. O *S. mutans* adere em maior número à hidroxiapatita recoberta com película adquirida que o *S. sobrinus*. Em razão dessas diferenças, os autores sugerem que o *S. sobrinus* deveria ser considerado como uma espécie diferente de estreptococos. Lamont et al. (1991) descrevem que o *S. mutans* e o *S. sobrinus* podem aderir às cepas de *S. sanguinis*. A adesão do *S. mutans* sorotipo C – o mais comumente encontrado na população – ao *S. sanguinis* é aumentada pelas aglutininas salivares, embora a adesão do *S. sobrinus* ao *S. sanguinis* não seja influenciada pela saliva (LAMONT et al., 1991).

A estrutura dos biofilmes desenvolvidos na presença de glicose ou sacarose difere. Na presença de sacarose as bactérias formam grandes agregados graças à produção de glucanos extracelulares - importantes no desenvolvimento de uma arquitetura de biofilme madura - embora o *S. mutans* se desenvolva com índice exponencial semelhante em ambos os açúcares. O tempo de sobrevivência do *S. mutans* no biofilme em regimes de restrição de glicose e sacarose é semelhante, apesar das estruturas de biofilme diferentes, que indicam que a sobrevivência não depende da arquitetura ou da agregação bacteriana (RENYE et al., 2004).

2.2 Incorporação de MDPB às resinas compostas

O diagnóstico clínico de cárie secundária é, atualmente, a razão mais comum para troca de restaurações dentais (KIDD, 2001; MJÖR; TOFFENETTI, 2000). Devido à alta frequência de cáries recorrentes após tratamentos restauradores (MJÖR, 1998; WILSON; BURKE; MJÖR, 1997), vem sendo dada muita atenção aos efeitos terapêuticos manifestados por materiais restauradores diretos. A remineralização pela liberação de flúor é representativa, mas o efeito antibacteriano é outra propriedade importante porque a inativação da bactéria é um modo direto de erradicar a causa da cárie dental. Por este ponto de vista, numerosas tentativas de produzir sistemas adesivos dentinários e materiais restauradores que apresentem atividade antibacteriana têm sido realizadas (IMAZATO, 2003).

Os efeitos antibacterianos dos compósitos de preenchimento são relevantes principalmente na inibição do acúmulo da placa nas superfícies dos materiais e dental em torno da restauração. Na tentativa de suprir compósitos com atividade antibacteriana, muitos autores concentraram-se em incorporar clorexidina à resina composta e uma forte atividade antibacteriana foi observada devido à liberação de agentes antibacterianos (JEDRYCHOWSKI; CAPUTO; KERPER, 1983). No entanto, embora um forte efeito contra bactérias tenha sido obtido, a atividade antibacteriana diminui com o tempo (RIBEIRO; ERICSON, 1991). As tentativas de suprir compósitos com propriedades antibacterianas envolvem alterações nos componentes da resina e este fenômeno também foi observado para a incorporação de clorexidina em resinas compostas (JEDRYCHOWSKI; CAPUTO; KERPER, 1983; RIBEIRO; ERICSON, 1991).

Na tentativa de desenvolver um compósito com atividade antibacteriana, mas sem a liberação de componentes, um monômero foi sintetizado.

Um novo monômero, brometo de metacrilóiloxidodecilpiridínio (MDPB) (Figura 2.2), com efeito antibacteriano e capacidade de co-polimerizar com outros monômeros, foi apresentado por Imazato, Torii e Tsuchitani (1993). Este monômero foi sintetizado pela combinação de brometo de dodecilmiridínio com um grupo metacrilato. O MDPB foi incorporado a compósitos na concentração final de 0,1 e 0,2 %. A capacidade antibacteriana dos compósitos foi investigada e o efeito inibitório dos agentes imobilizadores na superfície destes compósitos foi mensurado utilizando-se *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*. No estudo, os autores demonstraram que a resina composta com concentração 0.2 % de MDPB inibiu o crescimento do *S. sobrinus* na ordem de 10^2 e do *S. mutans* na ordem de 10^3 . O compósito contendo MDPB demonstrou significativa atividade na inibição do crescimento bacteriano e no acúmulo de placa formada por *Streptococcus mutans* em sua superfície (Imazato et al., 1994).

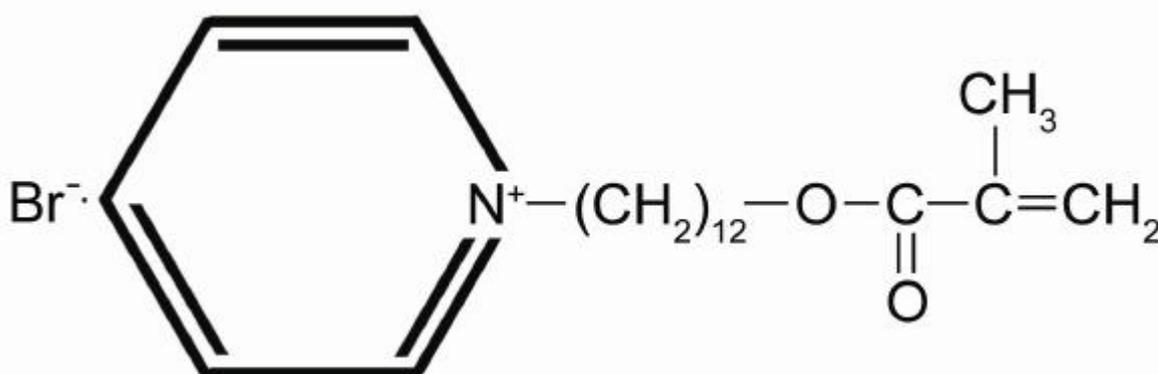


Figura 2.2 – Fórmula estrutural do brometo de metacrilóiloxidodecilpiridínio (MDPB)

Após a polimerização do compósito no qual o MDPB foi incorporado, o componente antibacteriano é quimicamente aderido à matriz resinosa. Os agentes

imobilizados não são liberados pelo material, mas atuam como inibidores por contato contra as bactérias que se fixam à superfície. Em testes de pelo método de disco difusão, não ocorre a formação de zonas de inibição em torno de amostras às quais o MDPB foi incorporado, indicando que não ocorreu a liberação de monômero pelo material restaurador. Os resultados mostraram que o compósito que recebeu 0,2 % de MDPB apresentou efeito inibitório ao acúmulo da placa formada por *S. mutans*, quando comparado ao grupo controle, mesmo depois de 3 meses de imersão em água, com a atividade antibacteriana mantida no mesmo nível. Nenhuma evidência de liberação dos componentes antibacterianos pelo compósito foi observada, mesmo após 90 dias de imersão em água ou outros solventes (IMAZATO et al., 1994).

Materiais restauradores com agente bactericida MDPB apresentam efeito inibitório apenas contra bactérias que venham ao contato das moléculas antibacterianas imobilizadas, então seu efeito não é capaz de alcançar a área em torno do compósito, ainda que a inibição do acúmulo de placa na superfície do material reduza o total de bactérias em torno da restauração. A atividade antibacteriana do MDPB é reduzida após a polimerização, mas o MDPB presente na superfície de um material resinoso ainda apresenta efeito bacteriostático e propriedade antiadesão contra estreptococos bucais (IMAZATO; RUSSELL; McCABE, 1995).

Imazato e McCabe (1994) investigaram a influência da incorporação de MDPB no processo de polimerização de compósitos compostos de Bis-GMA. Profundidade de polimerização, grau de polimerização, efeito de atenuação de luminosidade e dureza de superfície de compósitos aos quais foi incorporado MDPB na concentração de 0,4 ou 0,5 % foram medidas e comparadas com um grupo controle sem MDPB. A profundidade de polimerização dos compósitos com MDPB,

medida por meio de um penetrômetro, foi superior à do grupo controle. Diferentes análises térmicas mostraram que os compósitos com MDPB apresentaram significativo aumento no grau de polimerização quando comparados ao grupo controle, provavelmente em virtude do menor efeito de atenuação de luminosidade dos compósitos com MDPB. Nenhuma diferença significativa entre os grupos experimentais e o grupo controle foi obtida no que diz respeito à dureza Vickers após ambos, um dia e sete dias de armazenamento em água. Estes resultados indicam que a incorporação de pequenas quantidades de MDPB em compósitos compostos de Bis-GMA não afeta adversamente o desempenho de polimerização. Ao contrário, uma significativa, embora pequena, melhora foi observada.

Monômeros promotores de adesão são incorporados a materiais resinosos como resinas compostas, cimentos resinosos e selantes de fissuras para melhorar a capacidade de adesão destes materiais ao substrato dentário. Imazato et al. (1998) incorporaram MDPB e o monômero fosfórico promotor de adesão MDP (10-metacriloiloxidecil dihidrogênio fosfato) a uma resina dental baseada em Bis-GMA e investigaram sua ação bacteriana contra *Streptococcus mutans* após a polimerização. O crescimento de *S. mutans* foi fortemente inibido pelo contato com a superfície de resina contendo MDPB/MDP, embora o efeito bactericida ter sido pequeno. A resina contendo MDPB/MDP polimerizada também demonstrou um efeito inibitório contra a formação *in vitro* de biofilme por *S. mutans* em sua superfície.

As características bactericidas e a citotoxicidade do monômero antibacteriano MDPB foi investigada por Imazato et al. (1999b). Para investigar as características bactericidas do MDPB contra estreptococos bucais foram determinadas as mínimas concentrações bactericidas para sete espécies e o tempo necessário para eliminar o

Streptococcus mutans. O efeito citotóxico do MDPB em células pulpares humanas foi estimado por [³H]-timidina após o contato com soluções de MDPB em diversas concentrações. O MDPB demonstrou forte atividade bactericida contra todas as espécies testadas e eliminou rapidamente as bactérias na concentração de 4 vezes ou mais da mínima concentração bactericida. Os efeitos citotóxicos do MDPB foram considerados similares aos dos outros monômeros utilizados rotineiramente em materiais resinosos de uso odontológico.

Imazato et al. (1999a) investigaram a influência da incorporação do MDPB nas características de absorção de água e estabilidade de cor em resinas de Bis-GMA. Discos polimerizados de resina composta contendo 0.4 % ou 0.5 % de MDPB foram confeccionados. O coeficiente de difusão e o ângulo da superfície de contato com a água foram determinados. A estabilidade de cor foi avaliada após a imersão em água a 37 °C e 60 °C por 4 semanas e comparada à do grupo controle sem MDPB. A incorporação de pequenas quantidades de monômero MDPB demonstrou não influenciar as características de absorção de água e afetou a estabilidade de cor da resina composta, causando rápida descoloração.

