

BIOFILME: AVALIAÇÃO DO NÍVEL DE CONTAMINAÇÃO DE ESCOVAS DENTAIS MONOBLOC® EM FUNÇÃO DO DENTIFRÍCIO

*BIOFILM: EVALUATION OF CONTAMINATION LEVEL ON MONOBLOC® TOOTHBRUSHES
IN FUNCTION OF DENTIFRICE*

Lima, Marcelo van Vliet*
Watanabe, Evandro**
Faria, Gisele***
Nascimento, Andresa Piacuzzi****
Verri, Maraísa Palhão*****
Ito, Izabel Yoko*****

RESUMO

A escova dental pode se tornar um veículo de disseminação de microrganismos da boca. O objetivo deste estudo foi avaliar, *in vivo*, a contaminação de estreptococos do grupo mutans (EGM) em escovas dentais Monobloc®, que foram usadas uma única vez por 2,0min, em função de 2 diferentes tipos de dentifrício. O estudo clínico randomizado foi realizado em 3 etapas (I, II, III), por 52 estudantes de farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP. Na etapa I, os alunos efetuaram a escovação sem a utilização de dentifrício. Na etapa II, utilizaram o dentifrício Sorriso Super Refrescante®, sem agente antimicrobiano, e na etapa III, o dentifrício Colgate Tripla Ação®, com agente antimicrobiano triclosan. Apenas 30 (57,7%) dos 52 estudantes foram considerados para o estudo. Ao término de cada escovação, as escovas permaneceram em suporte por 1h e depois foram semeadas em tubo de ensaio com meio de cultura CaSa B. Decorrido o período de incubação, o número de unidades formadoras de colônia/biofilme nas hastilhas das escovas foram analisadas, com auxílio de um microscópio estereoscópico. O biofilme de EGM estava presente em 22 (73,3%) escovas utilizadas na etapa I, em 4 (18,2%) da etapa II, e em nenhuma da etapa III. Em conclusão, não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre os resultados dos dentifrícios. O uso de ambos reduziu a formação de biofilme de EGM nas hastilhas das escovas dentais ($p < 0,05$).

UNITERMOS: biofilmes; dentifrícios; escovação dentária.

SUMMARY

The toothbrush might become a dissemination source of oral cavity microorganisms. The aim of this study was to evaluate, in vivo, the mutans group streptococci (MGS) contamination on Monobloc® toothbrushes, that they were used once for 2.0min, in function of 2 different types of dentifrice. The randomized clinical trial was realized in 3 steps (I, II, III) by 52 pharmacy students at Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto – USP. At step I, the students did toothbrushing without dentifrice. At step II, they used Sorriso Super

* Aluno de Iniciação Científica do Laboratório de Microbiologia, Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP

** Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP

*** Professora Mestre do Departamento de Clínica Infantil, Odontologia Preventiva e Social da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP

**** Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP

***** Técnica Farmacêutica da Disciplina de Microbiologia, Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP

***** Professora Doutora do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP

Refrescante® dentifrice without antimicrobial agent, and at step III, Colgate Tripla Ação® dentifrice with triclosan antimicrobial agent. Only 30 (57.7%) from 52 students were considerate for this study. At the end of each toothbrushing, the toothbrushes were stored in upright position for 1h and after they were put in test tubes with CaSa B culture media. After the incubation period, the number of colony/biofilm forming units on toothbrushes "spears" was examined under a stereoscope microscope. MGS biofilm was present in 22 (73.3%) toothbrushes at step I, in 4 (18.2%) at step II, and none at step III. In conclusion, there was no significant statistical difference between dentifrice results ($p > 0.05$). Both using reduced MGS biofilm formation on toothbrushes "spears" ($p < 0.05$).

UNITERMS: biofilms; dentifrices; toothbrushing.

