

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA INFLUÊNCIA DO PROTETOR DE SUPERFÍCIE NA ADESÃO BACTERIANA A CIMENTOS IONÔMERO DE VIDRO

Carolina Simonetti LODI¹
Lais Grazielli TURATI²
Tiago Tomaz de FREITAS³
Vinicius COLOMBO⁴
Gabriely Cristinni REZENDE⁵
Guilherme Hiroshi YAMANARI⁶
João Eduardo GOMES-FILHO⁷

RESUMO

A cárie dentária altera a morfologia e funcionalidade dos elementos dentários acometidos. Os danos causados pelas lesões cáries podem ser reparados através de técnicas restauradoras utilizando materiais adequados para cada caso. O cimento de ionômero de vidro é considerado o material de escolha para diversos procedimentos clínicos. O objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* a influência do protetor de superfície na adesão bacteriana aos cimentos de ionômeros de vidro Ketac Molar, Vitremer e Fuji II LC. Para realização do estudo *in vitro*, foram confeccionados espécimes de cada material que permaneceram em frascos contendo meio de cultura inoculado com *Streptococcus mutans* para permitir a adesão desses microrganismos ao material. Após o período de incubação, os espécimes foram colocados em outro frasco contendo solução salina, que foi agitado em vórtex para permitir a liberação das células aderidas e, então, essa solução foi diluída sequencialmente e plaqueada em meio de cultura para realização da contagem das células aderidas. Os dados foram apresentados em UFC/mL. Os dados que não se mostraram normais e homogêneos foram submetidos ao teste de Mann-Whitney Rank Sum e os dados normais e homogêneos foram submetidos ao teste Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance. O nível de significância foi de 5%. Os resultados mostraram que a aplicação do material protetor de superfície aumentou a adesão de microrganismos para os grupos Filtek Z-350 e Ketac Molar. Pode-se concluir que a aplicação do material protetor de superfície não foi capaz de reduzir a adesão de *S. mutans* às superfícies de Cimentos Ionômero de Vidro - CIVs.

Palavras-chave: Cimentos de Ionômeros de Vidro. *Streptococcus mutans*. Aderência bacteriana.

1 INTRODUÇÃO

A cárie dentária altera a morfologia e funcionalidade dos elementos dentários acometidos podendo causar complicações locais e sistêmicas (LINS et al., 2005). Os microrganismos são responsáveis pelo início do processo cárie quando colonizam a

¹ Docente das Faculdades Integradas de Santa Fé do Sul – SP, FUNEC, carol_lodi@yahoo.com.br

² Discente das Faculdades Integradas de Santa Fé do Sul – SP, FUNEC, laisturati@hotmail.com

³ Discente das Faculdades Integradas de Santa Fé do Sul – SP, FUNEC, tiago-tomaz@hotmail.com

⁴ Discente das Faculdades Integradas de Santa Fé do Sul – SP, FUNEC, vi-colombo@hotmail.com

⁵ Docente da Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, SP, gaby.cristinni@hotmail.com

⁶ Docente das Faculdades Integradas de Santa Fé do Sul – SP, FUNEC, ghyamanari@hotmail.com

⁷ Docente da Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, SP, joao@foa.unesp.br

superfície dos elementos dentários, mas também podem contribuir para aumentar a incidência de cáries secundárias quando colonizam a superfície de restaurações (TAYLOR; LYNCH, 1992).

O fato de que a cárie é um processo mediado por bactérias é conhecido há muito tempo. Desde então, os resultados científicos têm entendido o processo de desenvolvimento de cárie como sendo um processo multifatorial. Hospedeiro, bactérias e nutrientes são necessários para fomentar a produção de ácidos orgânicos e a atividade de desmineralização subsequente (KEYES, 1968). De acordo com este modelo, os três elementos têm de estar presentes para a iniciação e progressão da doença, a remoção de qualquer um dos elementos leva à intercepção do processo da doença (ANDERSON; SHI, 2006). A produção de ácidos orgânicos a partir de açúcares na dieta é um fator essencial para o processo de cárie. O baixo pH gerado a partir de ácidos desafia a homeostase na comunidade microbiana oral com uma seleção para bactérias que induzem lesões de cárie (BRADSHAW; MARSH, 1998; MARSH, 2003).