Ebi et al. (2001), avaliaram o efeito inibitório de uma resina composta contendo o monômero MDPB no acúmulo de biofilme por *S. mutans*. A concentração de MDPB presente no compósito foi de 2.83 %. Os pesquisadores encontraram diferenças estatisticamente significantes na inibição do acúmulo de biofilme quando comparado ao controle. Os valores para redução do acúmulo de biofilme para a resina experimental foram de 35.9, 20.5 e 28.3 % para primeiro, segundo e terceiro ciclos, respectivamente. O grupo que recebeu tratamento com saliva previamente à incubação em suspensão bacteriana, apresentou efeito antibiofilme atenuado, ainda que significativamente menos biofilme tenha se acumulado na superfície das

amostras experimentais. A redução para o grupo experimental tratado com saliva quando comparado ao controle foi de 14.2, 13.6 e 17.9 % para os três ciclos. A análise das características da superfície das amostras demonstrou não haverem diferenças entre a rugosidade superficial e hidrofobia entre os blocos de resina controle ou com MDPB, fatores que poderiam influenciar o acúmulo de biofilme.

Imazato et al. (2003), examinaram a atividade antibacteriana de uma resina pré-polimerizada de preenchimento (PPRF), no qual a amônia quaternária bactericida foi imobilizada. O compósito experimental foi preparado mediante a moagem de blocos resinosos pré-polimerizados de monômeros metacrilato, partículas de sílica e monômero antibacteriano MDPB. O número de *S. mutans* após 18 horas de incubação em contato com o material restaurador experimental, com ou sem adsorção de proteínas por tratamento com saliva, foi determinado e a adesão de bactérias à superfície do compósito foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura. A liberação de MDPB não-polimerizado pelo compósito e sua influência no crescimento bacteriano também foram investigadas. O crescimento do *S. mutans* foi completamente inibido pelo contato com o compósito experimental sem o tratamento com saliva. Ainda que os efeitos tenham sido atenuados, o material restaurador que recebeu tratamento com saliva ainda exibiu inibição de crescimento >99,9 %. Foi confirmado que a redução no número de bactérias não foi devida à aderência bacteriana às partículas do compósito e que a concentração de MDPB não-polimerizado liberado foi muito pequena para afetar o crescimento bacteriano. Os resultados indicaram que a resina com MDPB apresentou efeito bacteriostático significativo sem liberação de componentes antibacterianos e seria útil para incorporação em diversos materiais restauradores resinosos. A inibição da formação de biofilme por resinas compostas com MDPB dependeria da interação da amônia

quaternária immobilizada na superfície do material. Embora o mecanismo da ação antibacteriana da amônia quaternária não esteja completamente estabelecido, existe a hipótese de que ocorreria o rompimento da integridade da membrana citoplasmática causando a lise da célula. Contudo, o comprimento molecular do MDPB é muito menor que a espessura da parede celular de bactérias Gram-positivas, inclusive EGM. Portanto, não está claro se o MDPB é capaz de causar danos à parede celular ou à membrana citoplasmática. MDPB não-polimerizado liberado em concentrações extremamente baixas, não bacteriostáticas contra as bactérias comensais, pode ser capturado na superfície por alguma interação e desenvolver um papel na inibição da bactéria. O mecanismo do MDPB na inibição da bactéria necessita investigação.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi:

Avaliar o efeito do monômero antibacteriano MDPB sobre a adesão de duas bactérias do biofilme bucal – *Streptococcus sanguinis* e *Streptococcus sobrinus* – sobre resina composta.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1. Materiais restauradores

- Resina Experimental com Resina Pré-Polimerizada de Preenchimento (PPRF) contendo MDPB (produzida pela Kuraray Co., Osaka, Japão, a pedido do professor Satoshi Imazato, Osaka University, Japão). A pasta de PPRF antibacteriana contendo 15.8 % de MDPB foi foto-polimerizada e, subseqüentemente, aquecida a 120 °C. A quantidade incorporada de MDPB foi determinada como a concentração máxima que apresentou propriedades de manuseio aceitáveis. Um bloco polimerizado foi pulverizado em um pó fino utilizando-se um moinho, e lavado em metanol 100 % por 24 horas para remoção de componentes não-polimerizados. O PPRF experimental obtido foi seco por mais de 24 horas e incorporado à resina composta, originando uma concentração final de 2.83 % de MDPB.
- Resina Composta Clearfil AP-X, cor A3 (Kuraray Co.)

4.1.2 Equipamentos

- Autoclave
- Bomba de sucção a vácuo
- Câmera de anaerobiose (Plas Labs – Lansing, Michigan-EUA)
- Capela
- Centrífuga 5804 R (Eppendorf AG, Hamburgo-Alemanha)
- Contra-ângulo (Kavo do Brasil, Joinville, SC, Brasil)
- Espectrofotômetro
- Estufa bacteriológica
- Fluxo laminar
- Forno de microondas
- Fotopolimerizador Astralis 3 (Ivoclar – Vivadent AG, Schaan, Liechtenstein)
- *Freezer*
- Micromotor (Kavo do Brasil, Joinville, SC, Brasil)
- Microscópio óptico de luz convencional com objetiva de imersão
- Misturador
- Geladeira
- Radiômetro de cura analógica de alta precisão Demetron (Kerr, CT, EUA)
- Sonicador de banho Branson 3510 (Branson Ultrasonics Co., Danbury, CT, EUA)

4.1.3 Materiais de consumo e Instrumentais

- Água destilada
- Água de Milli Q
- Água peptonada
- Álcool
- Álcool etílico absoluto (etanol)
- Alça de Trigalski
- Algodão
- Amostras de *Streptococcus sanguinis* da cepa ATCC 10556
- Amostras de *Streptococcus sobrinus* da cepa ATCC 33478
- Carbonato de sódio
- Cisteína hidrocloreada
- Cloreto de sódio
- Discos abrasivos de óxido de alumínio Sof-Lex (3M ESPE, St. Paul, MN, EUA)
- Ditioneitol
- Espátula de inserção de resina
- Extrato de levedura
- Fosfato de potássio dibásico
- Fosfato de potássio monobásico
- Fosfato de sódio
- Frascos Eppendorf de 1,5 ml
- Fucsina
- Glicose

- Hemina
- Lâminas de vidro
- Lugol
- Lupa
- Luvas descartáveis
- Matriz de poliéster
- Meio de cultura Brain Heart Infusion – BHI (Difco Lab., Detroit, MI, EUA)
- Menadione
- Metanol 100 %
- Micropipetas e respectivas ponteiras
- Moldes cilíndricos de Teflon preto
- Nitrato de potássio
- Parafina mastigável
- Pipetas Pasteur
- Placas de cultura de bactérias de poliestireno de 24 poços (NUNC, Wiesbaden, Alemanha)
- Placas de Petri
- Sacarose
- Solução fisiológica
- Sulfato de amônia
- Sulfato de magnésio heptahidratado
- Triptone
- Tubos de poliestireno de 12 ml
- Tubos de polipropileno de 50 ml
- Vidrarias (tubos de ensaio, Erlenmeyer, provetas)

- Violeta de Genciana

4.2 Métodos

4.2.1 Aprovação do projeto junto ao comitê de Ética em Pesquisa

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da USP mediante o parecer de aprovação Protocolo n° 37/05 (Anexo A).

4.2.2 Preparo do meio de cultura FUM modificado

As bactérias foram cultivadas em um meio de cultura modificado (*modified fluid universal medium*, mFUM) descrito por Guggenheim et al. (2001), quando o meio de cultura FUM foi suplementado com 67 mmol/L de tampão de Sørensen, pH 7.2.

Primeiramente foi preparada a base do mFUM (Anexo B). A mistura foi dividida em dois frascos Erlenmeyer de 1000 ml e levada à autoclave a 121 °C por 15 minutos.

Soluções estoque foram preparadas para completar a formulação do meio mFUM. Essas soluções estoque foram adicionadas ao meio de cultura autoclavado e frio, sendo 100 µl de Solução Estoque de Menadione (Anexo C), 5 ml de Solução Estoque de Na₂CO₃ (Anexo D) e 20 ml de Solução Estoque de Glicose-Cisteína-DDT (Anexo E).

Para as trocas do meio de cultura, quando o meio mFUM deveria conter 0.15 % de glicose e 0.15 % de sacarose, um novo meio foi preparado, mas neste meio a Solução Estoque de Glicose-Cisteína-DDT foi substituída por uma Solução Estoque Sacarose-Cisteína-DDT (Anexo F). Quantidades iguais do meio com glicose e do meio com sacarose foram misturadas originando um meio com a concentração desejada.

4.2.3 Preparo do caldo inóculo bacteriano

Amostras de *Streptococcus sobrinus* (ATCC 33478) e *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556) de cariogenicidade estabelecida e conhecida, armazenadas em glicerol e congeladas a -20°C, foram obtidas de culturas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

As bactérias foram descongeladas em temperatura ambiente por 10 minutos. Com o auxílio de uma alça de Trigalski, as amostras de cada cepa foram semeadas em meio BHI em placa de Petri, pela técnica de esgotamento, fazendo-se uma série de estrias para distribuir melhor os microorganismos e assim obter colônias isoladas. As placas foram levadas à estufa a 37 °C e 10 % de CO₂ por 48 horas. Todos os

procedimentos foram realizados dentro do fluxo laminar para se evitar possível contaminação do meio de cultura. Este procedimento de semeadura foi realizado com o objetivo de reativar as bactérias e verificar seu grau de pureza.

Após 48 horas, já testadas em seu grau de pureza, as amostras foram transferidas, com o auxílio de uma alça de Trigalski, para tubos de ensaio contendo 5 ml do meio de cultura mFUM. As amostras foram incubadas em a 37 °C em anaerobiose, em atmosfera de 85 % N₂, 10 % CO₂, e 5 % H₂ em câmara de anaerobiose por 24 horas.