INTRODUÇÃO

A transmissão da microbiota cariogênica, entre crianças, ocorre principalmente, via saliva, tendo como fonte a mãe (Newbrun, 1992; Li et al., 1995), ou outras pessoas com as quais a criança convive amiudadamente, dentro da unidade familiar (Azevedo, 1988). A disseminação dos estreptococos do grupo mutans ocorre por meio de contatos diretos (via saliva), ou indiretos (Newbrun, 1992), que podem ser via fômites como colheres (Kohler et al., 1978), xícaras, brinquedos ou escovas dentais contaminadas (Svanberg, 1978; Newbrun, 1992).

As escovas dentais tornam-se contaminadas por microrganismos da boca (Nelson-Filho et al., 2000; 2004), funcionando como veículo de reintrodução e vetor de translocação intra-oral de bactérias como estreptococos do grupo mutans (Quirynen et al., 2003). Esse fato é de fundamental importância em um país como o Brasil, onde a frequência de uso coletivo/comunitário das escovas é elevada, particularmente nas famílias de baixo nível socioeconômico (Paschoal et al., 1992). Eventualmente, também pode acontecer contato entre as escovas de membros da família, que muitas vezes são guardadas em recipientes sobre a pia ou nos armários de banheiro (Fratto et al., 1990). Além disso, há uma enorme dificuldade em controlar a ocorrência de contato salivar entre indivíduos, principalmente em ambientes como creches, pré-escolas e outras instituições que abrigam crianças de idade precoce (Malmberg et al., 1994), podendo a escova ser trocada e/ou compartilhada, inadvertidamente.

Uma vez que, atualmente, a Odontologia enfatiza os conceitos de biossegurança, as escovas dentais deveriam ser sanitizadas/desinfetadas e trocadas em períodos de tempo regulares. No entanto, somente nas últimas duas décadas foram realizadas estudos direcionados à contaminação microbiana das escovas dentais *in vivo*, propondo métodos para sua sanitização/desinfecção (Caudry

et al., 1995; Nelson-Filho et al., 2000; Sanches et al., 2001; Sato, 2002; Nelson-Filho, 2003) ou o efeito antimicrobiano de dentifrícios sobre essa contaminação (Wade et al., 1992; Quirynen et al., 2001; Warren et al., 2001; Quirynen et al., 2003; Sullivan et al. 2003; Nelson-Filho et al., 2004).

Sullivan et al. (2003) relataram a necessidade de mais estudos comparativos do uso de dentifrícios, com ou sem agente antimicrobiano, uma vez que os mecanismos de ação e o risco de desenvolvimento de bactérias multirresistentes ainda são pouco conhecidos.

O objetivo deste estudo foi avaliar, *in vivo*, o nível de formação de biofilme por estreptococos do grupo mutans (EGM) nas hastilhas de escovas dentais Monobloc® da linha Científica® (Dental Line Robodente Ltda, Ribeirão Preto, SP) utilizadas por estudantes do 5º período do curso de Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, por uma única vez, durante 2,0 min. Esse estudo clínico randomizado foi realizado em três etapas (I, II e III):

- Etapa I: avaliação do nível de contaminação por biofilme de EGM nas hastilhas das escovas dentais Monobloc® sem a utilização de dentifrício;
- Etapa II: avaliação do nível de contaminação por biofilme de EGM nas hastilhas das escovas dentais Monobloc®, com a utilização de dentifrício sem agente antimicrobiano;
- Etapa III: avaliação do nível de contaminação por biofilme de EGM nas hastilhas das escovas dentais Monobloc®, utilizando dentifrício com agente antimicrobiano triclosan.

MATERIAL E MÉTODO

Seleção das amostras

Participaram do experimento como voluntários, após a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos da Faculdade

de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP (Processo CEP/FCFRP nº 3), 52 alunos do 5º período (3º ano) do curso de Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, entre 18 a 24 anos de idade, de ambos os sexos, que não estavam fazendo uso de antibióticos ou anti-sépticos bucais.