Diversos microrganismos, de acordo com sua patogenicidade, foram apontados como responsáveis diretos pelos danos ao esmalte e à dentina (LANG et al., 2010; AAS et al., 2005). A estrutura do dente é desmineralizada após a invasão de bactérias produtoras de ácido, como o *Streptococcus mutans*, quando carboidratos fermentáveis estão presentes (FARRUGIA; CAMILLERI, 2015). A capacidade dos *Streptococcus mutans* de aderir à estrutura dentária de forma persistente é necessária para promover o desenvolvimento de lesões (LANG et al., 2010; AAS et al., 2005).

Os danos causados pelas lesões cariosas, principalmente as lesões de cárie secundárias, podem ser reparados através de técnicas restauradoras utilizando materiais adequados, com capacidade bactericida/antibacteriana (FARRUGIA; CAMILLERI, 2015), para cada caso clínico, de forma que o elemento dental possa ter reestabelecida a função e a estética (BARATIERI et al., 2002). Desta forma, a escolha pelo material restaurador que tenha propriedades físico-químicas e biológicas torna-se relevante. A atividade antibacteriana dos materiais restauradores também pode ser um fator importante na escolha do material, pois poderia minimizar a colonização da interface dente/restauração, diminuindo a instalação da recidiva de cárie.

Os cimentos de ionômero de vidro têm se destacado cada vez mais como materiais restauradores de caráter definitivo, devido as suas propriedades favoráveis e seu bom desempenho em longo prazo, como liberação e reincorporação de flúor, biocompatibilidade, coeficiente de expansão térmica semelhante à estrutura dentária e inserção na cavidade em

incremento único (VAIKUNTAM, 1997). Atualmente, o cimento de ionômero de vidro (CIV) está disponível em três formulações: os ionômeros de vidro convencionais, os reforçados por metais e os modificados por resina.

Entretanto, os cimentos de ionômero de vidro possuem propriedades desfavoráveis como a alta solubilidade inicial e risco de perda e a incorporação de água (sinérese e embebição) que podem resultar em alterações dimensionais, perda das propriedades mecânicas e formação de trincas e rachaduras. Portanto, a proteção da superfície, após a presa inicial do material, é de fundamental importância, sendo, para isso, utilizados vernizes do próprio cimento, vernizes cavitários, sistemas adesivos, resina fluida ou esmalte cosmético (CARNEIRO et al., 1996). A proteção de superfície pode alterar a rugosidade superficial do ionômero, servindo como uma barreira e alterando as trocas iônicas do material com o meio bucal e o dente e, assim, podendo alterar a adesão bacteriana ao material.

Diante disso, o objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* a influência do protetor de superfície na adesão bacteriana aos cimentos de ionômeros de vidro Ketac Molar, Vitremer e Fuji II LC.

A hipótese nula a ser testada foi de que o material protetor de superfície não altera a adesão bacteriana à superfície de cimentos de ionômero de vidro.

2 MÉTODOS

2.1 Seleção dos materiais

Os materiais selecionados para realização deste estudo estão descritos no quadro 1.

Quadro 1 - Materiais selecionados para o estudo *in vitro*.

Material	Fabricante	Classificação
Filtek Z-350	3M ESPE	Resina Composta
Ketac Molar	3M ESPE	Cimento de ionômero de vidro convencional de alta viscosidade
Vitremer	3M ESPE	Cimento de ionômero de vidro modificado por resina
Fuji II LC	Company GM Corporate	Cimento de ionômero de vidro modificado por resina

Fonte: dos próprios autores

2.2 Grupos experimentais

Os grupos experimentais foram divididos da seguinte maneira:

- Grupo 1: Filtek Z-350 sem proteção superficial;
- Grupo 2: Filtek Z-350 com proteção superficial;
- Grupo 3: Ketac Molar sem proteção superficial;
- Grupo 4: Ketac Molar com proteção superficial;
- Grupo 5: Vitremer sem proteção superficial;
- Grupo 6: Vitremer com proteção superficial;
- Grupo 7: Fuji II LC sem proteção superficial;
- Grupo 8: Fuji II LC com proteção superficial.