Decorridas 24 horas, 200 µl das pré-culturas em 10 ml de meio mFMU foram incubadas a 37 °C em anaerobiose por 15 horas. Após este período, culturas de cada espécie foram preparadas pela inoculação do meio mFMU (10 ml) com alíquotas de 200 µl de pré-cultura e incubadas em anaerobiose a 37 °C por 7 horas.

Após a verificação da pureza das culturas pelo exame microscópico de esfregaço corado, foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 550 nm para verificação da concentração de bactérias. As culturas foram ajustadas independentemente, pela diluição com meio mFMU estéril, até apresentar densidade óptica $A_{550} = 1.0 \pm 0.05$ ($\sim 10^7$ céls/ml). Alíquotas (1 ml) de cada cultura com densidade ajustada foram armazenadas em geladeira por até 6 horas.

4.2.4 Processamento da saliva

A saliva utilizada no experimento foi coletada de 5 voluntários adultos, do gênero masculino, com seu consentimento livre e esclarecido (Apêndice A). A saliva foi coletada uma vez ao dia, durante uma hora, por vários dias. A coleta era realizada ao menos uma hora e meia após a ingestão de comida e líquidos ou escovação dental. Amostras de saliva estimulada pela mastigação de 1 g de parafina mastigável foram coletadas em tubos de polipropileno de 50 ml e, armazenadas em *freezer* a -20 °C. Quando um total de 500 ml foi coletado, a saliva coletada por todos os voluntários foi misturada em um *pool* e centrifugada por 30 minutos, a 4 °C, 12.000 x g. O sobrenadante foi coletado, pasteurizado a 60 °C por 30 minutos e re-centrifugado por 30 minutos, a 4 °C, 12.000 x g em tubos esterilizados. O sobrenadante resultante foi dispensado em tubos de polipropileno de 50 ml esterilizados e armazenado a -20 °C.

A eficácia da pasteurização foi verificada inoculando 0,1 ml da amostra de saliva, em triplicata, em placas de Petri contendo o meio ágar sangue (ágar infusão de cérebro e coração acrescido de 5 % de sangue desfibrinado de carneiro). Após 72 horas a 37 °C, as placas foram observadas para confirmar o não desenvolvimento de culturas.

4.2.5 Preparo das amostras

Foram testadas no experimento as resinas compostas Clearfil AP-X (resina controle) e uma resina composta antibacteriana experimental contendo MDPB-PPRF. Para cada resina foram confeccionados 18 corpos-de-prova totalizando 36 amostras. Os corpos-de-prova foram obtidos valendo-se de moldes cilíndricos de Teflon preto, bipartidos, com diâmetro interno de 5 mm e altura de 1 mm. Estes moldes foram posicionados sobre um conjunto composto por uma cartolina preta, uma lâmina de vidro e uma tira de matriz de poliéster (Figura 4.3 a) (MONTANARO et al., 2004).

As resinas foram inseridas no molde com auxílio de uma espátula de inserção nº 1 em incremento único. Sobre a resina foi interposta uma segunda tira de matriz de poliéster e sobre esta uma nova lâmina de vidro para regularizar a superfície, evitar a inclusão de bolhas e obter lisura superficial dos dois lados dos corpos-de-prova, permitindo o extravasamento do excesso de resina (Figura 4.3 b). Esta lâmina de vidro foi removida previamente à polimerização.

As resinas foram fotoativadas por 40 segundos. Para fotoativação foi utilizado um equipamento fotopolimerizador com intensidade de luz de aproximadamente 530 mW/cm², aferida por um radiômetro de cura analógica de alta precisão.

As laterais das amostras receberam acabamento e polimento com discos abrasivos de óxido de alumínio, de granulação média, fina e extrafina. Após o polimento, as amostras foram acondicionadas em frascos de vidro com tampa. As amostras foram imersas em 10 ml de metanol 100 % e lavadas em um misturador com agitação de 200 rpm por 1 hora para remover componentes não polimerizados.

O manuseio do metanol foi realizado em capela em virtude da toxicidade da solução. Os blocos de resina foram lavados com água destilada e secados naturalmente por várias horas. As amostras foram acondicionadas em embalagens apropriadas e autoclavadas a 121°C por 15 minutos.

4.2.6 Grupos experimentais

Grupo I – Blocos de resina comercialmente disponível Clearfil AP-X (resina controle) – 18 amostras.

Grupo II – Blocos de resina composta antibacteriana experimental contendo MDPB-PPRF – 18 amostras.

4.2.7 Obtenção da película adquirida

Em fluxo laminar, os blocos foram posicionados em placas esterilizadas de cultura de bactérias de poliestireno de 24 poços. Cada bloco de resina foi posicionado em um poço da placa de cultura e cada placa recebeu 16 amostras, 8 pertencentes a cada resina. As amostras foram incubadas com 1000 µl de saliva, sob agitação leve, por 4 horas em temperatura ambiente, para formação da película

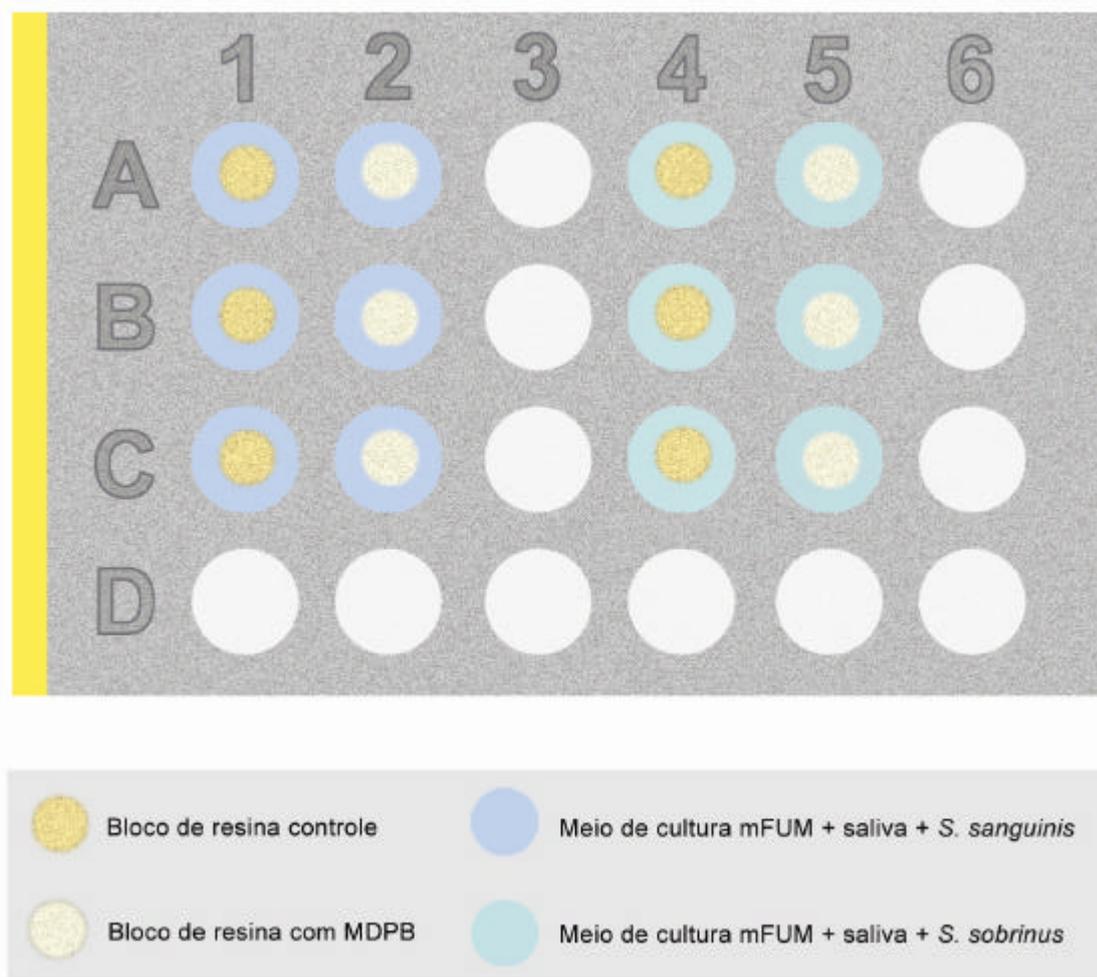
adquirida. Após 4 horas, em fluxo laminar, a saliva foi aspirada com auxílio de uma pipeta de Pasteur estéril acoplada a uma bomba de sucção a vácuo.

4.2.8 Experimento

O experimento está ilustrado na Figura 4.1.

A saliva aspirada de cada poço foi substituída por uma mistura composta de 800 µl de saliva, 800 µl de mFMU com 0,3 % de glicose (originando uma concentração final de 0,15 % de glicose) e 200 µl de caldo inóculo de bactérias de *S. sanguinis* ou *S. sobrinus*. Foram preparadas 3 placas, uma placa para cada intervalo de análise. Todos os procedimentos foram realizados em triplicata.

As placas foram incubadas em câmara de anaerobiose (Figura 4.3 c) a 37 °C por 16 horas, 40 horas ou 64 horas. O meio foi renovado, após 16 horas, com intervalos de 24 horas. Desta forma, a placa incubada por 40 horas passou por uma troca de meio, ao passo que a incubada por 64 horas passou por duas trocas. A cultura prévia foi removida por aspiração e substituída por um meio estéril composto de 800 µl de saliva, 800 µl de mFMU com 0.15 % de glicose e 0.15 % de sacarose (originando uma concentração final de 0.075 % de glicose e 0.075 % de sacarose). Após a troca do meio, as placas foram novamente incubadas em câmara de anaerobiose.



Dia 1 – Formação da película adquirida.

Preenchimento dos poços com meio de cultura mFUM (glicose) + saliva + caldo inóculo de bactérias.

Dia 2 – Após 16 horas, remoção da placa correspondente ao período.

Troca do meio de cultura por mFUM (glicose + sacarose) + saliva.

Dia 3 – Remoção da placa correspondente a 40 horas.

Troca do meio de cultura por mFUM (glicose + sacarose) + saliva.

Dia 4 – Remoção da placa correspondente a 64 horas.

