

# Atividade antimicrobiana do ácido fosfórico associado ou não a clorexidina 2% sobre bactérias do biofilme dentário

*Antimicrobial activity of phosphoric acid associated or not to 2% clorexidine over dental biofilm bacteria*

Thiago Isidro Vieira<sup>1</sup>  
Ana Maria Gondim Valença<sup>2</sup>  
Bianca Marques Santiago<sup>3</sup>  
Brenna Louise Cavalcanti Gondim<sup>1</sup>

1 - Acadêmico do curso de Odontologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil.

2 - Doutora em Odontologia Social pela Universidade Federal Fluminense. Professora Associada do Departamento de Clínica e Odontologia Social da UFPB. Centro de Ciências da Saúde, João Pessoa, Brasil

3 - Doutoranda em Saúde Pública pela Escola Nacional de Saúde Pública (ENSP) - Fiocruz. Mestre em Odontopediatria pela Universidade Federal do Rio de Janeiro. Professora Assistente do Departamento de Clínica e Odontologia Social da UFPB. Centro de Ciências da Saúde, João Pessoa, Brasil.

## Correspondência:

Thiago Isidro Vieira  
Rua Maria Helena Rocha, 113.  
João Pessoa - Paraíba - Brasil  
CEP: 58036-823  
E-mail: thiago\_isidro@yahoo.com.br

## RESUMO

Este estudo avaliou a atividade antimicrobiana do ácido fosfórico a 37%, associado ou não a clorexidina 2%, frente a cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *S. mitis* (ATCC 903), *S. oralis* (ATCC 10557), *S. salivarius* (ATCC 7073) e *Lactobacillus casei* (ATCC 9595). Cepas padronizadas destas bactérias ( $10^8$  UFC/mL) foram semeadas com 'swabs' em placas de ágar sangue (Mueller-Hinton acrescido de 5% de sangue). Para o teste de difusão em ágar, cinco grupos foram avaliados: G1 (controle negativo): solução salina; G2: água destilada; G3: ácido fosfórico 37%; G4: ácido fosfórico 37% associado à clorexidina 2%; G5 (controle positivo): clorexidina 0,12%. Realizaram-se os procedimentos em duplicata. As placas foram mantidas em microaerofilia a 37°C por 48 horas e, em seguida, procedeu-se a mensuração, em milímetros, dos halos de inibição por intermédio de um paquímetro manual. As médias aritméticas (em mm) para *S. mutans* foram: 0,00 (G1 e G2); 26,50 (G3); 25,00 (G4); 23,50 (G5). As médias para *S. mitis* foram: 0,00 (G1 e G2); 35,50 (G3); 35,00 (G4); 24,50 (G5). As médias para *S. oralis* foram: 0,00 (G1 e G2); 37,00 (G3); 39,00 (G4); 15,50 (G5). As médias para *S. salivarius* foram: 0,00 (G1 e G2); 25,00 (G3); 21,00 (G4); 21,00 (G5). As médias para *L. casei* foram: 0,00 (G1 e G2); 24,50 (G3); 22,00 (G4); 22,00 (G5). O ácido fosfórico a 37% apresentou ação inibitória sobre todas as cepas em teste. A associação da clorexidina 2% ao ácido fosfórico 37% proporcionou um aumento no efeito inibitório frente *S. oralis*, mas não sobre os demais microrganismos.

**Palavras-chave:** Biofilmes; Ataque Ácido Dentário; Dentística Operatória.

## ABSTRACT

This study evaluated the antimicrobial activity of the 37% phosphoric acid, associated or not to 2% clorexidine, over *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *S. mitis* (ATCC 903), *S. oralis* (10557), *S. salivarius* (ATCC 7073) and *Lactobacillus casei* (ATCC 9595). Strains standardized in  $10^8$  CFU/mL were sowed with swabs in plates of blood agar (Mueller-Hinton with 5% of blood). To the diffusion in agar, five groups were appraised: G1 (negative control): saline solution; G2: distilled water; G3: 37% phosphoric acid; G4: 37% phosphoric acid 37% associated to 2% clorexidine; G5 (positive control): 0.12% clorexidine. Tests were carried through twice. The plates were maintained in microaerophilia at 37°C for 48 hours and, soon afterwards, the measurements of the inhibition zone were proceeded, in millimeters, through a caliper rule. The arithmetic averages (in mm) for *S. mutans* were: 0.00 (G1 and G2); 26.50 (G3); 25.00 (G4); 23.50 (G5). The averages for *S. mitis* were: 0.00 (G1 and G2); 35.50 (G3); 35.00 (G4); 24.50 (G5). The averages for *S. oralis* were: 0.00 (G1 and G2); 37.00 (G3); 39.00 (G4); 15.50 (G5). The averages for *S. salivarius* were: 0.00 (G1 and G2); 25.00 (G3); 21.00 (G4); 21.00 (G5). The averages for *L. casei* were: 0.00 (G1 and G2); 24.50 (G3); 22.00 (G4); 22.00 (G5). The 37% phosphoric acid presented inhibitory effect over all bacteria tested. The association between 2% clorexidine and the 37% phosphoric acid provided greater antimicrobial effect over *S. oralis*, but not for the other microorganisms.