2.3 Confeção dos espécimes

Foram confeccionados doze (n=12) espécimes de cada um dos materiais selecionados, totalizando 96 espécimes. Para a confecção dos espécimes, foi utilizada uma matriz de silicone cilíndrica com 7,0 mm de diâmetro e 2,0 mm de espessura. Os cimentos de ionômero de vidro foram manipulados seguindo as recomendações dos fabricantes, em temperatura ambiente.

A manipulação do cimento de ionômero de vidro convencional Ketac Molar (3M ESPE, St. Paul, EUA) foi realizada sobre placas de vidro. Uma tira de poliéster e uma lâmina de vidro foram colocadas sobre a matriz de silicone, exercendo pressão manual, firme e constante durante 2 minutos para extravasamento do excesso de material e obtenção de superfície lisa e regular.

Os cimentos de ionômero de vidro modificados por resina Vitremer (3M ESPE, St. Paul, EUA) e Fuji II LC (Company GM Corporate, Tóquio, Japão) foram também manipulados de acordo com as instruções do fabricante. A manipulação e preparo dos espécimes foram realizados da conforme descrito acima. Em seguida, os espécimes foram fotopolimerizados com o aparelho fotopolimerizador (Fotopolimerizador Emitter A Schuster, Schuster, Santa Maria, RS) durante 40 segundos na superfície do conjunto lâmina de vidro/matriz nos dois lados.

A resina composta Filtek Z-350 (3M ESPE St. Paul, EUA) foi inserida na matriz de silicone com o auxílio de espátula e fotopolimerizada conforme descrito anteriormente.

Após a manipulação dos cimentos de inômero de vidro, padronizou-se o tempo de 10 minutos antes da sua remoção da matriz de silicone (PASCHOAL et al, 2011). Os espécimes foram removidos da matriz e os excessos cortados com lâmina de bisturi. Para os grupos que receberam a proteção superficial, isso foi realizado após o acabamento dos espécimes e o material de proteção de superfície aplicado em todas as faces do espécime.

A proteção superficial foi realizada com adesivo dentinário Single Bond (3M Dental Products, St. Paul, MN, USA) (WATSON; BANERJEE, 1993; WANG et al., 2004).

2.4 Condição de crescimento das cepas bacterianas

As cepas de *Streptococcus mutans* de referência (ATCC 25175) congeladas foram primeiramente plaqueadas em meio de cultura BHI ágar (Brain Heart Infusion) (HIMEDIA, Himedia Laboratories Pvt. Ltd., Mumbai, Maharashtra, India) e deixadas em estufa a 37°C, por 48 horas para crescer. Após esse período, uma colônia de *Streptococcus mutans* foi inoculada em 5 mL de meio de cultura BHI caldo (Brain Heart Infusion) (HIMEDIA, Himedia Laboratories Pvt. Ltd., Mumbai, Maharashtra, India) e mantida em estufa a 37°C overnight para permitir o crescimento bacteriano (KIMYAI et al., 2011).

Após o crescimento overnight, as células foram novamente suspensas em BHI caldo fresco para atingir uma densidade óptica de 0,3 a 540 nm em espectrofotômetro (Espectrofotômetro UV/Vis – 1800, Shimadzu Corporation, Nakagyo-Ku, Kyoto, Japão), para obtenção de concentração bacteriana de aproximadamente de 10⁸ CFU/mL. O inóculo preparado foi utilizado para o ensaio *in vitro* de adesão de acordo com o método usado pelo Kimyai et al. (2011).

2.5 Teste de adesão bacteriana

O teste de adesão bacteriana foi realizado em placas de 24-poços (Falcon). Os espécimes foram colocados de forma asséptica nos poços, onde foi adicionado 200 µL da suspensão com a concentração conhecida de *Streptococcus mutans* (10⁸ CFU/mL) preparado previamente e volume total ajustado para 2 mL com meio de cultura fresco BHI caldo (Brain Heart Infusion) (HIMEDIA, Himedia Laboratories Pvt. Ltd., Mumbai, Maharashtra, India). Para controle, espécimes foram igualmente processados sem a adição do inóculo.

