



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Trabalho de Conclusão de Curso

Aluno(a): Cristiane Dione Palacios Kawachi

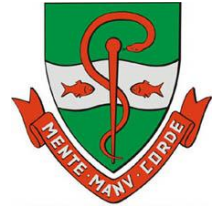
Orientador(a): Lívia Maria Andaló Tenuta

Ano de Conclusão do Curso: 2011

Livia M. A. Tenuta
Assinatura do(a) Orientador(a)



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



Retenção de cálcio e fluoreto na superfície de *S. mutans* e sua liberação em função do pH – estudo *in situ*

Aluna: Cristiane Dione Palacios
Kawachi

PIRACICABA

2011

Cristiane Dione Palacios Kawachi

**Retenção de cálcio e fluoreto na superfície de *S. mutans*
e sua liberação em função do pH – estudo *in situ***

Orientadora: Lívia Maria Andaló Tenuta

PIRACICABA

2011

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Marilene Girello - CRB 8/6159

K179r Kawachi, Cristiane Dione Palacios, 1987-
Retenção de cálcio e fluoreto na superfície de *S.*
mutans e sua liberação em função do pH – estudo *in*
situ / Cristiane Dione Palacios Kawachi. -- Piracicaba,
SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Lívia Maria Andaló Tenuta.
Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) –
Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de
Odontologia de Piracicaba.

1. Biofilme. 2. Cárie dentária. I. Tenuta, Lívia Maria
Andaló, 1976- II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

**Dedico este trabalho aos meus pais e ao meu
avô que sempre estão ao meu lado.**

AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra. Lívia Maria Andaló Tenuta que me ajudou diretamente neste trabalho, mas que além de tudo me apoiou desde o início, acreditou em mim e em muitos momentos foi uma ótima conselheira.

À Prof. Dra. Altair Bel Del Cury que me ajudou no trabalho e tem me ajudado bastante na clínica odontológica sendo não só a professora que dá elogios mas a que sabe fazer críticas construtivas quando necessário.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba que me ajudou na transição de pessoa para profissional da saúde.

A todas as pessoas que participaram indiretamente neste trabalho, meus profundos agradecimentos.

RESUMO

A utilização de fluoreto (F) tem sido considerada extremamente importante no controle da cárie dental, devido a seu efeito na diminuição da desmineralização e ativação da remineralização do esmalte e dentina. Para isso, o F deve ser mantido no meio ambiente bucal, em especial no biofilme dental, e meios que promovam sua retenção nesse local deveriam ser investigados. Após a utilização de agentes fluoretados, o F pode ficar retido no biofilme dental ligado a íons cálcio (Ca) presentes na superfície bacteriana, ou precipitado na forma de fluoreto de cálcio. Desses reservatórios, o F pode ser liberado, o que seria importante durante a queda de pH que ocorre no biofilme dental frente a um desafio cariogênico. Assim, objetivo deste estudo foi estudar a retenção do F ligado a bactérias do biofilme dental, bem como sua liberação em pHs decrescentes. Dois estudos *in situ* foram realizados, utilizando placa teste produzida *in vitro* a partir de *Streptococcus mutans*, a fim de obter condições controladas para a ligação do Ca e F à superfície bacteriana. Posteriormente, a liberação desses íons a partir dos sítios bacterianos foi estudada, avaliando-se o efeito de tampões em pHs decrescentes nessa liberação. Os resultados sugerem que a exposição a baixas concentrações de F é capaz de aumentar o reservatório biológico de F do biofilme, que pode ser liberado para o fluido para exercer seu efeito anticárie.

PALAVRAS-CHAVE:

Flúor, cálcio, *Streptococos mutans*, *biofilme* e pH

ABSTRACT

Fluoride (F) use has been considered extremely important for dental caries control, due to its effect to reduce demineralization and activate remineralization of enamel and dentine. For this purpose, F must be maintained in the oral cavity, in special in the dental biofilm, and methods of F use which promote its retention at this site should be investigated. After the utilization of F agents, F can be retained in dental biofilm binded to calcium ions (Ca) existing at the bacterial surface, or precipitated as calcium fluoride. From these reservoirs, F can be released, what would be important during the pH drop that occurs in the dental biofilm, during a cariogenic challenge. Therefore, this aim of this study was to evaluate the retention of F in dental biofilm bacteria, as well as its release at decreasing pHs. Two studies *in situ* were performed, using a test plaque produced *in vitro* from *Streptococcus mutans*, in order to obtain controlled conditions for Ca and F binding to the bacterial surface. Afterwards, the release of these ions from the bacterial sites has been studied. The results suggest that short-term exposure of plaque to low F concentrations is able to dose-dependently increase plaque biological F reservoirs, which could act as a source of F to plaque fluid.

