

EFEITO INIBITÓRIO DE SELANTES DE FÓSSULAS E FISSURAS APÓS INCORPORAÇÃO DE CLOREXIDINA

Palavras-Chave: ANTIBACTERIANOS, SELANTES DE FOSSAS E FISSURAS, INIBIDORES DO CRESCIMENTO, STREPTOCOCCUS MUTANS, STREPTOCOCCUS SANGUINIS

MARIA JULIA CAZOTTI DE CASTRO, FOP – UNICAMP

IAGO TORRES CORTÊS DE SOUSA, FOP – UNICAMP

CYNTHIA LUIZA LOPES DE OLIVEIRA, FOP – UNICAMP

Prof^a. Dr^a. KARINA COGO-MÜLLER, FCF – UNICAMP

Prof^a. Dr^a. FERNANDA MIORI PASCON (orientadora), FOP – UNICAMP

1. INTRODUÇÃO

As áreas mais propensas ao desenvolvimento de lesões de cárie incluem as regiões interproximais, a margem gengival e as superfícies oclusais dos dentes posteriores, locais de maiores depósitos bacterianos (Fejerskov et al., 2005). Nas superfícies oclusais, a anatomia complexa facilita a retenção de bactérias e resíduos alimentares, tornando-as difíceis de limpar. A falta de acesso à saliva nessas áreas também pode contribuir para uma maior incidência de lesões de cárie. Portanto, além de medidas preventivas e da avaliação do risco e atividade de cárie do paciente, a aplicação de selantes nas fóssulas e fissuras tem se mostrado altamente eficaz na prevenção de lesões, especialmente quando aplicados logo após a erupção dos molares e pré-molares (Mejàre et al. 2003; Wright et al., 2016).

Os selantes de fossas e fissuras são particularmente indicados para crianças e adolescentes com alto risco de desenvolver lesões de cárie (Mejàre et al., 2003; Martignon et al., 2006). Podem ser à base de resina ou à base de ionômero de vidro, atuando como uma barreira mecânica contra microrganismos e biofilme (Wright et al., 2016). Uma revisão sistemática da literatura demonstrou que crianças e adolescentes que receberam selantes nas superfícies oclusais dos molares decíduos ou permanentes experimentaram uma redução de 76% no risco de desenvolver novas lesões cáries após dois anos de acompanhamento, em comparação com aqueles que não receberam selantes. (Wright et al., 2016).

Além da aplicação de selantes, outra estratégia para reforçar o controle do biofilme dental é a utilização de agentes antimicrobianos, como a clorexidina (CHX). Dada a capacidade dos agentes antimicrobianos em reduzir ou impedir a adesão do biofilme à superfície da restauração e inibir o crescimento bacteriano na interface dentária ou da restauração (Imazato, 2003), estudos estão sendo conduzidos para incorporar agentes antimicrobianos em diversos materiais odontológicos (Li et al., 2011; Inagaki et al., 2016). A adição de agentes antimicrobianos em materiais resinosos pode diminuir ou controlar a adesão do biofilme à sua superfície, prevenindo assim novos episódios de desmineralização dos tecidos dentários (Yoshida et al. 1999; Burgers et al., 2009; de Fúcio et al. 2009). A CHX que tem sido amplamente avaliada por ser um agente antibacteriano com amplo espectro de ação, sendo capaz de inibir o crescimento, principalmente, do *Streptococcus mutans*. Dessa forma, favorece a efetividade dos materiais resinosos e suas propriedades antimicrobianas, conseqüentemente, a prevenção da cárie (De Paiva et al., 2023). Além disso, essa prática poderia potencializar a atividade antibacteriana dos selantes de fóssulas e

fissuras, especialmente contra microrganismos cariogênicos remanescentes nos sítios mais críticos como as fósulas e fissuras (Aas et al., 2008). Considerando também a possibilidade de falhas ou perdas parciais dos selantes, o que poderia resultar em falhas clínicas, a adição de um agente antibacteriano poderia conferir proteção à estrutura dentária mesmo na presença de perdas parciais ou defeitos no selante (Jedrychowski et al., 1983).

No entanto, ainda existem lacunas no conhecimento sobre os efeitos da adição de CHX, baixas ou altas concentrações, nas propriedades antibacterianas de selantes resinosos de fósulas e fissuras, principalmente no que diz respeito ao efeito antibacteriano a longo prazo. O objetivo do estudo foi avaliar o efeito inibitório de selantes de fósulas e fissuras após incorporação de CHX.

