

Formação *in situ* de biofilme sobre esmalte e cimento de ionômero de vidro em diferentes tensões de oxigênio

In situ biofilm formation on enamel and glass ionomer cement in different oxygen tensions

Resumo

Objetivo: Avaliar, *in situ*, o desenvolvimento de biofilme sobre fragmentos de esmalte bovino com restaurações de cimento de ionômero de vidro.

Metodologia: Seis voluntários utilizaram um dispositivo intra-bucal removível, semelhante a um aparelho ortodôntico, contendo quatro espécimes de esmalte bovino restaurados com cimento de ionômero de vidro, posicionados para o meio bucal livre ou em contato com o palato. Um examinador cego analisou visualmente a formação de biofilme nos corpos-de-prova em esmalte e em ionômero de vidro utilizando um índice-padrão após 24, 48, 96 e 168 horas (7 dias).

Resultados: Não houve diferença significativa na formação de biofilme sobre o ionômero de vidro em relação ao esmalte. Houve um desenvolvimento mais rápido do biofilme nos corpos-de-prova voltados para o palato, independentemente do tipo de substrato.

Conclusões: O cimento de ionômero de vidro não afetou a colonização microbiana. O desenvolvimento de biofilme foi maior no local com menor disponibilidade de oxigênio.

Palavras-chave: Biofilme; esmalte; cimento de ionômero de vidro; estudo *in situ*

Abstract

Purpose: To evaluate the *in situ* biofilm formation on enamel fragments restored with glass ionomer cement.

Methods: Six volunteers wore removable intra-oral devices similar to orthodontic appliances, containing four fragments of bovine enamel restored with glass ionomer cement. A blind examiner visually analyzed the biofilm formation on enamel and glass ionomer cement specimens by using a standardized index after 24, 48, 96, and 168 hours (7 days).

Results: No significant difference was detected between the biofilm formation on enamel and on glass ionomer cement. The results showed a faster biofilm development on specimens facing the palate, independently from the substrate.

Conclusions: Glass ionomer cement did not affect microbial colonization. Biofilm development was higher where less oxygen was available.

Key words: Biofilm; enamel; glass ionomer cement; *in situ* study

Vinícius Gomes Almeida^a
Marcos Porto Trein^a
Rui Vicente Oppermann^a
Cassiano Kuchenbecker Rösing^a

^aFaculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

Correspondência:

Cassiano Kuchenbecker Rösing
Rua Dr. Valle, 433/701
Porto Alegre, RS – Brasil
90560-010
E-mail: ckrösing@hotmail.com

Recebido: 02 de maio, 2007
Aceito: 05 de Janeiro, 2008

Introdução

A placa dental atualmente é considerada um biofilme verdadeiro, onde diferentes colônias de microrganismos se agrupam formando uma “sociedade microbiana”(1). A adesão bacteriana inicial ocorre após a formação de uma película condicionante de natureza glicoprotéica sobre a superfície dentária, após o contato saliva/dente. Bactérias aderem-se sobre a superfície dessa película e então multiplicam-se, proporcionando um espessamento do biofilme (2). Outras bactérias, sem a capacidade de se ligar diretamente à película adquirida, unem-se ao biofilme através de ligações específicas num processo denominado co-adesão (3). O espessamento do biofilme propicia o desenvolvimento de microrganismos anaeróbicos estritos na sua porção mais interna, onde há menor disponibilidade de oxigênio (4).

A formação desse biofilme ocorre de forma diferente sobre os diversos tipos de materiais utilizados em Odontologia. Alguns materiais odontológicos têm sido descritos como antibacterianos. O cimento de ionômero de vidro, por exemplo, possui características que inibem a adesão e reduzem o crescimento bacteriano, principalmente por sua liberação de flúor e baixo pH inicial (5-7). No entanto, a liberação de flúor, característica desse material, é tida como principal fator na inibição bacteriana e cada organismo possui uma determinada sensibilidade ao íon (8). Bactérias associadas com o processo cariogênico têm sido descritas como sensíveis às propriedades antimicrobianas do cimento de ionômero de vidro (6).