KEY-WORDS:

Fluoride, calcium, *Streptococcus mutans*, *biofilme* and pH

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. PROPOSIÇÃO	3
3. MATERIAIS E MÉTODOS	4
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	8
5. CONCLUSÃO	13
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	14

1. INTRODUÇÃO

Apesar do declínio na prevalência de cárie dental observado no Brasil e no mundo nas últimas décadas, grupos de indivíduos considerados de alto risco ainda apresentam índices de cárie elevados [Narvai *et al.*, 2006]. Para esses indivíduos, métodos mais eficientes de controle da doença deveriam ser investigados.

Em todos os meios de utilização do F, o objetivo final é a manutenção do íon na cavidade bucal, em especial no fluido do biofilme dental, para interferir no processo de desmineralização e ativar remineralização. Assim, havendo F disponível no fluido do biofilme, o grau de saturação desse fluido em relação à fluorapatita aumenta, e no evento de queda de pH, ao mesmo tempo em que a hidroxiapatita, mineral mais solúvel, se dissolve, ocorre a reprecipitação de cálcio, fosfato e F na estrutura dental na forma de fluorapatita, mineral menos solúvel [Pearce, 1998; ten Cate, 1999]. Isso reduz a perda mineral líquida e conseqüentemente os sinais clínicos de cárie dental.

Em todos os meios tópicos de utilização de F, a retenção na cavidade bucal é limitada pelo fluxo salivar, que acaba por rapidamente diluir o F que foi aplicado. Entretanto, o íon pode ficar retido em reservatórios na superfície dental ou no biofilme, de acordo com a concentração de F do agente aplicado.

No biofilme, o F pode estar: 1) ligado a íons Ca na superfície bacteriana ou em proteínas da matriz do biofilme, ou 2) precipitado na forma de CaF_2 . A ligação do F com o Ca em bactérias/proteínas é função da disponibilidade de Ca e do pH do fluido do biofilme, tendo em vista que o Ca em si está ligado a grupamentos fosfato que podem ser protonados pela diminuição do pH, diminuindo a ligação do cátion [Rose *et al.*, 1993; 1996]. Assim, durante uma queda de pH no biofilme, Ca e F são liberados desses reservatórios, aumentando sua disponibilidade no fluido do biofilme. Esse F ligado a bactérias/proteínas é o principal reservatório de F em condições de repouso, horas após a exposição a agentes fluoretados.

O conhecimento existente sobre o reservatório biológico de F no biofilme (F ligado a bactérias/proteínas) é proveniente de estudos *in vitro* com bactérias tratadas com Ca radioativo e F, em concentrações acima daquelas encontradas fisiologicamente no fluido do biofilme dental [Rose *et al.*, 1993;

1996]. No entanto, nenhum estudo controlado avaliou a incorporação de F nesses reservatórios e sua liberação em condições que simulem aquelas da cavidade bucal, como a concentração de Ca normalmente encontrada no fluido do biofilme. Isso poderia ser estudado utilizando modelos *in situ*, nos quais a cavidade bucal de voluntários é utilizada como cenário dos eventos a serem investigados, sendo possível controlar variáveis como o biofilme formado.

Assim, neste trabalho, a ligação de Ca e F a bactérias e sua liberação em função do decréscimo de pH foi estudada utilizando um modelo *in situ* de curta duração, permitindo a padronização de diversas variáveis.

2. PROPOSIÇÃO

O objetivo desse projeto foi estudar a ligação de Ca e F em uma placa teste de *Streptococcus mutans* e sua liberação mediante decréscimo de pH.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Delineamento experimental

Um modelo in situ de curta duração [Zero *et al.*, 1992; Cury *et al.*, 2003; 2005] foi utilizado para estudar de forma padronizada a ligação de Ca e F à superfície da bactéria *Streptococcus mutans*, simulando o que ocorreria no biofilme dental. Um estudo preliminar foi realizado para avaliar a ligação do Ca à superfície bacteriana. Em seguida, outro estudo foi realizado para determinar a ligação de F a esses sítios de ligação de Ca, e sua liberação em pHs decrescentes.

Estudo 1: Tempo de saturação da placa teste de *S. mutans* com Ca proveniente da saliva.