Divisão dos grupos experimentais

O estudo foi baseado no sistema clínico randomizado, ou seja, os alunos foram divididos por sorteio em 3 grupos. Cada grupo efetuou os procedimentos descritos para cada uma das 3 etapas (I, II e III), com intervalos de uma semana entre cada etapa, para evitar qualquer tipo de influência nos resultados. Desse modo, todos os grupos efetuaram todas as 3 etapas e estiveram sujeitos aos mesmos fatores de divergências ambientais e experimentais.

A escova dental

A escova dental utilizada foi a Monobloc® da linha Científica® (Dental Line Robodente Ltda, Ribeirão Preto, SP), que apresenta cabo, cabeça e hastilhas feitas de polietileno de baixa densidade (PEBD), atóxico e insolúvel em água. O cabo forma uma única peça com as 166 hastilhas, que estão dispostas aos pares e separadas por espaços estreitos.

Procedimentos clínicos

Na etapa I, ou controle, cada indivíduo recebeu uma escova nova, e efetuou a escovação de maneira habitual durante 2 minutos, sem dentífrico.

Na etapa II, os mesmos indivíduos receberam uma nova escova, da mesma marca e modelo da utilizada na etapa I, e efetuaram a escovação, desta vez utilizando o dentífrico fluoretado Sorriso Super Refrescante® (Colgate-Palmolive Indústria e Comércio Ltda, São Bernardo do Campo, SP).

Na etapa III, o procedimento foi similar ao da etapa II, porém com o uso do dentífrico Colgate Tripla Ação® (Colgate-Palmolive Indústria e Comércio Ltda, Osasco, SP), que em sua formulação apresenta tanto o flúor, quanto o agente antimicrobiano triclosan.

Após a escovação, as escovas foram enxaguadas com água de torneira, pelos próprios indivíduos participantes, e o excesso de líquido eliminado.

Em seguida, em um suporte de espuma acondicionado dentro de um contêiner de papelão, as escovas foram fixadas em posição vertical, evitando

contato entre elas. Depois, esse contêiner foi levado ao laboratório de Microbiologia do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, para o processamento microbiológico.

Processamento microbiológico

Após cerca de 1 hora de secagem, as escovas foram colocadas/semeadas em tubos de ensaio de 25 × 150 mm contendo o meio de cultura Caldo Sacarose Bacitracina (CaSa B), seletivo enriquecedor para EGM, e incubadas em estufa a 37°C por 3 a 4 dias.

Análise estatística

Os números de unidades formadoras de colônia (UFC) de EGM nas hastilhas das escovas foram transformados em escores e o teste estatístico dos sinais realizado para verificar as possíveis diferenças entre os grupos e quais grupos apresentavam diferença (Siegel, 1975).

Empregou-se o programa estatístico GMC 2002 (Maia Campos, 2002) e o nível de significância de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Essa pesquisa clínica e microbiológica teve como base o sistema clínico randomizado, com o objetivo de minimizar os fatores que poderiam por ventura interferir nos resultados. Embora as hastilhas das escovas dentais possam estar contaminadas por diferentes tipos de microrganismos como bactérias, vírus e fungos, apenas a presença dos EGM foi avaliada, pelo fato de serem considerados os agentes etiológicos primários da cárie dental (Spolidorio et al., 2003).

Como os EGM não estão presentes livremente na natureza, a transmissão e a colonização por esses microrganismos dependem de transferências repetidas de hospedeiros infectados para outros não infectados e suscetíveis.

O meio de cultura CaSa B (Nelson-Filho, 2000) serve como substrato para os EGM e limita o crescimento de outros tipos de microrganismos, em função da presença de sacarose e do antibiótico bacitracina em sua composição. No entanto, apesar do meio CaSa B ser seletivo para EGM, pode ocorrer o desenvolvimento de outros microrganismos, como estafilococos e leveduras, fato evidenciado nesse estudo, pela turvação do meio de cultura, sem a formação de colônias/biofilmes nas hastilhas das escovas.