A formação de biofilme em cimentos de ionômero de vidro se dá principalmente pela rugosidade superficial aumentada em relação a outros materiais (9). Falhas marginais, principalmente excessos, estão associados a um maior acúmulo microbiano (10). Acúmulos bacterianos próximos à margem gengival e na interface dente-restauração, por características do material ou por excessos marginais, podem facilitar o desenvolvimento de reincidências de cárie e de doença periodontal.

O objetivo do presente estudo foi avaliar, *in situ*, o desenvolvimento de biofilme sobre fragmentos de esmalte bovino com restaurações de cimento de ionômero de vidro durante 168 horas (7 dias).

Metodologia

Foram voluntários deste estudo seis estudantes da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil, que preencheram os seguintes critérios de inclusão: não-fumantes, com bom estado de saúde geral e que não tivessem utilizado antibiótico/anti-inflamatório nos últimos três meses. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética da instituição e os voluntários assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

Foram confeccionados seis dispositivos intrabucais removíveis, semelhantes a aparelhos ortodônticos, sobre o modelo de gesso da arcada superior dos indivíduos, de

acordo com a descrição em Trein et al. (11). Em cada dispositivo foram posicionados quatro corpos-de-prova, sendo dois voltados para o meio ambiente bucal livre e dois voltados para o palato. Os corpos-de-prova foram obtidos a partir de incisivos bovinos selecionados (superfície sem trincas e/ou irregularidades após análise com lupa). Após a limpeza dos dentes, foram preparadas cavidades (dimensões: 2mm de largura, 2mm de comprimento e 2mm de altura), posteriormente restauradas com cimento de ionômero de vidro (Vitremmer®, 3M ESPE, St. Paul, MN, EUA). Após a presa do material, os incisivos foram cortados nas dimensões 5×6×1,5 mm, de tal forma que o corpo-de-prova apresentasse 50% de superfície de esmalte e 50% de superfície de cimento de ionômero de vidro, conforme a Figura 1.

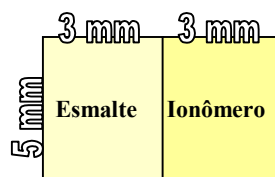


Fig. 1. Representação esquemática do corpo-de-prova utilizado no dispositivo intrabucal.

Os dispositivos foram utilizados durante 192 horas, sendo removidos apenas para higiene bucal. Os participantes foram instruídos a manter os dispositivos fora da cavidade bucal pelo menor período de tempo possível, visto que a tensão de oxigênio era fator determinante no desenvolvimento microbiano. Os dispositivos foram analisados em 24, 48, 96 e 192 horas de uso. Para esse procedimento, os dispositivos foram removidos da cavidade bucal, corados com o corante Replak® (Dentsply, São Paulo, SP, Brasil) durante 20 segundos, e posicionados para inspeção visual por um examinador cego ao local de exposição (voltado para o meio ambiente bucal livre ou em contato com a mucosa palatina) e ao substrato (esmalte ou cimento de ionômero de vidro) do corpo-de-prova. Para a quantificação de biofilme foi utilizado um índice (Quadro 1) desenvolvido em estudo anterior (11) por um examinador calibrado ($\kappa=0,81$). Os dados foram analisados e comparados através da distribuição de frequência e teste de Wilcoxon. O nível de significância foi estabelecido em 0,05.

Quadro 1. Critérios utilizados para a quantificação do biofilme (11)

Índice	Critério
0	Ausência de colonização;
1	Pontos esparsos de colonização, no máximo se transformando em linha;
2	Faixa de colonização avançando na periferia do fragmento de esmalte;
3	Área de colonização avançando de área periférica para o centro;
4	Recobrimento quase total do fragmento de esmalte;
5	Recobrimento total do fragmento de esmalte.

Resultados

A Figura 2 apresenta a distribuição dos escores sobre os fragmentos de esmalte orientados para o meio ambiente bucal livre. Em 24 horas, o escore 1 representava metade dos corpos-de-prova. Ao término do período de análise, nenhum fragmento de esmalte apresentou índice 1. A Figura 3 apresenta a distribuição dos escores dos corpos-de-prova de ionômero de vidro expostos ao meio ambiente bucal livre. O escore 1, à semelhança do ocorrido nos fragmentos de esmalte, representava 58% dos corpos-de-prova e, ao término do período experimental, não foi observado em nenhum corpo-de-prova.