**Keywords:** Biofilms; Acid Etching Dental; Operative Dentistry

## INTRODUÇÃO

Em 1955, Buonocore realizou um estudo que é a base da odontologia adesiva. Ele

condicionou a superfície do esmalte com ácido fosfórico a 85% por 30 segundos e então, aplicou resina acrílica sobre uma superfície asperizada micromecanicamente.

Ele provou que a retenção de resina dispensada sobre a área tratada de esmalte era maximizada se comparada com aquela obtida pelo material sobre a superfície adamantina hígida.<sup>1</sup>

O ácido fosfórico age na superfície do esmalte dentário elevando a energia de superfície por remover cristais de hidroxiapatita não-reativos e a película adquirida, provocando, desta forma, uma ampliação da área superficial ao transformar a superfície em um tecido altamente poroso<sup>2</sup>. Este fato permite que o compósito resinoso penetre as microporosidades, formando *tags* resinosos, produzindo assim uma adesão mecânica ao esmalte.<sup>3</sup>

Uma outra propriedade de ácido fosfórico que se reveste de interesse clínico é a sua ação antibacteriana. Esta característica é essencial principalmente para aqueles sistemas adesivos que se fundamentam como mecanismo de união à dentina na remoção total do *smear layer* (lama dentinária formada de resíduos depositados durante a fase de preparo cavitário que contém, particularmente, componentes inorgânicos do esmalte e dentina, colágeno e componentes salivares e bactérias).<sup>4</sup>

Nesta perspectiva, torna-se importante ressaltar que o biofilme dentário é composto por *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mitis* e *Streptococcus oralis* que são os estreptococos conhecidos como colonizadores iniciais. Após a erupção dos dentes, *S. mutans* e *S. sanguis* já são encontrados na cavidade bucal e, na seqüência, novas espécies se mostram presentes, como *Lactobacillus casei*.<sup>5</sup>

Levando em consideração a presença destas bactérias na superfície dentária, verifica-se que o ácido condicionador deve proporcionar atividade antimicrobiana e fortalecer o selamento marginal, visto que o acesso bacteriano é uma das causas principais de resposta inflamatória pulpar associada à restauração.<sup>6</sup>

Com a finalidade de minimizar ou eliminar os prejuízos causados pelos microrganismos associados à cárie secundária, agentes antibacterianos, tais como: clorexidina,<sup>7</sup> própolis ou antibióticos<sup>8,9</sup> tem sido introduzidos na composição dos sistemas adesivos.

Face ao exposto, o propósito desse estudo *in vitro* foi avaliar a atividade antimicrobiana do ácido fosfórico a 37%, associado ou não a clorexidina a 2%, frente a cepas de *S. mutans* (ATCC 25175), *S.*

*mitis* (ATCC 903), *S. oralis* (ATCC 10557), *S. salivarius* (ATCC 7073) e *Lactobacillus casei* (ATCC 9595).

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Condicionadores ácidos

Os ácidos fosfóricos utilizados no presente estudo foram: a) Ataque gel® (Biodinâmica, Ibiporã, Brasil) – constituído do o ácido fosfórico a 37%; b) Acid gel® (Villevie, Joinville, Brasil) – que apresenta em sua composição ácido fosfórico a 37% com clorexidina a 2%.

### Microrganismos

Foram utilizadas cepas padrão de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Streptococcus mitis* (ATCC 903), *Streptococcus oralis* (ATCC 10557), *Streptococcus salivarius* (ATCC 7073) e *Lactobacillus casei* (ATCC 9595) oriundas do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz. As linhagens foram reativadas em caldo BHI (DIFCO®, São Paulo, Brasil) em estufa bacteriológica em microaerofilia utilizando a técnica da chama da vela a 37°C.<sup>10</sup> As culturas foram armazenadas em um freezer em caldo BHI contendo 20% (v/v) glicerol.