De acordo com Costerton et al. (1987), biofilme é a massa microbiana resultante da multiplicação e desenvolvimento de microrganismos, aderida na superfície de sólidos, presa na matriz de polissacáride extracelular (PEC), em ambiente que contém líquidos. Ainda, segundo Costerton et al. (1999) o biofilme não é uma massa compacta, mas uma massa de microrganismos desenvolvida em colunas e em andares, com canais “primitivos”, onde circulam líquidos contendo nutrientes, biocidas, subprodutos e gases. O biofilme dental cariogênico tem como microrganismos pioneiros os EGM, os quais apresentam a característica de aderir às superfícies duras por interações físico-químicas (Kolenbrander et al., 1993).

As escovas foram utilizadas uma única vez, por 2 minutos, nas três etapas experimentais. De acordo com a literatura específica, o tempo de utilização necessário para que a escova dental se torne contaminada por microrganismos ainda não está estabelecido/padronizado (Svanberg, 1978, Nelson-Filho et al., 2001, Warren et al., 2001).

Selecionou-se para esse estudo, dentifrícios facilmente encontrados no comércio (Colgate Tripla Ação® e Sorriso Super Refrescante®), de fácil

aceitação pelos participantes, e que atendessem as exigências propostas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) como, por exemplo, composições com no mínimo 1.000 e no máximo 1.500 ppm de flúor solúvel em suas formulações.

Decorrido o período de incubação, as escovas foram analisadas com o auxílio de um microscópio estereoscópico (Nikon, JP) sob luz refletida para contagem das UFC de biofilme de EGM (Figura 1).

Dos 52 alunos do 5º período (3º ano) do curso de Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, apenas 35 (67,3%) completaram todas as 3 etapas do estudo, porém somente 30 indivíduos (57,7%) foram considerados para o estudo (Tabela 1), uma vez que 5 deles não apresentaram EGM na saliva.

TABELA 1 – Número de unidades formadoras de colônia/biofilme de estreptococos do grupo mutans nas hastilhas das escovas dentais de 30 indivíduos, após única escovação por 2 minutos.

Casos	Etapa I	Etapa II	Etapa III
2	1	0	0
4	2	0	0
5	>100	0	*0
8	>100	0	*0
9	0	0	*0
13	0	0	0
14	15	*0	0
16	62	0	0
18	6	0	0
21	2	0	0
23	89	1	0
25	5	0	0
27	15	0	0
28	3	*0	*0
29	0	0	0
30	2	0	0
32	>100	0	0
33	3	0	*0
35	>100	*0	0
36	28	0	0
37	0	0	0
38	0	0	0
39	>100	0	0
42	>100	2	0
43	0	0	0
44	19	4	*0
45	0	0	0
46	5	0	*0
48	0	0	0
49	>100	8	0

*0, Escova esterilizada (sem turvação do meio de cultura líquido CaSa B).