Na Figura 4, pode-se observar uma rápida progressão do acúmulo do biofilme nos corpos-de-prova de esmalte em contato com o palato. O índice 5, que no primeiro período de análise não estava presente, rapidamente progrediu e correspondeu a 75% dos corpos-de-prova de esmalte em 96 e 168 horas. A Figura 5 apresenta os índices nos corpos-

de-prova de ionômero de vidro em contato com o palato. A formação foi similar àquela do esmalte, com a mesma localização.

Os resultados da análise estatística mostraram que a formação de biofilme sobre esmalte e ionômero de vidro não diferiu em 24 horas (Tabela 1). Em 48 horas, ocorreu uma menor formação no cimento em relação ao esmalte, tanto em corpos-de-prova voltados ao palato quanto ao meio ambiente bucal livre. Em 96 horas, houve diferença apenas nos sítios voltados para o palato. Ao término do período de análise, em 168 horas, não houve diferença significativa entre os substratos. Ao se comparar apenas o local de exposição (voltado para o palato ou para o meio livre), houve diferença em todos os períodos para os dois substratos, exceto em 24 horas sobre esmalte. Nas demais situações, ocorreu maior formação de biofilme em corpos-de-prova voltados para o palato em relação àqueles voltados para o meio ambiente bucal livre.

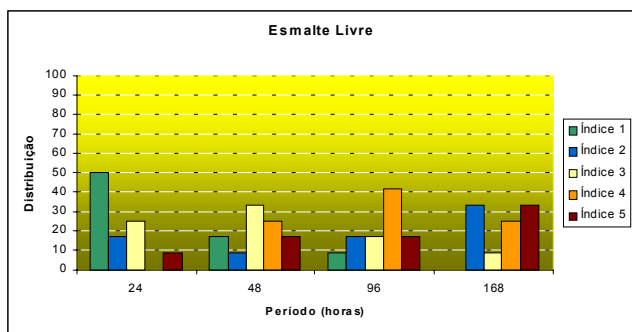


Fig. 2. Distribuição dos escores do índice de formação de biofilme sobre esmalte, nos corpos-de-prova orientados para o meio ambiente bucal livre.

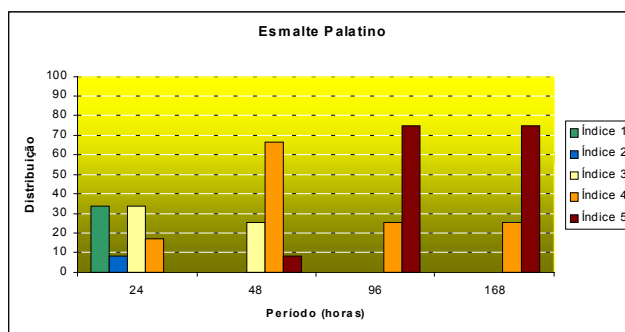


Fig. 4. Distribuição dos índices sobre esmalte, nos corpos-de-prova orientados para o palato.

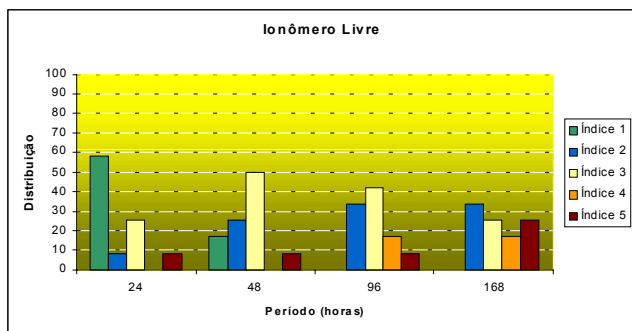


Fig. 3. Distribuição dos índices sobre ionômero de vidro, nos corpos-de-prova orientados para o meio ambiente bucal livre.