Figura 4.1 – Diagrama ilustrativo do experimento

4.2.9 Coleta do biofilme

Ao final dos tempos designados para incubação, os blocos de resina foram lavados por meio de imersão em solução fisiológica (0.85 % NaCl) por 10 segundos para remoção das células não aderidas. Cada bloco foi transferido, com auxílio de um pinça estéril, para um tubo de poliestireno de 12 ml estéril contendo 1 ml de água peptonada e agitado vigorosamente por 2 minutos. A suspensão bacteriana foi transferida para novos tubos de poliestireno de 12 ml, seguindo-se sonicação em sonicador de banho (Figura 4.3 d), com temperatura de 27 °C, por um minuto, para dispersão dos agregados celulares.

Após a sonicação, a suspensão bacteriana foi diluída em série em água peptonada até 10^{-7} . Para cada amostra foram preparados 7 frascos Eppendorf de 1,5 ml com 900 µl de água peptonada (Figura 4.3 e). Cem µl da suspensão bacteriana foram diluídos no primeiro frasco. Desta diluição 100 µl foram diluídos no segundo frasco e assim sucessivamente até o sétimo frasco, correspondente à diluição 10^{-7} .

Alíquotas de 25 µl das diluições 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} foram inoculadas em triplicata em placas contendo ágar BHI, pela técnica da gota (MILES; MISRA; IRURN, 1938) (Figura 4.2). Para cada amostra foram utilizadas duas placas de Petri, cada uma dividida em três quadrantes. Em cada quadrante foram inoculadas 3 alíquotas de 25 µl de cada diluição. As placas foram incubadas em estufa 37 °C e após 48 horas foi realizada a contagem das colônias formadas. Para

cada amostra, contagem foi realizada na diluição que apresentou entre 10 e 100 UFCs (Figura 4.3 f). A média das três contagens referentes à diluição foi multiplicada por 40 e elevada à potência correspondente a diluição que recebeu para estimar o número de UFCs/ml, ou seja, número de UFCs/bloco de resina.

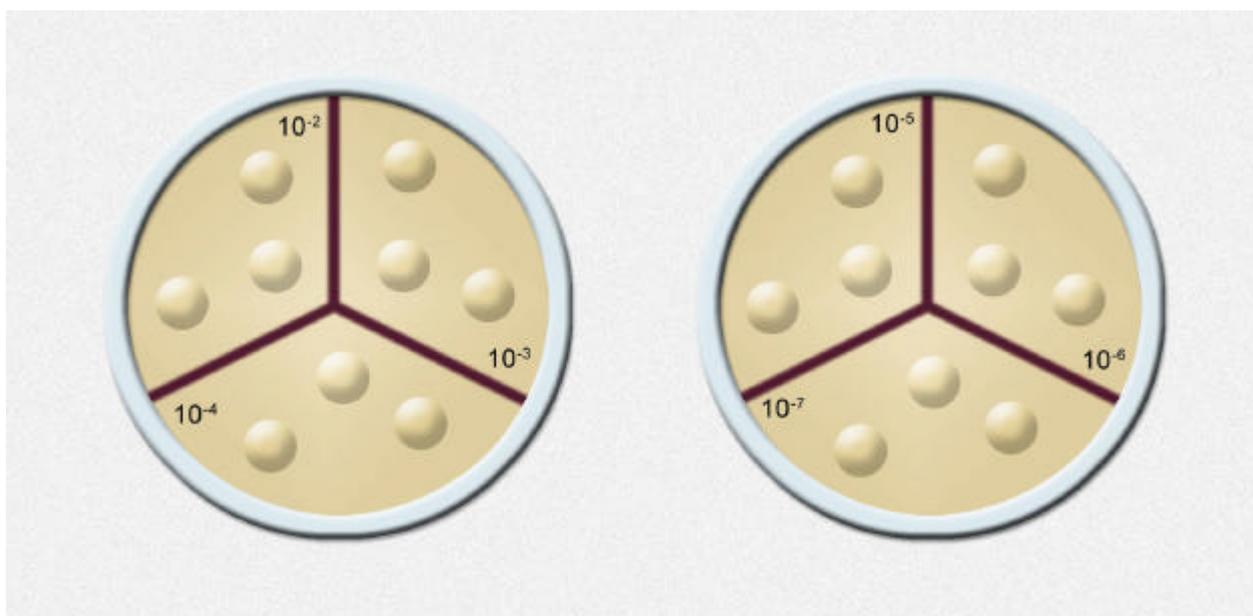
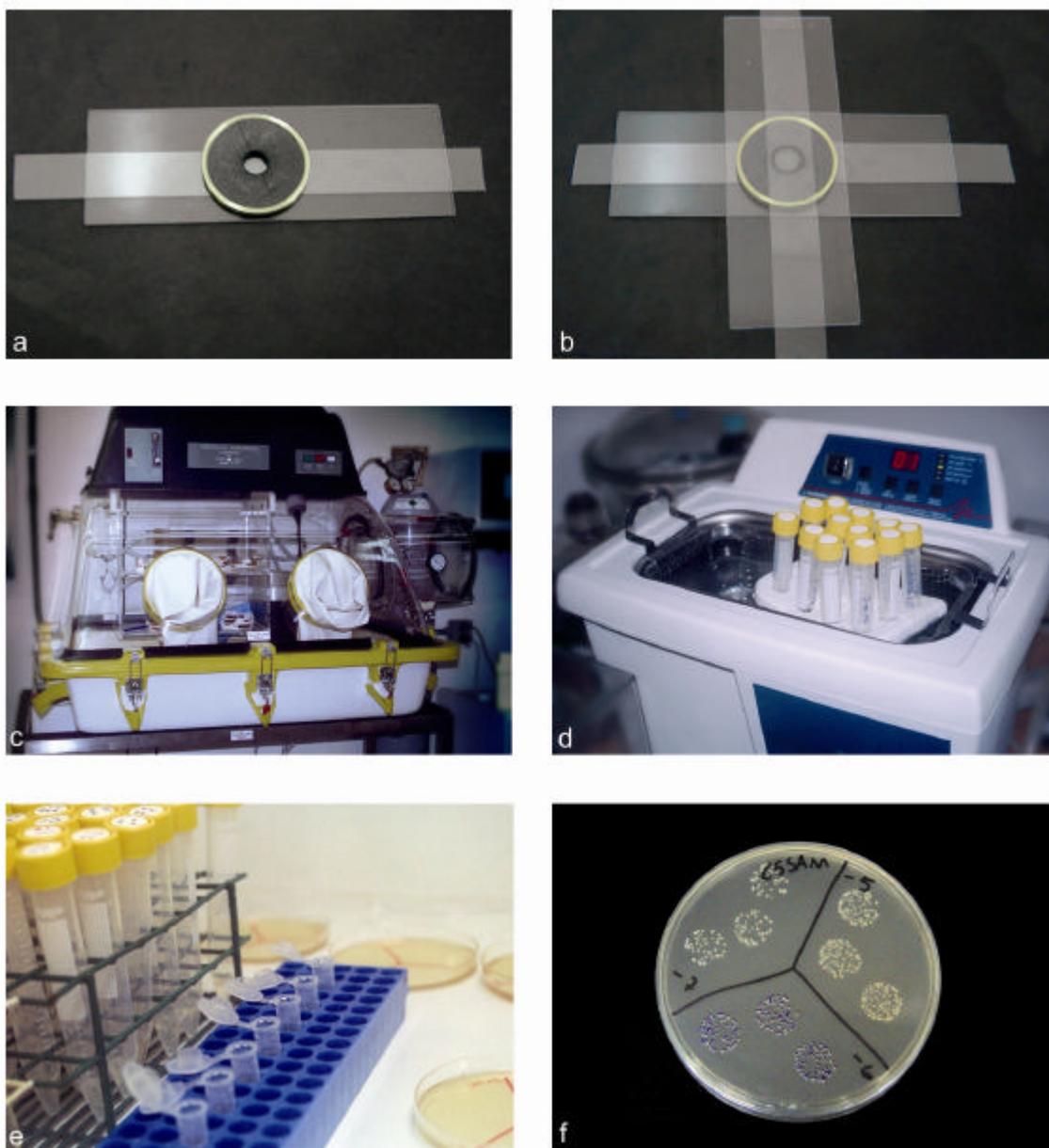


Figura 4.2 – Ilustração representativa da Técnica da Gota

4.2.10 Análise estatística

Os dados, em triplicata, foram transformados em Log_{10} e analisados estatisticamente pelo método paramétrico Análise de Variância (ANOVA), com

diferenciação dos grupos pela comparação múltipla pelo método de Tukey, considerando o nível de significância de 5 %, ou seja, $p < 0.05$. Foi utilizado o programa estatístico BioEstat 3.0.



- a** – Moldes cilíndricos posicionados sobre o conjunto cartolina preta, lâmina de vidro e tira de matriz de poliéster.
- b** – Resina inserida no molde e interposta por tira de matriz de poliéster e lâmina de vidro.
- c** – Câmera de anaerobiose.
- d** – Sonicador de banho.
- e** – Frascos Eppendorf preparados com água peptonada para realização das diluições.
- f** – Placa com contagem de UFCs.

Figura 4.3 – Fotos ilustrativas do experimento

5 RESULTADOS

Durante todo o tempo experimental (16, 40 e 64 horas) bactérias, tanto *Streptococcus sanguinis* quanto *Streptococcus sobrinus*, foram encontradas sobre as resinas compostas dos dois grupos experimentais – com ou sem a presença do MDPB na sua composição.

Os dados do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) aderidas aos blocos de resina de ambos os grupos experimentais, nos diversos tempos, foram transformados em Log_{10} . Estes dados foram comparados pela Análise de Variância (ANOVA) complementada pelo teste de Tukey quando encontradas diferenças estatísticas significantes.

Para o *S. sanguinis* a comparação do número de UFCs aderidas aos blocos de resina dos diferentes grupos experimentais (controle e tratado com MDPB) mostrou diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.01$) (Quadro 5.1; Figura 5.1).

O *S. sanguinis* apresentou número homogêneo de células aderidas aos blocos de resina de ambos os grupos experimentais em função dos tempos (Quadro 5.1; Figura 5.1). A análise estatística (ANOVA) mostrou não haver diferenças estatisticamente significantes entre o número de UFCs nos diferentes tempos em cada grupo experimental (Quadro 5.1).