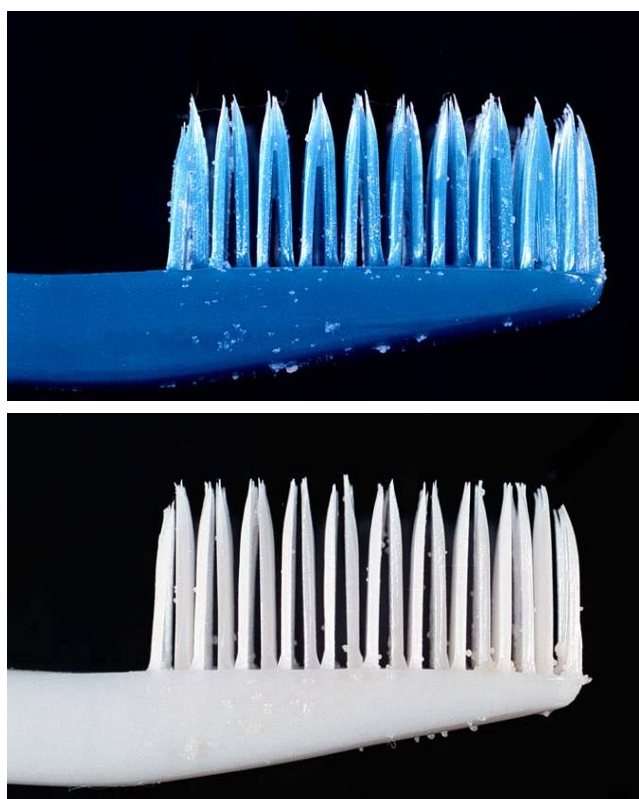


Figura 1 – Visão panorâmica das unidades formadoras de colônia/biofilme de estreptococos do grupo mutans nas hastilhas das escovas dentais.

As colônias/biofilmes de EGM estavam presentes nas hastilhas de 22 (73,3%) das 30 escovas dentais da etapa I, grupo controle, com valores variando de 1 a mais de 100UFC.

Após a utilização do dentifrício Sorriso Super Refrescante® (etapa II) foi observada a formação de biofilme de EGM nas hastilhas de 4 (18,2%) das 22 escovas dentais positivas para EGM (etapa I), com valores variando de 1 a 8UFC.

Na etapa III, com uso de dentifrício Colgate Tripla Ação® (etapa III), não houve a formação de biofilme de EGM nas hastilhas das 22 escovas dentais.

De acordo com a análise estatística, não houve diferença ($p > 0,05$) entre os resultados dos dentifrícios Sorriso Super Refrescante® (Etapa II) e Colgate Tripla Ação® (Etapa III). O uso de ambos reduziu a formação de biofilme de EGM nas hastilhas das escovas dentais ($p < 0,05$).

CONCLUSÃO

Nesse estudo, a maioria dos alunos do 5º período (3º ano) do curso de Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP apresentou formação de colônias/biofilmes de EGM nas hastilhas das escovas Monobloc®, após uma única escovação por 2 minutos. Seguindo esse raciocínio, dentifrícios como Sorriso Super Refrescante® e Colgate Tripla Ação® usados na superfície de hastilhas de escovas dentais reduzem a formação de biofilme de EGM e amenizam essa fonte de disseminação/propagação microbiana.

AGRADECIMENTOS

A PIBIC/CNPq pela bolsa de iniciação científica concedida ao graduando de Farmácia-Bioquímica Marcelo van Vliet Lima.