2. METODOLOGIA

2.1. Delineamento experimental inicial

Os fatores em estudo foram diferentes concentrações de CHX (0,1% e 0,2%) adicionadas a um selante resinoso comercial (FluroShield®). A amostra foi composta por corpos de prova distribuídos aleatoriamente em 3 grupos: Selante Resinoso (Controle Negativo), Selante Resinoso + 0,1% CHX e Selante Resinoso + 0,2% CHX. A variável de resposta seria o tamanho do halo de inibição (em mm) das bactérias *S. mutans* e *S. sanguinis* (Naik et al. 2016; Tunkur et al., 2008) observado por meio do método de difusão em ágar para avaliar a atividade antibacteriana dos grupos experimentais em diferentes tempos de análise (0, 1, 7, 14, 21, 30, 40, 50, 60, 70, 80 e 90 dias).

2.2. Estudo piloto 1

2.2.1. Adição de 0,1% e 0,2% CHX ao selante de fósulas e fissuras

Para a adição do agente antimicrobiano ao selante comercial (FluroShield®) utilizou-se diacetato de CHX em pó (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemanha) e a relação peso/peso do material resinoso e agente antimicrobiano nas concentrações 0,1% e 0,2%. Tanto o material quanto o antimicrobiano foram pesados em balança analítica e em seguida misturados manualmente com auxílio de espátula. Para evitar a polimerização precoce do material, todo o procedimento foi realizado em ambiente controlado de luz e temperatura e em frascos de cor âmbar (Inagaki et al., 2016).

2.2.2. Preparo dos corpos de prova

Para o preparo dos corpos de prova, foram confeccionadas matrizes (6 mm de diâmetro x 2 mm de espessura) utilizando silicone de condensação (Perfil, Coltene / Vigodente). Os materiais correspondentes ao grupo controle e grupos experimentais foram inseridos em um único incremento. Em seguida, foi posicionada uma tira de matriz de poliéster sob a superfície, e então fotoativados com o aparelho Rádi Cal por 40 segundos (1200 mW/cm²). Posteriormente, os corpos de prova foram removidos das matrizes, desinfetados com álcool 70% e luz UV (15 minutos/lado) e armazenados separadamente em placas de poços (uma para cada grupo), imersos em 1,5 mL de saliva artificial em temperatura ambiente, com 100% de umidade, por 24 horas, em estufa.

2.2.3. Análise da atividade antimicrobiana

Para a análise da atividade antimicrobiana foi utilizada a técnica de semeadura em estrias múltiplas no ágar. As bactérias foram cultivadas *overnight* em meios de cultura específicos: caldo triptona soja TSB para cultura de *S. mutans* e de *S. Sanguinis* a 37°C. A cultura em caldo foi diluída e cultivada até uma densidade de 10⁸ UFC/mL, confirmada pela contagem de células viáveis. Em seguida, 20 mL dos meios de cultura com ágar foram distribuídos uniformemente sobre a superfície de placas de Petri (90 x 15mm) até uma espessura de 5 mm. Após solidificação do ágar, os corpos de prova foram posicionados sobre a superfície. Após serem armazenados em

câmara aeróbica com 10% de CO₂ a 37°C por 48 horas, observou-se ausência de halo de inibição para os materiais estudados, sendo necessário um novo delineamento experimental.

2.3. Delineamento experimental final

Para o novo delineamento experimental, optou-se por aumentar a concentração de CHX, dessa forma, os fatores em estudo foram diferentes concentrações de CHX (0,2% e 1%) adicionadas a um selante resinoso comercial (FluroShield®). A amostra foi composta por corpos de prova distribuídos aleatoriamente em 3 grupos (n=1): Selante Resinoso (Controle Negativo), Selante Resinoso + 0,2% CHX e Selante Resinoso + 1% CHX. Foram realizados ensaios de inibição para a determinação das concentrações inibitórias mínimas (MIC), pelo método de microdiluição em caldo em placas de 96 poços, seguindo o protocolo recomendado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012), imediato e a longo prazo (0, 7, 14 e 30 dias).

2.4. Estudo piloto 2

2.4.1. Adição de 0,2% e 1% CHX ao selante de fósulas e fissuras e preparo dos corpos de prova

A adição de CHX ao selante de fósulas e fissura, foi realizada conforme descrito anteriormente no item 2.2.1. com exceção da maior concentração utilizada. O preparo dos corpos de prova também foi realizado conforme o item 2.2.2.

2.5. Análise da atividade antimicrobiana

Para análise da atividade antimicrobiana utilizou-se o microrganismo *S. mutans* (UA159) por meio da determinação das concentrações inibitórias mínimas (MIC), a partir dos grupos controle e experimentais. Os valores de MIC foram determinados em triplicata utilizando uma versão simplificada do documento de referência M02-A11 (CLSI, 2012). Os testes foram realizados em microplacas de 96 poços e todos os procedimentos foram realizados sob condições assépticas em cabine de fluxo de ar laminar.