FONTES DE VARIACÃO	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios
Tratamentos	1	0.8243	0.8243
Blocos	2	0.0426	0.0213
Interação	2	1.2886	0.6443
Erro	12	0.9783	0.0815
F (tratamentos)=	10.11	---	---
Graus de liberdade=	1,12	---	---
p (Tratamentos)=	0.008	---	---
F (Blocos)=	0.261	---	---
Graus de liberdade=	2,12	---	---
p (Blocos)=	0.776	---	---
F (Interação)=	7.903	---	---
Graus de liberdade=	2,12	---	---
p (interação)=	0.007	---	---

Quadro 5.1 – Análise de Variância (ANOVA) para número de UFCs de *Streptococcus sanguinis*

Diferença estatisticamente significativa foi observada entre os grupos apenas no primeiro tempo (16 horas). Neste tempo, o número de UFCs de *S. sanguinis* aderidas à resina com MDPB foi significativamente maior quando comparado ao controle ($p < 0.05$) (Figura 5.1).

A Figura 5.1 representa graficamente o número de UFCs de *S. sanguinis* aderidas aos blocos de resina dos grupos experimentais em função dos tempos analisados. Somente para o primeiro período analisado (16 horas) houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0.05$), mostrando um maior número de células aderidas aos blocos do grupo contendo o MDPB na resina composta.

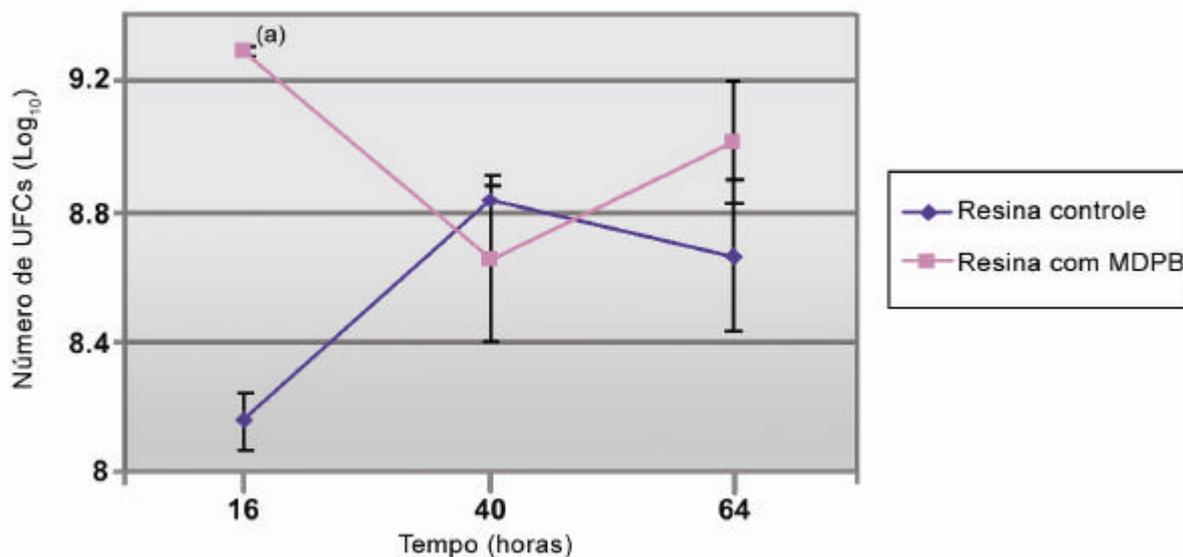


Figura 5.1 – Representação gráfica do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) de *Streptococcus sanguinis* nos grupos experimentais em função do tempo. Observe que o número de UFCs do grupo com MDPB é significativamente maior (a; $p < 0.05$) que o do grupo controle no primeiro tempo experimental (16 horas). As barras verticais representam o Erro Padrão da média

Para o *S. sobrinus* a análise de variância (ANOVA) demonstrou haver diferenças estatisticamente significantes entre o número de UFCs aderidas às amostras do mesmo grupo experimental nos diferentes tempos, além de apontar diferenças entre os dois grupos experimentais nos mesmos tempos (Quadro 5.2; Figura 5.2).

O *S. sobrinus* apresentou número homogêneo de UFCs aderidas aos blocos de resina contendo o MDPB durante os três tempos experimentais. Sobre os blocos de resina controle houve diferenças estatisticamente significantes do número de UFCs nos dois últimos períodos experimentais (40 e 64 horas) ($p < 0.01$) (Quadro 5.2; Figura 5.2).

Entre os grupos experimentais foi observada diferença estatisticamente significativa somente no último tempo (64 horas), quando o número de UFCs de *S.*

sobrinus sobre os blocos de resina contendo MDPB foi significativamente menor que aos blocos de resina controle ($p < 0.05$) (Quadro 5.2; Figura 5.2).

FONTES DE VARIAÇÃO	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrados Médios
Tratamentos	1	0.2108	0.2108
Blocos	2	2.7353	1.3676
Interação	2	1.8107	0.9053
Erro	12	0.3546	0.0296
<hr/>			
F (tratamentos)=	7.134	---	---
Graus de liberdade=	1,12	---	---
p (Tratamentos)=	0.019	---	---
F (Blocos)=	46.278	---	---
Graus de liberdade=	2,12	---	---
p (Blocos)=	0.000	---	---
F (Interação)=	30.635	---	---
Graus de liberdade=	2,12	---	---
p (interação)=	0.000	---	---

Quadro 5.2 – Análise de Variância (ANOVA) para número de UFCs de *Streptococcus sobrinus*

A Figura 5.2 representa graficamente o número de UFCs de *S. sobrinus* aderidas aos blocos de resina dos dois grupos analisados. Diferença significativa entre os grupos experimentais foi observada apenas no último tempo (64 horas) quando o grupo contendo MDPB apresentou número de UFCs significativamente menor que no grupo controle ($p < 0.05$). O número de UFCs aderidas ao grupo com MDPB mostrou-se homogêneo no decorrer do estudo, ao passo que no grupo controle houve um aumento significativo ao final do experimento ($p < 0.01$).

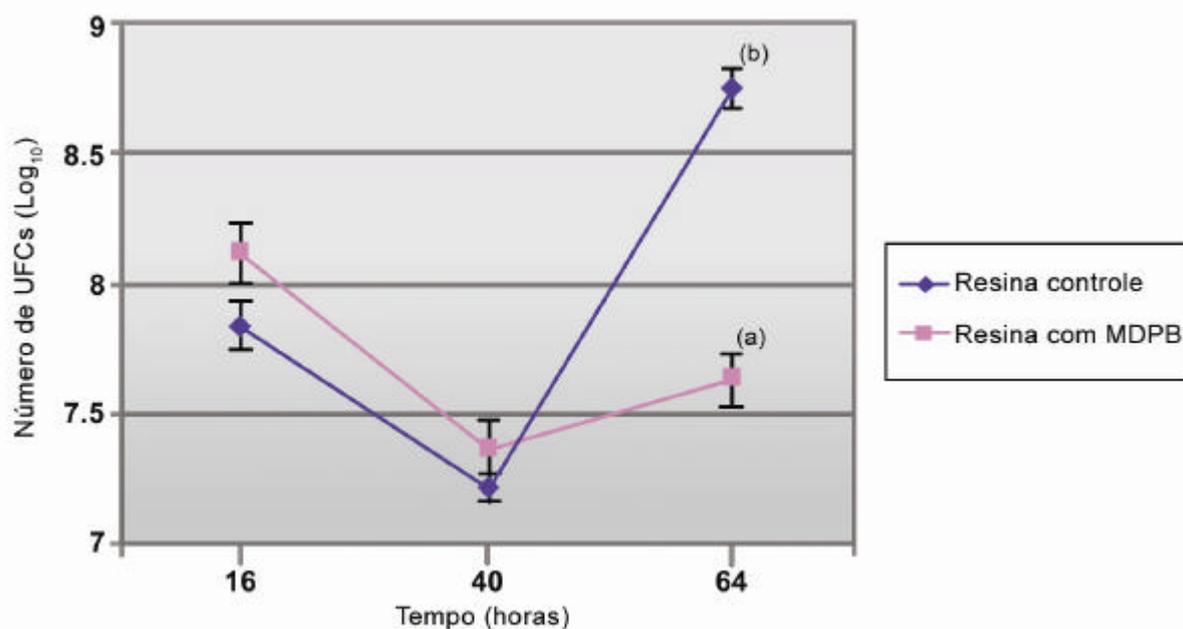


Figura 5.2 – Representação gráfica do número de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) de *Streptococcus sobrinus* nos grupos experimentais em função do tempo. Observe que o número de UFCs aderidas ao grupo da resina com MDPB foi significativamente menor que o do grupo controle em 64 horas (a; $p < 0.05$). O número de UFCs aderidas ao grupo controle em 64 horas foi significativamente maior que o do mesmo grupo em 40 horas (b; $p < 0.01$). As barras verticais representam o Erro Padrão da média

6 DISCUSSÃO

A adição de compostos com atividade antibacteriana a materiais restauradores tem sido uma das metas dos novos materiais em Odontologia visando prevenir os efeitos nocivos causados pelas bactérias bucais e, assim, acautelar o aparecimento de recidiva de cárie. A incidência de cáries recorrentes em restaurações de resina composta preocupa os cirurgiões-dentistas, uma vez que a cárie secundária é considerada a principal razão para a troca de restaurações (WILSON; BURKE; MJÖR, 1997; MJÖR, 1998). Entre os principais microorganismos cariogênicos destacam-se os estreptococos do grupo mutans (EGM) (GIBBONS; COHEN; HAY, 1986; LOESCHE, 1986; van HOUTE, 1980). São conhecidas sete espécies de EGM, que demonstraram heterogeneidade genética, sendo *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* os EGM mais encontrados em humanos (BALAKRISHNAN; SIMMONDS; TAGG, 2000).

Foi demonstrado em experimentos *in vitro* que monômero brometo de metacrilóiloxidodecílpiridínio (MDPB), apresentado por Imazato, Torii e Tsuchitani (1993), apresenta efeito antibacteriano e capacidade de co-polimerizar com outros monômeros, podendo ser acrescentado a materiais resinosos levando à inibição do crescimento bacteriano e do acúmulo de biofilme formado por *Streptococcus mutans* em sua superfície. Além do *S. mutans*, outras bactérias do biofilme bucal participam da formação da cárie dental, tanto primária quanto secundária. Imazato, Torii e Tsuchitani (1993) mostraram que o crescimento de *S. sobrinus* contendo MDPB foi inibido e o melhor resultado ocorreu na concentração de 0.2 %, porém a avaliação foi realizada para um período único de incubação (24 horas). Além disso, ocorreu um

aperfeiçoamento na produção da resina composta com MDPB, sendo sua concentração final de 2.83 % de MDPB determinada com a ideal.