### Avaliação da atividade antimicrobiana

Culturas bacterianas desenvolvidas em BHI líquido por 24 horas (10<sup>8</sup> UFC/mL) foram semeadas com 'swabs' em placas de petri (90mm / 15mm, Alfa-lab®, São Paulo, Brasil) contendo 10 mL de ágar sangue (Mueller-Hinton [DIFCO®, São Paulo, Brasil] acrescido de 5% de sangue de carneiro desfibrinado). Para a técnica de ágar-difusão, cinco grupos foram avaliados, conforme descrito no Quadro 1:

Grupos	Descrição
G1 (controle negativo)	Solução salina (ADV®, Nova Odessa, Brasil)
G2	Água destilada
G3	Ataque gel® (ácido fosfórico a 37%)
G4	Acid gel® (ácido fosfórico a 37% com clorexidina a 2%)
G5 (controle positivo)	PerioGard® (Colgate, São Paulo, Brasil)

Quadro 1: Disposição dos grupos analisados pela técnica de ágar-difusão.

Em seguida, dispensou-se 50µl de cada produto em poços de 6 mm de diâmetro no ágar, sendo as placas mantidas em microaerofilia a 37°C por 48 horas. Os ensaios foram efetuados em duplicada. Procedeu-se a mensuração dos halos com o auxílio de um paquímetro, a qual foi efetuada por um único examinador treinado, considerando-se com atividade antimicrobiana halos de inibição  $\geq 7$ mm.<sup>11</sup>

### Análise dos dados

Os achados relativos à atividade antimicrobiana dos diferentes produtos foram avaliados por intermédio da estatística descritiva, mediante a obtenção das médias dos halos de inibição.

### RESULTADOS

Constatou-se susceptibilidade bacteriana para os grupos G3, G4 e G5, bem como ausência da formação de halos para os grupos G1 e G2 (Tabela 1).

Tabela 1: Médias dos diâmetros dos halos de inibição dos grupos experimentais frente a bactérias formadoras do biofilme dentário obtidos pela técnica de ágar-difusão.

Linhagens bacterianas	Média dos diâmetros dos halos de inibição (em milímetros)				
	G1	G2	G3	G4	G5
<i>S. mutans</i>	0,00	0,00	26,50	25,00	23,50
<i>S. mitis</i>	0,00	0,00	35,50	35,00	24,50
<i>S. oralis</i>	0,00	0,00	37,00	39,00	15,50
<i>S. salivarius</i>	0,00	0,00	25,00	21,00	21,00
<i>Lactobacillus casei</i>	0,00	0,00	24,50	22,00	22,00

\*Susceptibilidade: halos  $\geq 7$ mm.

Nos grupos em que houve atividade antimicrobiana, verifica-se que a susceptibilidade frente aos microrganismos se apresenta variável para cada produto, sendo ela maior para o *S. oralis* naqueles do ácido fosfórico (associado ou não à clorexidina), enquanto no controle positivo tal condição foi observada para o *S. mitis*.

### DISCUSSÃO

Uma consideração inicial deve ser feita sobre as limitações dos estudos *in vitro*, posto que os resultados obtidos por meio

deste tipo de investigação não devem ser extrapolados para uma condição clínica, uma vez que podem não refletir o real efeito do material quando aplicado numa situação *in vivo*. Todavia, as pesquisas laboratoriais dão suporte para ensaios clínicos.<sup>12</sup> Uma das limitações do presente estudo está relacionada ao fato de não reproduzir condições fisiológicas do substrato adamantino e dentinário.

O presente ensaio demonstrou a ação antimicrobiana por meio da técnica de ágar-difusão do ácido fosfórico a 37% associado ou não a clorexidina a 2% frente a cepas formadoras do biofilme dentário. A técnica de difusão no ágar é utilizada como o teste padrão para mensurar propriedades antibacterianas de materiais, apesar das suas limitações, que são, dentre outras, medir apenas componentes que são solúveis em água.<sup>13</sup>

O resultado do condicionamento ácido é favorecer a adaptação do material restaurador a um substrato (esmalte/dentina) limpo e o mais livre possível de microrganismos<sup>14</sup>, visto que bactérias remanescentes podem permanecer na interface dente/restauração e aumentar o risco do desenvolvimento da cárie secundária ou recorrente<sup>15</sup>, sendo tal condição causada pela *smear layer* contaminada que é parcialmente incorporada a camada híbrida.<sup>16</sup>