Nesse estudo foi determinado o tempo necessário para que o Ca presente na saliva de voluntários se ligue à superfície das bactérias da placa teste de *S. mutans*. Dez voluntários adultos saudáveis utilizaram dispositivos intrabucais palatinos contendo placa teste de *S. mutans*, que foi coletada em diferentes tempos para determinação da quantidade de Ca presente. Os tempos de coleta foram 5, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos após o início de uso do dispositivo in situ. Após a coleta, o fluido da placa teste foi obtido por centrifugação, sendo determinada a concentração de Ca livre (iônico). A porção sólida da placa será tratada com ácido clorídrico 0,5 M, para determinação da concentração total de Ca. O tempo necessário para a saturação dos sítios de ligação de Ca presentes na placa teste foi calculado por meio de análise de regressão.

Estudo 2: Ligação do F a bactérias na placa teste e liberação em diferentes pHs.

Neste estudo foi testada a retenção do F ligado a bactérias na placa teste. Em um delineamento cruzado, duplo cego, dez voluntários adultos saudáveis utilizaram dispositivos intrabucais palatinos contendo placa teste de *S. mutans* por um período de tempo definido no Estudo 1 (para a ligação prévia com íons Ca da saliva). Os voluntários então realizaram um bochecho com

soluções de F em concentrações crescentes, porém abaixo do limite de solubilidade do CaF_2 (0, 1,5 e 10 ppm F, sendo cada concentração testada em um fase experimental distinta). Assim, o F ficou retido na porção sólida da placa teste apenas por ligação ao Ca na superfície bacteriana. Após 30 minutos tempo definido em estudo piloto, a placa teste foi coletada e as concentrações de Ca iônico e F no fluido da placa teste foram determinadas. A porção sólida da placa será tratada com tampão com a mesma concentração de Ca iônico e F determinados no fluido, porém com pHs decrescentes (6,5 a 4,5), para determinar a liberação do Ca e F, simulando o que ocorreria na boca durante um desafio cariogênico. Ao final das extrações, a placa teste foi tratada com ácido clorídrico 0,5 M para remoção total do Ca e F ainda presentes. Dessa forma, será definida a faixa de pH para a liberação do Ca e F dos sítios de ligação bacterianos.

3.2. Descrição da análise do fluido da placa teste

3.2.1. Obtenção do fluido do biofilme

Ponteiras de 10 μL , preenchidas com óleo mineral extra-pesado (Drake Oil número 35, da Penreco) e vedadas na extremidade foram utilizadas como um tubo de microcentrífuga. Imediatamente após a coleta da placa teste com uma espátula plástica, esta foi imersa no óleo mineral, para evitar o ressecamento. A ponteira contendo a amostra foi pesada para determinação do peso do biofilme coletado. Após a pesagem, a ponteira foi centrifugada, adaptada a um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL, a 4°C, por 5 minutos a 21.000 g.

Após a centrifugação, foi possível visualizar 3 fases na ponteira de 10 μL adaptada: precipitado de placa (porção sólida), fluido de placa e óleo mineral. Utilizando micropipetas de vidro, sob um microscópio estereoscópico com aumento de 6 a 40 X, o fluido da placa será coletado (figura 1).

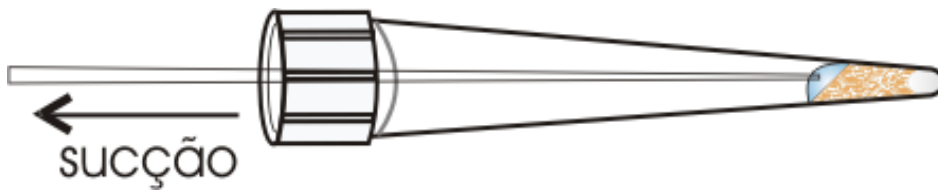
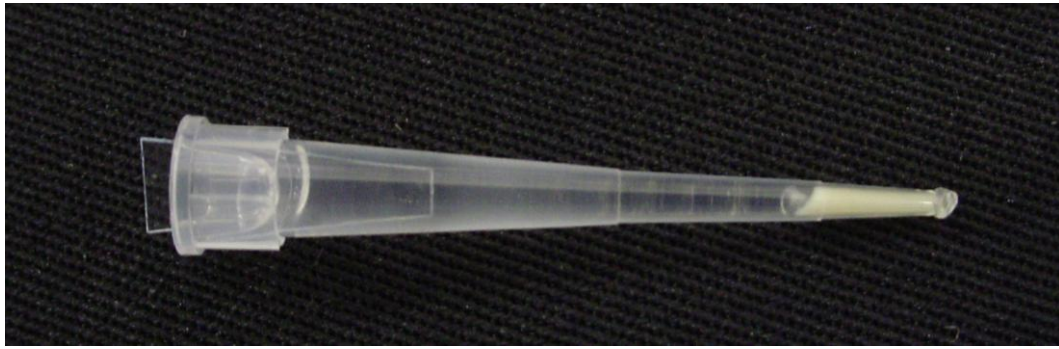


Figura 1: Separação e coleta do fluido da placa teste.