O presente estudo objetivou reavaliar a ação da resina composta contendo o monômero brometo de metacrilóiloxidodecílpiridínio sobre microorganismos do grupo mutans representado por *S. sobrinus*, mas também se tem condições de afetar a colonização por outros microorganismos orais, considerados benéficos, associados ao biofilme dental compatível com saúde, como o *S. sanguinis*. A escolha destes microorganismos justifica-se pois o *S. sanguinis* é um colonizador primário do biofilme. Por outro lado, *S. sobrinus* é um microorganismo cariogênico, considerado mais virulento que o *S. mutans* por produzir maior quantidade de polímeros insolúveis glucanos a partir da sacarose que o *S. mutans*, propiciando a alteração físico-química do ambiente da placa e promovendo sua adesão e agregação. Este microorganismo é usado em vários experimentos *in vitro* e em animais para testar medidas preventivas (BALAKRISHNAN; SIMMONDS; TAGG, 2000).

Foram preparados blocos de resina teste e controle como descrito por Montanaro et al. (2004). Optou-se por obter a lisura superficial dos blocos de resina com o emprego de tiras de matriz de poliéster e lâminas de vidro, restringindo-se o polimento com sistema de lixas às laterais, que apresentavam rebarbas de material. A lisura obtida foi satisfatória, conferindo à superfície dos blocos de resina um aspecto vitrificado.

Durante o preparo dos blocos de resina foi observado, como já havia sido descrito por Imazato et al. (1999a) e Ebi et al. (2001), que a resina com MDPB apresenta rápida descoloração após a polimerização. Apresentando cor intensamente amarelada, tornou-se esbranquiçada imediatamente após a fotoativação. Esta característica impede seu uso comercial – já que a estabilidade de

cor é uma propriedade fundamental para um material restaurador estético – e permanece como uma propriedade a ser aperfeiçoada.

Utilizando cepas de cariogenicidade estabelecida e conhecida de *S. sanguinis*, ocorreu aderência desta bactéria em número significativamente maior sobre a resina contendo o monômero MDPB do que sobre a resina convencional sem MDPB, ao menos nas primeiras horas de inoculação. Com relação ao *S. sobrinus*, a inoculação – também realizada com cepas de cariogenicidade estabelecida e conhecida – revelou que, ao contrário do *S. sanguinis*, o *S. sobrinus* aderiu em número significativamente menor à resina com MDPB que à resina controle ao final do tempo experimental.

A metodologia de formação de biofilme sobre superfícies teste, no caso do presente estudo resina composta contendo ou não o monômero MDPB, está consagrada na literatura. Guggenheim et al. (2001) consideram este modelo extremamente útil para estudos de adesão e co-agregação bacteriana, organização espacial de biofilme e testes pré-clínicos de agentes antibiofilme. No modelo original (GUGGENHEIM et al., 2001) diversas bactérias do biofilme bucal são acrescentadas ao meio de cultura, na tentativa de reproduzir, de maneira mais fidedigna o biofilme supragengival. Este estudo, no entanto, utilizou as cepas bacterianas isoladamente, visando facilitar a interpretação dos dados e a avaliação do comportamento individual das bactérias na presença do monômero testado. Mas, sendo o *S. sanguinis* um colonizador primário do biofilme que pode interagir com as bactérias patogênicas deste ambiente, seria interessante testar a ação do MDPB em um modelo de biofilme polimicrobiano.

O modelo de biofilme empregado neste estudo preconiza a formação da película adquirida sobre as amostras previamente à incubação bacteriana. Este

passo foi rigorosamente seguido como descrito por Guggenheim et al. (2001), mantendo-se as amostras imersas em saliva por 4 horas, sob agitação leve. Além disso, as amostras eram inoculadas com 50 % de meio de cultura e 50 % de saliva humana. A complementação do meio de cultura com saliva é uma tentativa de reproduzir, com maior fidelidade, a realidade bucal.

Na presença de película adquirida o *S. sanguinis* é o primeiro microorganismo a aderir e colonizar as superfícies duras da boca. Além de aderir à película adquirida, o *S. sanguinis* interage com outros componentes salivares como imunoglobulina A, mucina, aglutinina e α -amilase (KAWASHIMA et al., 2003). Por isso, a presença de saliva no experimento se tornou indispensável. No entanto, o *S. sobrinus* parece ter baixa afinidade aos componentes salivares (KAWASHIMA et al., 2003). Sua aderência às superfícies dentais parece não depender da presença da película adquirida (GIBBONS; COHEN; HAY, 1986) e nem mesmo sua adesão ao *S. sanguinis* seria influenciada pela saliva (LAMONT et al., 1991).

O meio de cultura utilizado no estudo associa o uso de dois açúcares no momento das trocas de meio. Este fator seria de importância na formação do biofilme sobre as amostras uma vez que a estrutura do biofilme desenvolvido na presença de glicose ou sacarose difere. Na presença de sacarose as bactérias formam grandes agregados em virtude da produção de glucanos extracelulares - importantes no desenvolvimento de uma arquitetura de biofilme madura - embora o *S. mutans* se desenvolva com índice exponencial semelhante em ambos os açúcares (RENYE et al., 2004). No experimento realizado por Imazato et al. (2003) as amostras foram incubadas em um meio suplementado apenas com extrato de levedura, mas sem a adição de açúcares.

A metodologia utilizada para mensuração do número de UFCs aderidas aos blocos de resina testados é de simples execução e assemelha-se à empregada por Ebi et al. (2001) e Imazato et al. (2003) em estudos que testaram a mesma resina composta contendo MDPB avaliada no presente trabalho. Ambos os estudos realizaram contagem de colônias em placas inoculadas com diluições referentes às bactérias. Para inoculação das diluições empregou-se a técnica da gota (MILES; MISRA; IRURN, 1938). Por este método cada placa com meio de cultura ágar recebe triplicata de três diluições. Após 48 horas de incubação, a contagem das colônias formadas é realizada na porção da placa referente à diluição que apresentar entre 10 e 100 colônias. Esta metodologia permite o uso de um menor número de placas de cultura, algo indispensável quando o experimento compreende um grande número de amostras. A utilização de lupa facilita a contagem das UFCs formadas.

Apesar das diferenças nas metodologias, como uso da saliva ou método de análise antibacteriana, utilizada por outros autores e no presente trabalho, é importante observar que os resultados apontaram para uma atividade antibacteriana do MDPB. Diferenças marcantes encontradas nas contagens de UFCs de *S. mutans* por Ebi et al. (2001) e Imazato et al. (2003), quando comparadas às diferenças mais sutis encontradas para o número de UFCs de *S. sanguinis* e *S. sobrinus* no presente trabalho podem estar relacionadas à presença de saliva na película e no meio de cultura. Para o grupo tratado com saliva, Imazato et al. (2003) encontraram, após 18 horas de incubação, diferenças na ordem de 10^3 entre o grupo controle e o grupo com MDPB. A comparação dos resultados do presente estudo com o realizado por Ebi et al. (2001) torna-se complexa já que os autores apresentam os resultados em porcentagem de redução do acúmulo de biofilme. Ainda assim, pode-se considerar

que seus resultados são semelhantes aos deste estudo. Três ciclos de 24 horas de incubação de amostras em meio de cultura com *S. mutans* apontaram redução de 14.2, 13.6, e 17.9 % no acúmulo de biofilme para os blocos tratados com saliva previamente à incubação. No presente estudo, as diferenças entre os níveis de *S. sobrinus* aderidos à resina com MDPB foi menor que os aderidos à resina controle na ordem de 10 no último tempo experimental (64 horas).

Nos estudos de Ebi et al. (2001) e Imazato et al. (2003) a formação de película adquirida, previamente à incubação, foi executada em metade das amostras testadas. Ebi et al. (2001) encontraram 35.9, 20.5 e 28.9 % de inibição do crescimento bacteriano nos três ciclos de incubação no grupo que não recebeu tratamento prévio com saliva. Os dados obtidos para amostras não tratadas com saliva por Imazato et al. (2003) demonstraram inibição do crescimento bacteriano na ordem de 10^6 , sendo esta diferença reduzida para 10^3 , como anteriormente citado, no grupo previamente tratado com saliva.

A saliva permaneceu presente no meio durante todo o tempo experimental. Desta forma, os efeitos antibacterianos específicos da saliva, como por exemplo a presença de imunoglobulina A, podem ter atenuado a adesão bacteriana em ambos os grupos. Ao contrário dos autores que utilizaram apenas um doador de saliva, este estudo foi realizado com um *pool* de saliva obtida de cinco doadores. Esta diversidade parece importante visto que a presença de componentes salivares que interferem na adesão de bactérias pode variar entre os indivíduos (MARCOTTE; LAVOIE, 1998). Visando aproximar o método de análise *in vitro* da situação do biofilme *in vivo*, acreditamos que a presença da saliva no meio é de relevância para avaliar a influência da adsorção de proteínas na atividade antibacteriana. Por isso,

em futuros estudos de adesão bacteriana a presença de saliva é importante tanto na formação de película adquirida previamente à incubação quanto no meio de cultura.

O aumento da adesão do *S. sanguinis* pode ser benéfico. Sendo o *S. sanguinis* considerado uma bactéria comensal associada à saúde (BECKER et al. 2002) e que apresenta baixo potencial cariogênico (CAUFIELD et al., 2000; CHESTNUTT; MACFARLANE; STEPHEN, 1994) esta poderia competir por sítios para colonização da superfície dental em detrimento de bactérias patogênicas, como *S. mutans* e *S. sobrinus*. Além disso, Caufield, Cutter e Dasanayake (1993) observaram que a proporção entre *S. mutans* e *S. sanguinis* pode servir de indicador de risco à cárie. Crianças com níveis de EGM não-detectáveis apresentaram maior nível de *S. sanguinis* na saliva do que as crianças colonizadas por EGM. Este dado indica que pode haver uma competição entre estas espécies na colonização das superfícies dentais e que um pode afetar a colonização do outro. Por outro lado, Takahashi e Yamada (1999) consideram que cepas de estreptococos não pertencentes ao grupo mutans, até mesmo o *S. sanguinis*, por serem pioneiras na formação do biofilme bucal, podem agir como modificadores deste meio tornando-o ácido e, subsequentemente favorecendo a colonização por bactérias tolerantes aos ácidos e acidogênicas como estreptococos do grupo mutans (EGM) e lactobacilos. Além disso, Lamont et al. (1991) e Decker et al. (2003) relatam que *S. mutans* e *S. sobrinus* poderiam ter sua adesão às superfícies dentárias facilitada co-agregando com cepas de *S. sanguinis* já instaladas. Neste caso o *S. sanguinis* estaria favorecendo a adesão de bactérias envolvidas no processo cariioso.