Ao cirurgião dentista, Dr. Pedro Bignelli, pelas escovas Monobloc® da linha Científica® (Dental Line Robodente Ltda, Ribeirão Preto/SP), gentilmente cedidas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Azevedo RVP. O emprego da bacteriocinotipagem (mutacinotipagem) no rastreamento epidemiológico de estreptococos do grupo mutans. São Paulo: 1998. 110f. [Tese de Doutorado – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo].
2. Caudry SD, Klitorinos A, Chan ECS. Contaminated toothbrushes and their disinfection. J Can Dent Assoc. 1995;61:511-516.
3. Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC., Dasgupta M, et al. Bacterial biofilms in nature and disease. Annu Rev Microbiol. 1987;41: 435-464.
4. Costerton JW, Cook G, Lamont R. The community architecture of biofilms: dynamic structures and mechanisms. In: Newman HN, Wilson M. Dental plaque revisited: oral biofilms in health and disease. London, Cardiff: Boline; 1999. p.5-13.
5. Fratto G, Nazzicone M, Ortolani E. Disinfezione degli spazzolini dentali. Ricerca sperimentale. Prev Assist Dent. 1990;16:7-10.
6. Kohler B, Bratthall D. Intrafamilial levels of *Streptococcus mutans* and some aspects of the bacterial transmission. Scand J Dent Res. 1978; 86:35-42.
7. Kolenbrander PE, London J. Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. J Bacteriol. 1993;175:3247-3252.
8. Li Y, Caufield PW. The fidelity of initial acquisition of mutans streptococci by infants from their mothers. J Dent Res. 1995;74:681-685.
9. Maia Campos GM. GMC: pesquisa biológica [programa de computador]. Versão 2002. [Acesso em 15 ago 2004]. Disponível em: <http://www.forp.usp.br/restauradora/gmc/gmc.html>
10. Malberg E, Birkhed D, Norvenious G, Norén JG, DahénG. Microorganism on toothbrushes at day-care centers. Acta Odontol Scand. 1994;52:93-98.
11. Nelson-Filho P. Eficácia de diferentes soluções na desinfecção de escovas dentais de crianças de 24 a 48 meses: Estudo clínico randomizado (cultura microbiana e MEV) e teste de difusão em ágar. Ribeirão Preto; 2003. 131f. [Tese de Livre-Docência – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo].
12. Nelson-Filho P, Ispier AR, Assed S, Faria G, Ito IY. Effect of triclosan dentifrice on toothbrush contamination. Pediatr Dent. 2004;26:11-16.
13. Nelson-Filho P, Macari S, Faria G, Assed S, Ito IY. Microbial contamination of toothbrushes and their decontamination. Pediatr Dent. 2000;22:381-384.
14. Newbrun E. Preventing dental caries: breaking the chain of transmission. J Am Dent Assoc. 1992;123: 55-59.
15. Paschoal AD, Rotta JCP. Conservação e uso de escovas entre escolares de cinco municípios do ERS-55 de Casa Branca/SP. RGO 1992 jul-ago; 40: 276-8.
16. Quirynen M, De Soete M, Pauwels M, Gizani S, Van Meerbeeck B, Van Sttenberghe D. Can toothpaste or a toothbrush with antibacterial tufts prevent toothbrush contamination? J Periodontol. 2003;74: 312-322.
17. Quirynen M, De Soete M, Pauwels M, Goosens K, Teughels W, Eldere J, et al. Bacterial survival rate on tooth and interdental brushes in relation to the use of toothpaste. J Periodontol. 2001;28: 1106-1114.
18. Sanches MH, Peres SHCS, Peres AS, Bastos JRM. Descontaminação das escovas dentais por imersão em soluções anti-sépticas. RGO. 2001;49:167-171.
19. Sato S, Pedrazzi V, Guimarães Lara EH, Panzeri H, Ferreira De Albuquerque Jr R, Ito IY. Antimicrobial spray for toothbrush disinfection: an *in vivo* evaluation. Quintessence Int. 2005;36:812-816.

20. Siegel S. Estatística não paramétrica para a ciência do comportamento. São Paulo: McGraw-Hill do Brasil; 1975.
21. Solidorio DMP, Goto E, Negrini TC, Spolidorio LC. Viability of *Streptococcus mutans* on transparent and opaque toothbrushes. J Dent Hyg. 2003;77: 114-119.
22. Sullivan A, Wretling B, Nord CE. Will triclosan in toothpaste select for resistant oral streptococci? Clin Microbiol Infect. 2003;9:306-309.
23. Svanberg M. Contamination of toothpaste and toothbrushes by *Streptococcus mutans*. Scand J Dent Res. 1978;86:412-414.
24. Wade WG, Addy M. Antibacterial activity of some triclosan-containing toothpastes and their ingredients. J Periodontol. 1992;63:280-282.
25. Warren DP, Goldschmidt MC, Thompson MB, Adler-Storthz K, Keene WJ. The effects of toothpastes on the residual microbial contamination of toothbrushes. J Am Dent Assoc. 2001;132:1241-1245.

Recebido para publicação em: 06/12/2006; aceito em: 11/04/2007.

Endereço para correspondência:

EVANDRO WATANABE
Rua Barão do Amazonas, 1167, apto. 23 – Centro
CEP 14010-120, Ribeirão Preto, SP, Brasil
Tel.: (16) 3602-4217.
E-mail: evandrowatanabe@gmail.com