3.2.2. Dosagem de F no fluido da placa teste

Para a dosagem de F no fluido da placa teste, foi utilizado um eletrodo específico para o íon, adaptado para microanálise [Tenuta et al., 2006]. As amostras foram aplicadas na superfície do cristal sensível a F do eletrodo íon-específico, sob óleo mineral, utilizando micropipetas. Sob microscópio, um microeletrodo de referência foi trazido em contato com cada uma das amostras, fechando o circuito e permitindo a determinação da concentração de F através de um potenciômetro.

Previamente à determinação da concentração de F nas amostras de fluido, é necessária o tamponamento com TISAB III (total ionic strength adjustment buffer). Para essa diluição, alíquotas de TISAB III foram aplicadas na superfície do eletrodo, sendo que as amostras de fluido foram aplicadas sobre essas alíquotas, em volume proporcional a 10 partes de amostra para 1 parte de TISAB III. Previamente à diluição das amostras, o operador calibrado aferiu a diluição, utilizando um padrão de concentração conhecida, tolerando um máximo de 3% de variação entre a concentração esperada e a obtida.

3.2.3. Dosagem de Ca iônico no fluido da placa teste

Amostras de fluido não diluídas com TISAB III (que altera o pH e a concentração de Ca iônico) foram depositadas na superfície do eletrodo de F. Nesse caso o eletrodo funcionou apenas como base para a colocação das amostras. Microeletrodo de Ca foi confeccionado como descrito por Vogel et al. [2000]. Os microeletrodos de referência e de Ca foram trazidos em contato com cada alíquota de fluido, sendo determinada a sua concentração frente a padrões de concentração de Ca conhecida.

3.3. Descrição da análise da porção sólida da placa teste

A porção sólida da placa teste foi tratada com diferentes tampões ou com ácido clorídrico para extração do Ca e F presentes, como descrito nos estudos acima. A determinação da concentração de F nos extratos foi realizada utilizando a mesma metodologia descrita para o fluido (3.2.2). Já a concentração de Ca total foi determinada utilizando o reagente colorimétrico Arsenazo III [Vogel et al., 1983]. A absorbância da mistura de padrões de concentração conhecida de Ca ou das amostras foi determinada a 650 nm em leitora de microplacas (Multiskan Spectrum, Thermo).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudo 1:

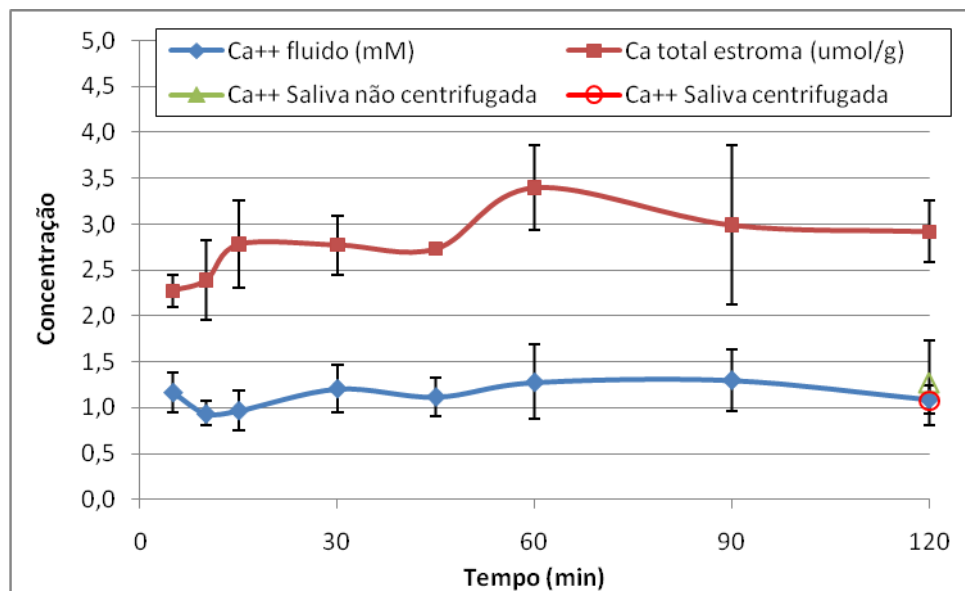


Figura 1: Ligação de Ca proveniente da saliva da placa teste de *S. mutans* em função do tempo de exposição na cavidade bucal. Em azul concentração de Ca iônico no fluido, e em vermelho a concentração de Ca total ligado as bactérias.