O ácido fosfórico apresenta um potencial bactericida e remove a *smear layer* sendo largamente empregado na técnica da hidridização.<sup>14</sup> Contudo, alguns estudos demonstram que apesar de ser efetivo na redução do número de bactérias remanescentes, não é capaz de eliminá-las completamente.<sup>17,18,19</sup>

Ao ser avaliado o efeito do condicionamento ácido por um minuto na viabilidade da microflora em cáries oclusais, foi comparada a modificação nesta microflora nas superfícies condicionadas ou não previamente à aplicação de selante autopolimerizável. Observou-se que o condicionamento por si só reduziu em 75% o número de culturas de microrganismos viáveis.<sup>17</sup>

O crescimento e a ácido-tolerância do biofilme dentário têm sido investigados, verificando-se que há uma expressiva tolerância ao ácido do *S. mutans* e *L. casei* em comparação com outras espécies de microrganismos presentes no biofilme oral. Essa característica não é só vista pela sua habilidade de iniciar e manter o crescimento

em níveis baixos de pH mas também pela capacidade de produzir ácido láctico em pH 5,0.<sup>18</sup> Apesar de ser uma propriedade dessas espécies, ambas apresentaram-se sensíveis aos condicionadores ácidos empregados neste estudo, como pode ser visualizado na tabela 1.

Autores previamente analisaram o efeito do condicionamento ácido na presença de colônias bacterianas em assoalhos de preparos cavitários classe I em um ensaio clínico com pacientes com idade variando entre 20 e 26 anos. Aplicou-se ácido fosfórico a 37% na dentina por dez segundos e as amostras obtidas foram analisadas microbiologicamente. Os resultados alcançados revelaram que antes do condicionamento 75% da amostra estava positiva para presença de bactéria e essa porcentagem caiu para 53% da amostra após o tratamento, evidenciando assim que a técnica de condicionamento ácido não foi capaz de remover totalmente as bactérias presentes nos preparos cavitários.<sup>19</sup> Observou-se que o ácido fosfórico não removeu todas as bactérias selvagens nesse ensaio clínico, porém os condicionadores foram efetivos em inibir o crescimento das cepas padrão testadas no presente trabalho.

Alguns estudos propõem a adição de substâncias antimicrobianas aos biomateriais odontológicos uma vez que tal associação pode potencializar o efeito de determinado material.<sup>8</sup> Averiguou-se o efeito antimicrobiano do cimento ionomérico associado a antibióticos (cefalor, ciprofloxacina e metronidazol) em inibir *S. mutans*. Constatou-se um aumento do potencial antibacteriano desse material em relação a *S. mutans*. Os valores médios dos halos de inibição aumentaram 16,7mm do cimento ionomérico convencional para o cimento associado aos antibióticos.<sup>20</sup> A adição da clorexidina a 2% ao ácido fosfórico a 37%, avaliada neste ensaio pela técnica de ágar-difusão, não potencializou o efeito do mesmo, exceto para *S. oralis*.

A clorexidina (desinfetante biocompatível) por apresentar substantividade (manter-se estável e ativa por longos períodos de tempo) e reduzir a população microbiana<sup>21</sup> tem sido agregada a materiais da clínica odontológica.<sup>7</sup> Entretanto, a associação da clorexidina a 2% ao ácido fosfórico a 37% não propiciou um aumento do efeito inibitório, exceto para *S. oralis*, conforme pode ser observado na tabela 1.

Estudo anterior realizado a fim de se verificar a atividade antimicrobiana do ácido fosfórico associado ou não a laserterapia sobre cepas de *S. mutans*. Verificou-se que o ácido fosfórico a 37% apresentou efeito inibitório sobre as cepas e que a associação do laser de baixa intensidade com o ácido fosfórico, independente dos padrões de intensidade, não acarretou um acréscimo inibitório sobre *S. mutans*.<sup>22</sup> Apesar da presente pesquisa, não avaliar a associação da laserterapia ao condicionador ácido, observou-se a atividade antimicrobiana sobre os microrganismos ensaiados.

Diante dos achados desta pesquisa, sugere-se que estudos adicionais sejam realizados com espécies diferentes, abrangendo cepas de referência e selvagem para verificar se a atividade antimicrobiana dos condicionadores ácidos se comporta de forma similar a demonstrada no presente trabalho.

## CONCLUSÃO

O ácido fosfórico a 37% associado ou não à clorexidina apresentou efeito inibitório sobre todas as cepas em teste. A presença da clorexidina a 2% no agente condicionador proporcionou maior efeito inibitório frente *S. oralis*, mas não sobre os demais microrganismos.