As placas foram incubadas anaerobicamente a 37°C por 4 horas. Em seguida, as amostras foram lavadas três vezes com 5 mL de solução salina a 0,9% para eliminar bactérias

não aderidas (KIMYAI et al., 2011). Cada espécime foi transferido para outro frasco contendo 1 mL de solução salina e então as suspensões foram vigorosamente vortexadas durante 1 minuto para que os microrganismos a eles aderidos fossem transferidos para a solução salina (SILVA et al., 2013). As suspensões obtidas foram submetidas a uma diluição seriada decimal em solução salina, sendo estas diluições plaqueadas em meio de cultura BHI ágar (HIMEDIA, Himedia Laboratories Pvt. Ltd., Mumbai, Maharashtra, India) em triplicata.

2.6 Análise microbiológica das suspensões de microrganismos totais

As suspensões foram sequencialmente diluídas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}) e inoculadas em triplicata no meio de cultura BHI ágar para determinar a quantidade de *Streptococcus mutans*.

Para a determinação do número de *Streptococcus mutans*, 3 gotas de 10 µL das diluições pré-estabelecidas foram inoculadas pela técnica da semeadura por gotas na superfície de placas de petri contendo o BHI ágar. Uma placa, para cada espécime, foi inoculada com 0,5 mL da suspensão sem diluição para confirmar a presença dos microrganismos avaliados.

Quando as gotas estavam secas, as placas foram incubadas durante 48 h a 37°C em anaerobiose para a contagem de bactérias viáveis. As colônias resultantes foram contadas, transformadas em Log_{10} UFC e expressa em Log_{10} UFC/mL.

2.7 Análise estatística

Para análise estatística dos dados obtidos a partir do estudo *in vitro*, foi utilizado o programa Sigma Plot 12.0. As médias e os desvios-padrão para o parâmetro medido (UFC no biofilme) foram calculados para cada grupo. Quando a variável “aplicação do protetor de superfície” foi analisada para o mesmo material, os dados foram submetidos ao teste de Mann-Whitney Rank Sum, pois estes não se mostraram normais e homogêneos. Para realizar a comparação entre os diferentes materiais nas categorias com e sem a aplicação do material protetor de superfície, os dados foram submetidos ao teste Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance. O nível de significância foi de 5%.

3 RESULTADOS

Os resultados estão descritos nas tabelas abaixo. A tabela 1 mostra as médias e desvio-padrão de UFC/mL nos diferentes materiais testados, com e sem a aplicação do material protetor de superfície.

Tabela 1 - Comparação da adesão bacteriana e da influência do material protetor de superfície na adesão bacteriana (média UFC/mL (DP)) entre os grupos com e sem aplicação do material protetor de superfície

Material	Filtek Z-350	Ketac Molar	Vitremer	Fuji II LC
Sem proteção superficial	2,1x10 ⁵ (2,0x10 ⁵) ^{a,A}	1,4x10 ⁶ (1,3x10 ⁶) ^{b,A}	2,2x10 ⁶ (2,1x10 ⁶) ^{b,A}	1,1x10 ⁶ (1,2x10 ⁶) ^{c,A}
Com proteção superficial	6,6x10 ⁶ (6,3x10 ⁶) ^{a,B}	1,1x10 ⁷ (9,5x10 ⁶) ^{a,B}	5,0x10 ⁶ (5,1x10 ⁶) ^{a,A}	7,3x10 ⁶ (7,1x10 ⁶) ^{a,A}

Fonte: Dos próprios autores.

*Na linha, letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística (P <0,05) entre grupos.

*Na coluna, letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística (P <0,05) entre os padrões com e sem proteção superficial, para o mesmo material.

4 DISCUSSÃO

Embora a utilização clínica de cimentos de ionômero de vidro tem aumentado devido as suas propriedades, tais como liberação de flúor e adesão aos tecidos dentais (FORSS; SEPPÄ; ALAKUIJALA, 1991; FORSTEN, 1990; MOUNT, 1981), estes materiais apresentam deficiências. A sua superfície é áspera quando comparada com as superfícies das resinas compostas, o que pode aumentar a retenção microbiana e o acúmulo de placa bacteriana (FORSS; SEPPÄ; ALAKUIJALA, 1991; SMALES, 1981).