Nossos achados concordam com os de Imazato, Torii e Tsuchitani (1993) que mostraram que o crescimento de *S. sobrinus* contendo MDPB foi inibido e o melhor resultado ocorreu na concentração de 0.2 %. O MDPB parece não ter inibido a

adesão inicial das bactérias, já que a resina testada apresenta características de superfície similares às da resina controle e, além disso, a carga positiva do átomo nitrogênio do anel piridínio pode ter tendência a interagir facilmente com a parede celular (Ebi et al. 2001). Contudo, depois de aderido, a proliferação do *S. sobrinus* foi inibida pelo agente bactericida imobilizado na superfície dos blocos de resina com MDPB, conduzindo à supressão da síntese de matriz extracelular. Estes resultados são semelhantes aos encontrados por Ebi et al. (2001) para os testes com *S. mutans*. Parece que o comportamento do MDPB em relação ao *S. sobrinus* é similar à sua ação sobre o *S. mutans*.

O MDPB demonstra ação antibacteriana sobre *S. mutans* e *S. sobrinus*, mas favorece a adesão do *S. sanguinis*. Desta forma o MDPB estaria, teoricamente, favorecendo a formação de um biofilme não-cariogênico. Assim, apesar do problema relacionado com a instabilidade de cor, o MDPB não altera propriedades físicas das resinas compostas, não é citotóxico e apresenta atividade antibacteriana somente sobre bactérias aderidas à superfície da resina, sem liberar agentes antimicrobianos para o meio bucal, evitando assim efeitos colaterais como mudança indesejável da microbiota bucal. O mecanismo do MDPB na inibição da bactéria necessita investigação. Novos estudos relacionados do monômero antibacteriano MDPB devem ser feitos no sentido de testar seus efeitos quando incorporado a outras substâncias resinosas, como por exemplo, a sistemas adesivos.

7 CONCLUSÃO

Os resultados permitem concluir que:

O MDPB favorece uma maior adesão inicial do *Streptococcus sanguinis* sobre blocos de resina.

O MDPB controla a adesão do *Streptococcus sobrinus* sobre blocos de resina mantendo o número de UFCs em níveis baixos.

REFERÊNCIAS¹

Balakrishnan M, Simmonds RS, Tagg JR. Dental caries is a preventable infectious disease. *Aus Dent J* 2000;45(4):235-45.

Becker MR, Paster BJ, Leys EJ, Moeschberger ML, Kenyon SG, Galvin JL, et al. Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries. *J Clin Microbiol* 2002;40(3):1001-09.

Bowden GHW. Microbiology of root surface caries in humans. *J Dent Res* 1990;69:1205-10.

Boyar RM, Bowden GH. The microflora associated with the progression of incipient carious lesions in teeth of children living in a water fluoridated area. *Caries Res* 1985;19:298-306.

Brown LR, Billings RJ, Kaster AG. Quantitative comparisons of potentially cariogenic microorganisms cultured from noncarious and carious root and coronal tooth surfaces. *Infect Immun* 1986;51(3):765-70.

Caufield PW, Cutter GR, Dasanayake AP. Initial acquisition of mutans streptococci by infants: evidence for a discrete window of infectivity. *J Dent Res* 1993;72:37-45.

Caufield PW, Dasanayake AP, Li Y, Pan Y, Hsu J, Hardin JM. Natural history of *Streptococcus sanguinis* in the oral cavity of infants: evidence for a discrete window of infectivity. *Infect Immun* 2000;68(7):4018-23.

Chestnutt IG, MacFarlane TW, Stephen KW. An *in vitro* investigation of the cariogenic potential of oral streptococci. *Arch Oral Biol* 1994;39:589-93.

Decker EM, Weiger R, Wiech I, Heide PE, Brex M. Comparison of antiadhesive and antibacterial effects of antiseptics on *Streptococcus sanguinis*. *Eur J Oral Sci* 2003;111:144-48.

Ebi N, Imazato S, Noiri Y, Ebisu S. Inhibitory effects of resin composite containing bactericide-immobilized filler on plaque accumulation. *Dent Mater* 2001;17:485-91.

¹ De acordo com Estilo Vancouver. Abreviatura de periódicos segundo base de dados MEDLINE.

Emilson CG, Carlsson P, Bratthall D. Strains of mutans streptococci isolated in a population with extremely low caries prevalence are cariogenic in the hamster model. *Oral Microbiol Immunol* 1987;2:183-86.

Fejerskov O. Changing paradigms in concepts on dental caries: consequences for oral health care. *Caries Res* 2004;38:182-91.

Gibbons RJ, Cohen L, Hay DI. Strains of *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* attach to different pellicle receptors. *Infect Immun* 1986;52(2):555-61.

Gmür R, Guggenheim B. Antigenic heterogeneity of *Bacteroides intermedius* as recognized by monoclonal antibodies. *Infect Immun* 1983;42(2):459-70.

Guggenheim B, Giertsen E, Schüpbach P, Shapiro S. Validation of an *in vitro* biofilm model of supragingival plaque. *J Dent Res* 2001;80(1):363-70.

Imazato S. Antibacterial properties of resin composites and dentin bonding systems. *Dent Mater* 2003;19:449-57.

Imazato S, McCabe JF. Influence of incorporation of antibacterial monomer on curing behavior of a dental composite. *J Dent Res* 1994;73(10):1641s-45s.

Imazato S, Russell RRB, McCabe JF. Antibacterial activity of MDPB polymer incorporated in dental resin. *J Dent* 1995;23(3):177-81.

Imazato S, Torii M, Tsuchitani Y. Immobilization of an antibacterial component in composite resin. *Dent Jpn* 1993;30:63-68.

Imazato S, Tarumi H, Kato S, Ebisu S. Water sorption and colour stability of composites containing the antibacterial monomer MDPB. *J Dent* 1999a;27(4):279-83.

Imazato S, Imai T, Russell RRB, Torii M, Ebisu S. Antibacterial activity of cured dental resin incorporating the antibacterial monomer MDPB and an adhesion-promoting monomer. *J Biomed Mater Res* 1998;39:511-15.

Imazato S, Torii M, Tsuchitani Y, McCabe JF, Russell RRB. Incorporation of bacterial inhibitor into resin composite. *J Dent Res* 1994;73(8):1437-43.

Imazato S, Ebi N, Takahashi Y, Kanebo T, Ebisu S, Russell RRB. Antibacterial activity of bactericide-immobilized filler for resin-based restoratives. *Biomaterials* 2003;24:3605-09.

Imazato S, Ebi N, Tarumi H, Russel RRB, Kanebo T, Ebisu S. Bactericidal activity and cytotoxicity of antibacterial monomer MDPB. *Biomaterials* 1999b;20(9):899-903.

Jedrychowski JR, Caputo AA, Kerper S. Antibacterial and mechanical properties of restorative materials combined with chlorhexidines. *J Oral Rehabil* 1983;10:373-81.

Jenkinson HF, Lamont RJ. Streptococcal adhesion and colonization. *Crit Rev Oral Biol Med* 1997;8(2):175-200.

Jenkinson HF, Lappin-Scott HM. Biofilms adhere to stay. *Trends Microbiol* 2001;9(1):9-10.

Kawashima M, Hanada N, Hamada T, Tagami J, Senpuku H. Real-time interaction of oral streptococci with human salivary components. *Oral Microbiol Immunol* 2003;18:220-25.

Kidd EAM. Diagnosis of secondary caries. *J Dent Educ* 2001;65(10):997-1000.

Köhler B, Brattall D, Krasse B. Preventive measures in mothers influence the establishment of the bacterium *Streptococcus mutans* in their infants. *Arch Oral Biol* 1983;28:225-31.

Lamont RJ, Rosan B. Adherence of mutans streptococci to other oral bacteria. *Infect Immun* 1990;58(6):1738-43.

Lamont RJ, Demuth DR, Davis CA, Malmud D, Rosan B. Salivary-agglutinin-mediated adherence of *Streptococcus mutans* to early plaque bacteria. *Infect Immun* 1991;59(10):3446-50.

Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev* 1986;50(4):353-80.

Loesche WJ, Hockett RN, Syed SA. The predominant cultivable flora of tooth surface plaque removed from institutionalized subjects. *Arch Oral Biol* 1972;17(9):1311-25.

Loesche WJ, Eklund S, Earnest R, Burt B. Longitudinal investigation of bacteriology of human fissure decay: epidemiological studies in molars shortly after eruption. *Infect Immun* 1984;46:765-72.

Marcotte H, Lavoie MC. Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin A. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998;62(1):71-109.

Marsh PD. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiol* 2003a;149:279-94.

Marsh PD. Dental plaque as a microbial biofilm. *Caries Res* 2004;38:204-11.

Marsh PD. Plaque as a biofilm: pharmacological principles of drug delivery and action in the sub- and supragingival environment. *Oral Dis* 2003b;9(Suppl.1):16-22.

Miles AA, Misra SS, Iurn JO. The estimation of the bacterial power of the blood. *J Hyg* 1938;38:732-49.

Mjör IA. The location of clinically diagnosed secondary caries. *Quintessence Int* 1998;29:313-17.

Mjör IA, Toffenetti F. Secondary caries: a literature review with caries reports. *Quintessence Int* 2000;31(3):165-79.

Montanaro L, Campoccia D, Rizzi S, Donati ME, Breschi L, Prati C, et al. Evaluation of bacterial adhesion of *Streptococcus mutans* on dental restorative materials. *Biomaterials* 2004;25:4457-63.

Murray PA, Prakobphol A, Lee T, Hoover CI, Fisher SJ. Adherence of oral streptococci to salivary glycoproteins. *Infect Immun* 1992;60(1):31-38.

Renye JA, Piggot JP, Daneo-Moore L, Buttaro BA. Persistence of *Streptococcus mutans* in stationary-phase batch cultures and biofilms. *Appl Environ Microbiol* 2004;70(10):6181-87.