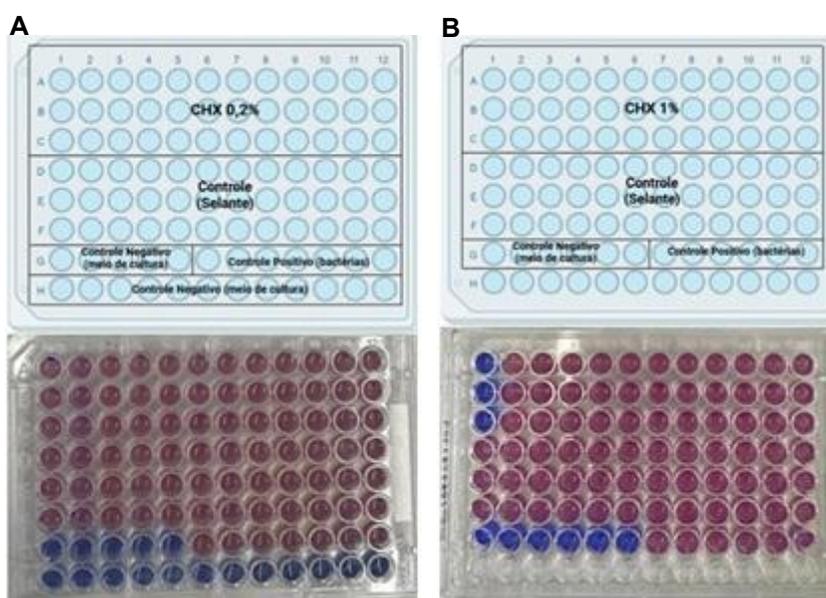
As bactérias foram cultivadas overnight em caldo BHI (Infusão Cérebro Coração) para cultura de *S. mutans* a 37°C. A cultura em caldo foi diluída e cultivada até uma densidade de 10⁸ UFC/mL, confirmada pela contagem de células viáveis. O inóculo foi ajustado por uma leitura de absorbância de 0,1 a 660 nm usando um espectrofotômetro de tubo (Único, Princeton, NJ, USA), seguido por uma diluição de 100 vezes e depois de 2 vezes, resultando em uma concentração final de 5x10⁵ UFC/mL por poço. As placas foram incubadas em câmara aeróbica com 10% de CO₂ por 24 horas para microrganismos aeróbicos. Utilizamos como controle negativo poços de microplacas contendo apenas meio de cultura e como controle positivo poços de microplacas contendo meio de cultura mais suspensões microbianas. A MIC foi definida como a menor concentração na qual nenhum crescimento bacteriano foi observado após a incubação, determinadas pela leitura de absorbância a 660 nm usando um espectrofotômetro de microplacas (Biochrom Ltd, Cambridge, CB, Inglaterra), inspeção visual e coloração com resazurina (0,01%; Sigma Aldrich 199303-5G).

3) RESULTADOS PRELIMINARES E DISCUSSÃO

A partir do novo delineamento experimental, pode-se observar a atividade antimicrobiana do selante de fósulas e fissuras, quando adicionado 1% de CHX por meio do ensaio de concentração inibitória mínima (MIC), utilizando resazurina como indicador. A coloração azul indica ausência de crescimento bacteriano, enquanto o rosa indica proliferação.

No grupo experimental selante + 0,2% CHX todos os poços apresentaram coloração rosa, incluindo as maiores concentrações, sugerindo ausência de inibição significativa de *S. mutans* (**Figura 1A**). Além disso, o grupo controle também apresentou coloração rosa em todos os poços. Os poços nos quais haviam somente meio de cultura (controle negativo), permaneceram inativos (azuis), isto é, não houve crescimento bacteriano, como esperado. Já os poços de controle positivo, nos quais havia somente o meio de cultura com bactérias, houve crescimento bacteriano. Já no grupo selante + 1% CHX observou-se coloração azul nos poços de maior concentração, com transição progressiva para rosa nas diluições mais baixas, indicando inibição efetiva do crescimento bacteriano. O controle negativo permaneceu inativo (azul), e o controle positivo demonstrou crescimento esperado (rosa), validando o ensaio.

A partir desses resultados preliminares, novos ensaios MIC serão realizados com as concentrações de 1% e 2% tanto para o *S. mutans* quanto para o *S. sanguinis* nos tempos de 0, 7, 15 e 30 dias, sendo assim, os resultados finais, serão apresentados no relatório final e no XXXIII Congresso de Iniciação Científica da Unicamp.



Created in <https://BioRender.com>

Figura 1. Ensaio concentração inibitória mínima (MIC) de acordo com os grupos controle e selante + 0,2% clorexidina (A); Ensaio concentração inibitória mínima (MIC) de acordo com os grupos controle e selante + 1% clorexidina (B).