O conteúdo de resina presente nos CIV modificados por resina, podem melhorar simultaneamente a sua propriedade física (KIM; HIRANO; HIRASAWA, 1998), além de reduzir o acúmulo de placa bacteriana, prevenindo, dessa forma, o aparecimento de lesões de cáries secundárias (PEDRINI et al, 2001). No presente estudo, a resina composta utilizada como controle (Filtek Z-350) foi o material que apresentou menor adesão de *S. muttans* em sua superfície quando comparado com os outros materiais testados, sendo que nos CIV modificados por resina, o Vitremer apresentou maior adesão microbiana quando comparado com CIV convencional, ou seja, a adição de resina nesse material não foi capaz de reduzir a adesão microbiana em sua superfície (Tabela 2). Na categoria sem aplicação do material

protetor de superfície, o CIV modificado por resina, Fuji II LC, foi o material que apresentou menor adesão bacteriana (Tabela 2). Este fato pode ser explicado devido à diferença na estrutura superficial do material (menor rugosidade) e na possível capacidade antimicrobiana deste, sendo estas características melhores do que as dos outros materiais testados. Entretanto, quando o material protetor de superfície foi aplicado, não pôde ser observada diferença estatística na adesão de *S. muttans* para todos os materiais testados (Quadro 1).

Espera-se que os materiais adesivos possam dificultar, reduzir ou retardar o desenvolvimento do biofilme dentário. O início da fase de colonização é caracterizado pelos efeitos das propriedades físico-químicas intrínsecas superficiais dos materiais restauradores e pelos mecanismos ativo e passivo de adesão bacteriana geralmente envolvidos na adesão ao substrato subjacente (QUIRYNEN, 1994). No presente estudo, a aplicação do material protetor de superfície aumentou a adesão bacteriana apenas para os grupos Filtek Z-350 e Ketac Molar (Tabela 1). A literatura não mostra resultados com a variável testada no presente estudo (aplicação do material protetor de superfície), mas pode-se suspeitar que a aplicação do material protetor de superfície possa ter aumentado a rugosidade superficial nesses materiais. Entretanto, entende-se que a aplicação do material de superfície possa não ter alterado a rugosidade e nem a atividade antimicrobiana nos materiais Vitremer e Fuji II LC, pois a aplicação do protetor de superfície não alterou estatisticamente a adesão de *S. muttans* na superfície desses dois materiais (Tabela 1).

5 CONCLUSÃO

Diante dos resultados observados e dentro das limitações da metodologia empregada, pode-se concluir que a aplicação do material protetor de superfície não foi capaz de reduzir a adesão de *S. muttans* às superfícies de CIVs.

IN VITRO EVALUATION OF SURFACE PROTECTION INFLUENCE ON BACTERIAL ADHESION TO GLASS IONOMER CEMENTS

ABSTRACT

Tooth decay alters the morphology and function of teeth affected. The damage caused by caries lesions can be repaired by restoring techniques using suitable materials for each case. The glass ionomer cement is currently considered the material of choice for a variety of clinical procedures. Given this reality, the aim of this study was to evaluate in vitro the influence of surface protection on bacterial adhesion to glass ionomer cements Ketac Molar, Vitremer and Fuji II LC. To conduct the study in vitro, specimens were prepared for each material that were remain in flasks containing culture medium inoculated with Streptococcus

mutans to allow adhesion of these microorganisms to the material. After the incubation, the specimens were placed into another vial containing saline solution, which were agitated by vortexing to permit release of adhered cells. Then, this solution was sequentially diluted and plated in culture medium to perform the adhered cell count. The data were presented in CFU / mL. The data that were not normal and homogeneous were submitted to Mann-Whitney Rank Sum test. Yet, normal and homogeneous data were submitted to Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance test. Resulting colonies were count and expressed in CFU/mL. The significance level was 5%. The results showed that surface protective material application increased adherence of microorganisms to the Filtek Z-350 and Ketac Molar groups. It was possible to conclude that the application of the protective surface material was not able to reduce the adhesion of *S. mutans* to the GIC's surfaces.