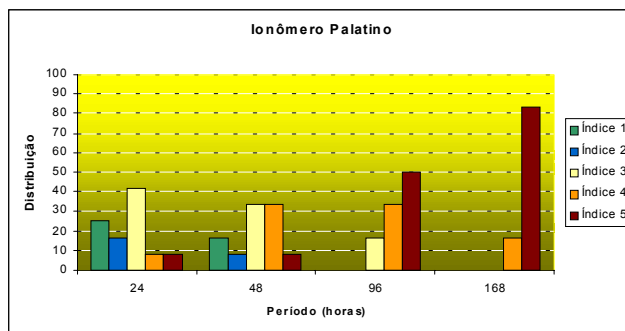


Fig. 5. Distribuição dos índices sobre ionômero de vidro, nos corpos-de-prova orientados para o palato.

Tabela 1. Valores de P (Teste de Wilcoxon) para as interações grupo (substrato e local de exposição) × período

Período	ESMALTE		IONÔMERO	
	Palatino × Livre	Palatino × Livre	LIVRE Ionômero × Esmalte	PALATINO Ionômero × Esmalte
24 horas	0,096	0,023*	0,317	0,157
48 horas	0,033*	0,014*	0,020*	0,014*
96 horas	0,004*	0,003*	0,059	0,025*
168 horas	0,010*	0,007*	0,830	0,317

* Estatisticamente significativa ($P < 0,05$)

Discussão

O biofilme dental constitui um fator etiológico em diversos processos patológicos bucais. Os estudos em periodontia têm sido direcionados para uma melhor compreensão da natureza e das interações entre o biofilme e o hospedeiro, buscando uma prevenção mais eficiente através do entendimento completo da causa. Os diversos materiais utilizados em odontologia têm sido estudados também pelo seu potencial bactericida/bacteriostático. Um material que proporcione selamento marginal e, ao mesmo tempo, previna eficientemente a recolonização bacteriana seria de grande interesse para a odontologia. Tem sido sugerido que os cimentos de ionômero de vidro retêm menos bactérias, principalmente cariogênicas, em comparação com outros materiais (12). Tendo em vista o grande número de dispositivos para acúmulo de biofilme na literatura, principalmente na área da cariologia, e a ausência de dispositivos que dispusessem dois materiais com orientações opostas comparados nos mesmos indivíduos, foi confeccionado um aparelho adaptado para conter tanto o esmalte bovino quanto o cimento de ionômero de vidro conforme estudo anterior (11). A forma como o dispositivo foi desenvolvido, contendo esmalte bovino e cimento de ionômero de vidro, tanto voltados para o meio ambiente bucal livre quanto para a mucosa palatina permitiu a análise quantitativa do acúmulo de biofilme sobre os corpos-de-prova de forma controlada, sendo possível a comparação direta entre os grupos.

Embora o grupo analisado seja pequeno, diferenças estatisticamente significantes foram observadas, o que demonstra a boa aplicabilidade do dispositivo neste modelo experimental. Além disso, o aumento do número de participantes somente tenderia a aumentar as diferenças observadas. Inicialmente, houve menor formação de biofilme sobre o cimento de ionômero de vidro em relação ao esmalte bovino. No entanto, ao fim do período experimental não houve diferença na formação sobre os dois substratos. A escolha pela utilização de um cimento de ionômero de vidro modificado por resina se deu pela facilidade de técnica de uso e pelo grande emprego do produto na odontologia atual. Herrera et al. (13) analisaram o efeito antibacteriano de cimentos de ionômero de vidro sobre microrganismos comumente presentes no esmalte e no cimento e concluíram que o efeito antibacteriano do ionômero de vidro ocorre em ambas as situações, indicando seu uso para pacientes com seqüelas de tratamento periodontal. Entretanto, aquele

estudo foi realizado *in vitro*, o que não permite uma comparação direta com o presente estudo *in situ*, além de ser realizado em âmbito microbiológico. Por sua vez, Palenik et al. (6) estudaram a aderência microbiana sobre diversos cimentos de ionômero de vidro comparados com esmalte bovino *in vitro* e encontraram um acúmulo menor nos materiais restauradores. Os resultados discordantes dos resultados aqui apresentados podem ser possivelmente atribuídos ao tipo de estudo (*in situ versus in vitro*) e coleta de dados, visto que o acúmulo foi representado individualmente por cada grupo bacteriano, enquanto que o presente estudo não analisou os morfotipos isoladamente. Não há trabalhos na literatura que permitam uma comparação direta com o presente trabalho, o que justifica a proposta da metodologia utilizada.