A incorporação de agentes antimicrobianos, como a clorexidina, a materiais restauradores visa reduzir a colonização bacteriana em áreas de difícil acesso, como fóssulas e fissuras. Neste estudo, apenas a formulação com 1% de CHX demonstrou eficácia antimicrobiana contra *S. mutans*. Além disso, eficácia da CHX depende da sua concentração e capacidade de liberação da matriz resinosa (Gomes, 2023). Dessa forma, a ausência de efeito inibitório com 0,2% pode estar relacionada à baixa difusão do agente antimicrobiano a partir da matriz de resina polimerizada ou concentração insuficiente para superar a atividade bacteriana.

Ainda que o desempenho antimicrobiano da formulação com 1% tenha sido promissor *in vitro*, estudos complementares são necessários para avaliar o impacto dessa incorporação nas propriedades físico-mecânicas e na durabilidade clínica do selante. De maneira geral, a incorporação de 1% de CHX ao selante resinoso apresentou efeito inibitório contra *S. mutans*, enquanto a concentração de 0,2% não foi eficaz nas condições testadas. Esses

achados sugerem que a incorporação de CHX em concentrações adequadas pode potencializar a ação preventiva dos selantes, desde que não comprometa suas propriedades clínicas.

BIBLIOGRAFIA

TERZIO, Antônio. Título de Artigo usado como exemplo de bibliografia. Revista/Periódico usado como exemplo, Cidade, v. XX, p. XX-YY, 20XX (ano de publicação)

1. FEJERSKOV, Ole et al. Características clínicas e histológicas da cárie dentária. In: *Cárie Dentária – A Doença e seu Tratamento Clínico*. 1. ed. São Paulo: Santos, v. 1, p. 71-96, 2005.
2. MEJÅRE, Ingegerd et al. Caries preventive effect of fissure sealants: a systematic review. *Acta Odontol. Scand*, v. 61(6), p. 21-330, 2003.
3. WRIGHT, John et al. Sealants for preventing and arresting pit-and-fissure occlusal caries in primary and permanent molars. *Pediatr Dent*, v. 38(4), p. 282-308, 2016.
4. MARTIGNON, Stefania et al. Efficacy of sealing proximal early active lesions: An 18-Month clinical study evaluated by conventional and subtraction radiography. *Caries Res*, v. 40(5), p. 382-288, 2006.
5. IMAZATO, Satoshi. Antibacterial properties of resin composites and dentin bonding systems. *Dent Mater*, v. 19(6), p. 449-457, 2003.
6. LI, Feng et al. The effect of an antibacterial monomer on the antibacterial activity and mechanical properties of a pit-and-fissure sealant. *J Am Dent Assoc*, v. 142(2), p. 184-193, 2011.
7. INAGAKI, Luciana et al. Effect of monomer blend and chlorhexidine-adding on physical, mechanical and biological properties of experimental infiltrants. *Dent Mater*, v. 32(129), p. 307-313, 2016.
8. INAGAKI, Luciana et al. Evaluation of sorption/solubility, cross-link density, flexural strength and elastic modulus of experimental resin blends with chlorhexidine. *J Dent*, v. 49, p. 40-45, 2016.
9. YOSHIDA, Keiichi et al. Antibacterial activity of resin composites with silver-containing materials. *Eur J Oral Sci*, v. 107(4), p. 290-296, 999.
10. BÜRGERS, Ralf et al. The antiadherence activity and bactericidal effect of microparticulate silver additives in composite resin materials. *Arch Oral Biol*, v. 54(6), p. 595-601, 2009.
11. DE FÚCIO, Suzana Beatriz et al. Analyses of biofilms accumulated on dental restorative materials. *Am J Dent*, v. 22(3), p. 131-136, 2009.
12. AAS, Jorn et al. Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. *J Clin Microbiol*, v. 46, p. 1407-1417, 2008.
13. JEDRYCHOWSKI, Joseph et al. Antibacterial and mechanical properties of restorative materials combined with chlorhexidines. *J Oral Rehabil*, v. 10(5), p. 373-381, 1983.
14. CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. All rights reserved. M02-A11, 2012.
15. GOMES, Felipe. Atividade antimicrobiana de um cimento de lonômero de vidro experimental contendo digluconato de Clorexidina. [Trabalho de Conclusão de Curso] São Luís: Universidade Federal do Maranhão. *Brazilian Dental Science*. v 44. 2023
16. DE PAIVA, Isabel et al. Incorporação de agentes antimicrobianos em compostos resinosos – revisão de literatura. *Braz. J. Hea. Rev*, v. 5, p. 23735- 237757, 2023.