## REFERÊNCIAS

1. Buonocore MG. A simple method of increasing the adhesion of acrylic filling materials to enamel surfaces. J Dent Res 1955; 34:849.
2. Silverstone LM, Saxton CA, Dogon IL, Fejerskov O. Variation in the pattern of acid etching of human dental enamel examined by scanning electron microscopy. Caries Res 1975; 9:373-387.
3. Norling BK. Adesão. In: Anusavice KJ. Phillips, materiais dentários. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. p. 357-374.
4. Nunes MF, Conceição EN. Sistemas adesivos. In: Conceição EN. Dentística: saúde e estética. Porto Alegre: Artmed, 2007. p. 130-145.
5. Nyvad B, Marsh PD. A microbiota oral e biofilmes formados sobre os dentes. In: Fejerskov O, Kidd E. Cárie dentária: a doença e seu tratamento clínico. São Paulo: Santos, 2007. p. 29-48.
6. Pashley DH, Carvalho R. Dentin permeability and adhesion. J Dent 1997; 25:355-372.
7. Imazato S, McCabe JF. Influence of incorporation of antibacterial monomer on curing behavior of a dental composite. J Dent Res 1994; 73:1641-1645.
8. Pinheiro SL, Nascimento TC, Bernardes T, Silvestre FHDS, Ribeiro MC. Avaliação da capacidade antimicrobiana dos sistemas adesivos associados a própolis ou a antibióticos sobre *S. mutans*. Rev Cienc Med 2007; 16:15-22.
9. Alcântara AC, Funchal-Filho SP, Nascimento TC, Alves-Neto A, Pinheiro SL. Influência da associação de

- antibióticos no sistema adesivo de frasco único: avaliação da adaptação marginal. In: 24ª Reunião Anual SBPqO, 2007; Atibaia; 2007.
10. Santos Filho L. Introdução à rotina em Microbiologia Clínica. In: Santos Filho L. Manual de Microbiologia Clínica. João Pessoa: Editora Universitária/UFPB, 2006. p. 17-50.
11. Nascimento GGF, Locatelli J, Freitas PC, Silva GL. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Braz J Microbiol* 2000; 31:247-256.
12. Gondim JO. Atividade antibacteriana de sistemas adesivos dentinários autocondicionantes sobre bactérias cariogênicas [dissertação]. Araraquara: Universidade Estadual Paulista; 2006.
13. Tobias RS. Antibacterial properties of dental restorative materials: a review. *Int Endod J* 1988; 21:155-160.
14. Figueiredo JAP, Grecca FS, Conceição EN. Manejo do complexo dentina-polpa em Dentística. In: Conceição EN. Dentística: saúde e estética. Porto Alegre: Artmed, 2007. p. 146-161.
15. Feuerstein O, Matalon S, Slutzky H, Weiss EI. Antibacterial properties of self-etching dental adhesive systems. *J Am Dent Assoc* 2007; 138:349-354.
16. Tay FR, Carvalho R, Sano H, Pashley DH. Effect of smear layers on the bonding of self-etching primer to dentin. *J Adhes Dent* 2000; 2:99-116.
17. Jensen OE, Handelman SL. Effect of an autopolymerizing sealant on viability of microflora in occlusal dental caries. *Scand J Dent Res* 1980; 88:382-388.
18. Harper DS, Loesche WJ. Growth and acid tolerance of human dental plaque bacteria. *Archs oral Biol* 1984; 29:843-848.
19. Luglié PF, Delitala PP, Zanetti S, Sanna S. An in-vivo bacteriological study on the effects of acid etching at the bottom of cavities. *Minerva Stomatol* 1998; 47:19-26.
20. Pinheiro SL, Lorenzetti S, Oda M. Atividade antimicrobiana *in vitro* dos cimentos de Ionômeros de vidro associados à própolis ou antibióticos. *Rer Assoc Paul Cir Dent* 2003; 57:215-219.
21. Ferraz CCR, Gomes BPFA, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. In vitro assessment of the antimicrobial action and the mechanical ability of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. *J Endod* 2001; 27:452-455.
22. Nascimento TC, Alves-Neto A, Funchal-Filho SP, Alcântara AC, Pinheiro SL. Avaliação do efeito antimicrobiano do ácido fosfórico associado ou não a laserterapia sobre cepas de *S. mutans*. In: 24ª Reunião Anual SBPqO, 2007; Atibaia; 2007.

Recebido em 08/04/2011

Aceito em 20/06/2011