O local de exposição dos corpos-de-prova foi um fator importante para a colonização microbiana. Houve diferença em todos os períodos para os dois substratos, exceto em 24 horas para o esmalte, o que demonstra que o ambiente é um fator decisivo na taxa de acúmulo de biofilme. Trein et al. (11) demonstraram que uma menor concentração de oxigênio, conforme aquela encontrada nos corpos-de-prova voltados para o palato, permite maior acúmulo microbiológico. O presente estudo encontrou resultados semelhantes. Estudos clínicos do impacto do conhecimento provido por esse estudo são recomendados.

O presente estudo tem uma natureza exploratória na medida em que utiliza uma metodologia nova. Entretanto, a possibilidade de estudar a formação de biofilme sobre diferentes materiais, especialmente onde o oxigênio tem acesso limitado, é desafiadora e mais estudos devem ser realizados, principalmente pela necessidade de utilização de materiais restauradores subgingivalmente.

Conclusão

O acúmulo de biofilme sobre o cimento de ionômero de vidro não diferiu daquele observado no esmalte na maior parte dos períodos experimentais, questionando o advogado efeito antimicrobiano do cimento. Foram observadas diferenças de acúmulo de biofilme tanto sobre esmalte como sobre cimento de ionômero de vidro quando diferentes tensões de oxigênio são comparadas.

Agradecimentos

Apoio: PIBIC/CNPq.

Referências

1. Costerton JW, Stewart OS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999;284(5418):1318-22.
2. Park AW, Yaacob HB. A Synopsis of the Origins and Function of Dental Plaque and Pellicle. *J Nihon Univ Sch Dent*. 1994; 36(3):157-74.
3. Sbordone L, Bortolaia C. Oral Microbial Biofilms and Plaque-Related Diseases: microbial communities and their role in the shift from oral health to disease. *Clin Oral Investig*. 2003;7:181-8.
4. Lang NP, Kiel RA, Anderhalden K. Clinical and microbiological effects of subgingival restorations with overhanging or clinically perfect margins. *J Clin Periodontol*. 1983 Nov;10(6):563-78.

5. Barkhordar RA, Kempler D, Pelzner RR, Stark MM. Technical note: antimicrobial action of glass-ionomer lining cement on *S. sanguis* and *S. mutans*. *Dent Mater*. 1989 Jul;5(4):281-2.
6. Palenik CJ; Behnen MJ; Setcos JC; Miller CH. Inhibition of microbial adherence and growth by various glass ionomers in vitro. *Dent Mater*. 1992;8:16-20.
7. Svanberg M, Mjör IA, Orstavik D; Mutans streptococci in plaque from margins of amalgam, composite, and glass-ionomer restorations. *J Dent Res*. 1990 Mar;69(3):861-4.
8. Hamilton I; Bowden G. Effect of fluoride on oral microorganisms. In: Ekstrand J, Fejerskov O, Silverstone LM. Fluoride in dentistry. Copenhagen, Munksgaard; 1988. p.77-103.
9. Smales RJ. Plaque growth on dental restorative materials. *J Dent*. 1981 Jun;9(2):133-40.
10. Lang NP, Mombelli A, Attstrom R. Placa e cálculo dentais. In: Lindhe J. Tratado de Periodontia Clínica e Implantodontia Oral. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999. p.66-91.
11. Trein MP; Togni L; Almeida VG; Oppermann RV; Rösing CK. Formação de Biofilme em Diferentes Concentrações de Oxigênio. *Odonto Ciência*. 2006 jul/set; 21(53):253-60.
12. Pedrini D, Gaetti-Jardim Junior E, de Vasconcelos AC. Retention of oral microorganisms on conventional and resin-modified glass-ionomer cements. *Pesqui Odontol Bras*. 2001 Jul-Sept;15(3): 196-200.
13. Herrera M, Castillo A, Baca P, Carrión P. Antibacterial activity of glass-ionomer restorative cements exposed to cavity-producing microorganisms. *Oper Dent*. 1999 Sept-Oct;24(5): 286-91.