Ribeiro J, Ericson D. *In vitro* antibacterial effect of chlorhexidine added to glass ionomer cements. Scand J Dent Res 1991;99:533-40.

Rickard AH, Gilbert P, High NJ, Kolenbrander PE, Handley PS. Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. Trends Microbiol 2003;11(2):94-100.

Rosan B, Lamont RJ. Dental plaque formation. Microbiol Infect 2000;2:1599-1607.

Takahashi N, Yamada T. Acid-induced acid tolerance and acidogenicity of non-mutans streptococci. Oral Microbiol Immunol 1999;14:43-48.

Tamesada M, Kawabata S, Fujiwara T, Hamada S. Synergistic effects of streptococcal glucosyltransferases on adhesive biofilm formation. J Dent Res 2004;83(11):874-79.

Tanzer JM, Livingston J, Thompson AM. The microbiology of primary dental caries in humans. J Dent Educ 2001;65(10):1028-37.

van Houte J. Bacterial specificity in the etiology of dental caries. Int Dent J 1980;30:305-26.

van Nieuw Amerongen A, Bolscher JGM, Veerman ECI. Salivary proteins: protective and diagnostic value in cariology? Caries Res 2004;38:247-53.

Wilson NHF, Burke FJT, Mjör IA. Reasons for placement and replacement of restorations of direct restorative materials by a selected group of practitioners in the United Kingdom. Quintessence Int 1997;28:245-48.

APÊNDICE A – Termo de consentimento esclarecido para doação de saliva

INSTRUMENTO DE DOAÇÃO DE SALIVA

Identificação do Doador

Nome (Legível):.....
 Data de Nascimento:.....Local de Nascimento:UF:.....
 RG nº:.....CPF nº:.....
 Endereço (Rua ou Avenida nº e complemento):
 Cidade.....:.....UF:..... CEP:.....
 Telefones para contato:.....
 E-mail:.....

DECLARAÇÃO

Declaro ter sido esclarecido sobre quais os motivos pelos quais estou doando saliva e concordo que seja utilizada na pesquisa de título “Análise *in vitro* do efeito inibitório da adesão bacteriana à resina composta contendo o monômero antibacteriano MDPB por um modelo de biofilme” - que objetiva estudar a inibição da adesão de bactérias a um material restaurador.

Fui ainda esclarecido pelo pesquisador que minha identidade não será divulgada por qualquer meio e que o material recolhido será utilizado unicamente para a presente pesquisa.

São Paulo,.....de.....de 200...

.....

Assinatura

APÊNDICE B – Estatística descritiva para *Streptococcus sanguinis*.

	1	2	3	4	5	6
Tamanho da amostra =	3	3	3	3	3	3
Mínimo	8.0637	9.2584	8.7582	8.1377	8.2041	8.6294
Máximo	8.3235	9.3066	8.9031	8.9243	8.9445	9.2455
Amplitude Total	0.2597	0.0482	0.1449	0.7866	0.7404	0.6161
Mediana	8.0792	9.2648	8.8325	8.8882	8.8237	9.1290
Primeiro Quartil (25%)	8.0714	9.2616	8.7953	8.5129	8.5139	8.8792
Terceiro Quartil (75%)	8.2013	9.2857	8.8678	8.9062	8.8841	9.1873
Desvio Interquartílico	0.1299	0.0241	0.0725	0.3933	0.3702	0.3081
Média Aritmética	8.1554	9.2766	8.8313	8.6500	8.6574	9.0013
Variância	0.0212	0.0007	0.0053	0.1972	0.1578	0.1071
Desvio Padrão	0.1457	0.0262	0.0725	0.4441	0.3972	0.3273
Erro Padrão	0.0841	0.0151	0.0418	0.2564	0.2293	0.1890
Coefficiente de Variação	1.79%	0.28%	0.82%	5.13%	4.59%	3.64%
Assimetria (g1)	1.7101	1.6158	-0.0781	-1.7192	-1.5537	-1.4886
Curtose (g2)	---	---	---	---	---	---
Média Harmônica =	8.1537	9.2766	8.8309	8.6344	8.6450	8.9932
N (média harmônica) =	3	3	3	3	3	3
Média Geométrica =	8.1546	9.2766	8.8311	8.6423	8.6513	8.9973
N (média geométrica) =	3	3	3	3	3	3
Variância (geom.) =	1.0001	1.0000	1.0000	1.0012	1.0009	1.0006
Desvio Padrão (geom.) =	1.0179	1.0028	1.0082	1.0535	1.0476	1.0374

APÊNDICE C – Estatística descritiva para *Streptococcus sobrinus*.

	1	2	3	4	5	6
Tamanho da amostra =	3	3	3	3	3	3
Mínimo	7.6294	7.9823	7.1541	7.1159	8.5870	7.4255
Máximo	7.9573	8.3345	7.2217	7.5228	8.8491	7.8062
Amplitude Total	0.3279	0.3522	0.0676	0.4069	0.2620	0.3806
Mediana	7.8692	8.0056	7.2076	7.4633	8.8325	7.7045
Primeiro Quartil (25%)	7.7493	7.9939	7.1809	7.2896	8.7098	7.5650
Terceiro Quartil (75%)	7.9133	8.1700	7.2147	7.4931	8.8408	7.7553
Desvio Interquartílico	0.1640	0.1761	0.0338	0.2034	0.1310	0.1903
Média Aritmética	7.8187	8.1074	7.1945	7.3674	8.7562	7.6454
Variância	0.0288	0.0388	0.0013	0.0483	0.0215	0.0388
Desvio Padrão	0.1697	0.1969	0.0356	0.2198	0.1467	0.1971
Erro Padrão	0.0980	0.1137	0.0206	0.1269	0.0847	0.1138
Coefficiente de Variação	2.17%	2.43%	0.50%	2.98%	1.68%	2.58%
Assimetria (g1)	-1.2220	1.7047	-1.4347	-1.5901	-1.7073	-1.2279
Curtose (g2)	---	---	---	---	---	---
Média Harmônica =	7.8162	8.1043	7.1944	7.3629	8.7545	7.6420
N (média harmônica) =	3	3	3	3	3	3
Média Geométrica =	7.8174	8.1059	7.1944	7.3651	8.7554	7.6437
N (média geométrica) =	3	3	3	3	3	3
Variância (geom.) =	1.0002	1.0003	1.0000	1.0004	1.0001	1.0003
Desvio Padrão (geom.) =	1.0220	1.0244	1.0050	1.0305	1.0170	1.0263

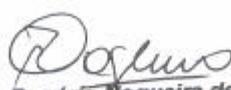
ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA****PARECER DE APROVAÇÃO
Protocolo 37/05**

O Grupo de Trabalho indicado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, **APROVOU** o protocolo de pesquisa "*Análise in vitro do efeito inibitório da adesão bacteriana à resina composta contendo o monômero antibacteriano MDPB por um modelo de biofilme*"; de responsabilidade da Pesquisadora **Thais Thomé**, sob orientação da Professora Doutora **Márcia Martins Marques**.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios anuais referentes ao andamento da pesquisa e ao término cópia do trabalho em "cd". Qualquer emenda do projeto original deve ser apresentada a este CEP para apreciação, de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 07 de abril de 2005


Prof. Dr. **Rogério Nogueira de Oliveira**
Coordenador do CEP-FOUSP

ANEXO B – Preparo da base do meio de cultura mFUM

O preparo do meio de cultura fluído – FUM – (GMÜR; GUGGENHEIM, 1983) foi realizado como originalmente descrito por Loesche, Hockett e Syed (1972).

Em 475 ml de água destilada foram adicionados:

10 g de triptone

5 g de extrato de levedura

2 mg de hemina

2.9 g de NaCl

1 g de KNO_3

0.45 g de K_2HPO_4

0.45 g de KH_2PO_4

0.9 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

0.188 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

A mistura foi levada ao forno de microondas por um minuto para favorecer a dissolução. A seguir foram acrescentados 500 ml de tampão de Sørensen (2X).

O meio foi suprido com tampão de Sørensen. Para obter-se a concentração de 67 mmol por litro a quantidade necessária dos componentes das soluções de fosfato de sódio e fosfato de potássio dibásico foi calculada pela divisão da massa por 15. Para atingir a concentração final de 67 mmol no meio de cultura, as soluções foram preparadas em 500 ml de água, mas com a quantidade de componente correspondente a um litro.

A solução de fosfato de sódio foi preparada pela dissolução de 9,47 g de Na_2HPO_4 em água destilada e completou-se até 500 ml. A solução de fosfato de

potássio dibásico foi preparada dissolvendo-se 9,078 g de KH_2PO_4 em água destilada e completando-se até 500 ml. Para que o tampão de Sørensen atingisse o pH 7.2, foram misturados 350 ml de solução de Na_2HPO_4 (70 %) e 150 ml de solução de KH_2PO_4 (30 %).

A solução tampão pronta foi misturada ao meio FUM.

ANEXO C – Preparo da Solução Estoque de Menadione

0.2 g de menadione

2 ml de etanol

18 ml de água destilada estéril

Pesar a menadione em papel alumínio estéril. Adicionar a 2 ml de etanol em um tubo estéril. Adicionar os 18 ml de água destilada. Guardar em geladeira por até 3 meses.

ANEXO D – Preparo da Solução Estoque de Carbonato de Sódio

1 g de Na_2CO_3

10 ml de água de Milli Q

Dissolver 1 g de Na_2CO_3 em 10 ml de água de Milli Q. Esterilizar a mistura por filtração em fluxo laminar.

ANEXO E – Preparo da Solução Estoque de Glicose-Cisteína-DDT

7.5 g de glicose

1.25 g de cisteína hidrocloreada

0.25 g de ditiotreitol

Em água de Milli Q, misturar a glicose, a cisteína e o DDT. Dissolver e completar o volume até 50 ml. Esterilizar a mistura por filtração em fluxo laminar.

ANEXO F – Preparo da Solução Estoque de Sacarose-Cisteína-DDT

7.5 g de sacarose

1.25 g de cisteína hidrociorada

0.25 g de ditiotreitotol

Em água de Milli Q, misturar a sacarose, a cisteína e o DDT. Dissolver e completar o volume até 50 ml. Esterilizar a mistura por filtração em fluxo laminar.