Keywords: Glass ionomer cements. Streptococcus mutans. Bacterial adhesion.

REFERÊNCIAS

AAS, J.A. Dewhirst FE: Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. **J Clin Microbiol**, v.43, n.11, p.5721-32, 2005.

ANDERSON; M. H.; SHI, W. A probiotic approach to caries management. **Pediatr Dent**, v.28, n.2, p.151-53, 2006.

BARATIERI, L. N. et al. **Odontologia Restauradora: fundamentos e possibilidades**. São Paulo: Santos, 2002.

BRADSHAW, D. J. MARSH, P. D. Analysis of pH-driven disruption of oral microbial communities in vitro. **Caries Res**, v.32, n.6, p.456-62, 1998.

CARNEIRO, M. M. et al. Avaliação de agentes de proteção superficial para cimento de ionômero de vidro. **Rev Bras Odontol**, n.53, n.52-7, 1996.

FARRUGIA, C.; CAMILLERI, J. Antimicrobial properties of conventional restorative filling materials and advances in antimicrobial properties of composite resins and glass ionomer cements-A literature review. **Dent Mater**, v.31, n.4, p.89-99, 2015.

FORSS, H.; SEPPÄ, L; ALAKUIJALA, P. Plaque accumulation on glass ionomer filling materials. **Proc Finn Dent Soc**, v.87, n.3, p. 343-50, 1991.

FORSTEN, L. Short- and long-term fluoride release from glass ionomers and other fluoride-containing filling materials in vitro. **Scand J Dent Res**, v.98, n.2, p.179-85, 1990.

KEYES, P. H. Research in dental caries. **J Am Dent Assoc**, v.76, n.6, p. 1357-73,1968.

KIM, Y. G.; HIRANO, S.; HIRASAWA, T. Physical properties of resin-modified glass-ionomers. **Dent Mater J**, v.17, n.1, p. 68-76, 1998.

KIMYAI, S. et al. Effect of two prophylaxis methods on adherence of *Streptococcus mutans* to microfilled composite resin and giomer surfaces. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v.16, n.4, p.561-7, 2011.

- LANG, C. Specific Lactobacillus/Mutans Streptococcus co-aggregation. **J Dent Res**, v.89, n.2, p.175-9, 2010.
- LINS, S. A. Atividade antimicrobiana de materiais restauradores e selantes. **RGO**, v.53, n.1, p.23-6, 2005.
- MARSH, P. D. Are dental disease examples of ecological catastrophes? **Microbiology**, n.149, p.279-94, 2003.
- MOUNT, G. J. Restoration with glass-ionomer cement: requirements for clinical success. **Oper Dent**, v.6, n.2, p.59-65, 1981.
- PEDRINI, D.; GAETTI-JARDIM Jr., E.; MORI, G. G. Influência da aplicação de flúor sobre a rugosidade superficial do ionômero de vidro Vitremer e adesão microbiana a este material. **Pesqui Odontol Bras**, v.15, n.1, p.70-76, jan./mar. 2001.
- QUIRYNEN, M. The clinical meaning of the surface roughness and the surface free energy of intra-oral hard substrata on the microbiology of the supra- and subgingival plaque: results of in vitro and vivo experiments. **J Dent**, n.22, p.13-6, 1994.
- SILVA S. et al. The effect of silver nanoparticles and nystatin on mixed biofilms of *Candida glabrata* and *Candida albicans* on acrylic. **Med Mycol**, v.51, n.2, p.178-84, 2013.
- SMALES, R. J. Plaque growth on dental restorative materials. **J Dent**, v.9, n.2, p.133-40, 1981.
- TAYLOR, M. J.; LYNCH, E. Microleakage. **J Dent**, v.20, n.1, p.3-10, 1992.
- VAIKUNTAM, J. Resin-modified glass ionomer cements (RM GICs) implications for use in pediatric dentistry. **ASDC J Dent Child**, v.64, n.2, p.131-4, 1997.

Recebido em 24 de agosto de 2015.

Aceito em 14 de abril de 2016.