Os resultados apresentados na figura 1 demonstram que a ligação de Ca a partir da saliva se estabiliza após alguns minutos na cavidade bucal, pois mesmo após 2 horas, a concentração de Ca ligado às bactérias é semelhante ao encontrado após 15 minutos. Com base nos resultados obtidos, o tempo de 15 minutos foi utilizado no estudo 2 , realizado na seqüência deste.

Piloto do estudo 2:

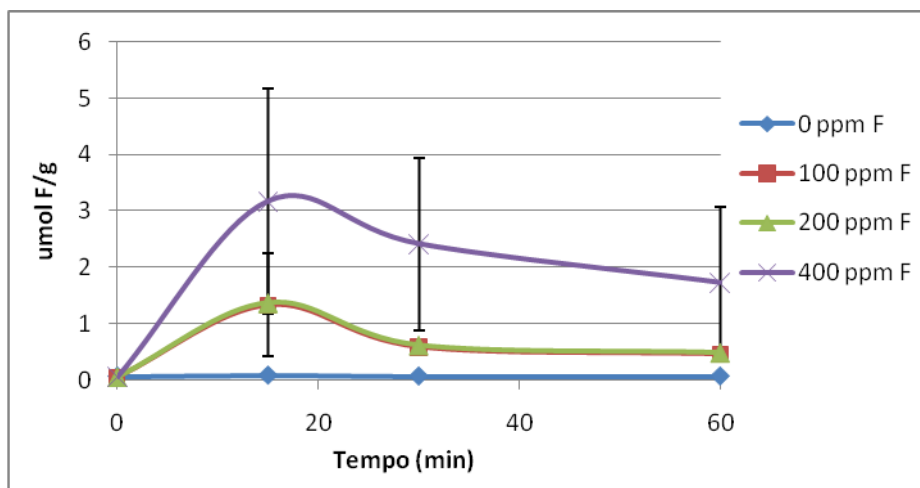


Figura 2: Concentração de F no fluido da placa teste após o uso de soluções fluoretadas.

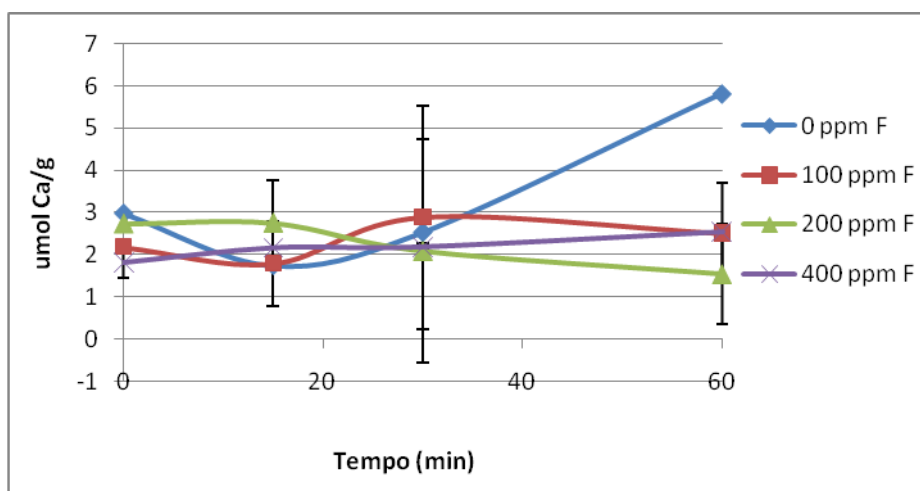


Figura 3: Concentração de Ca iônico no fluido da placa teste após o uso de soluções fluoretadas.

As figuras 2 e 3 representam as concentrações de Ca e F no fluido da placa teste nos diferentes momentos, imediatamente antes ou 15, 30 e 60 minutos após bochecho com soluções fluoretadas. Nessas concentrações usadas (100, 200 e 400 ppm F) está prevista a formação de CaF_2 . A diminuição na concentração de Ca observada no fluido deve estar relacionada a isso.

Nesse piloto, pode ser observado que o tempo de 30 minutos após o bochecho fluoretado poderia ser usado no estudo 2, pois apesar da diminuição em relação ao dado de 15 minutos, a concentração de F ainda permanece alta em relação ao baseline.

Estudo 2:

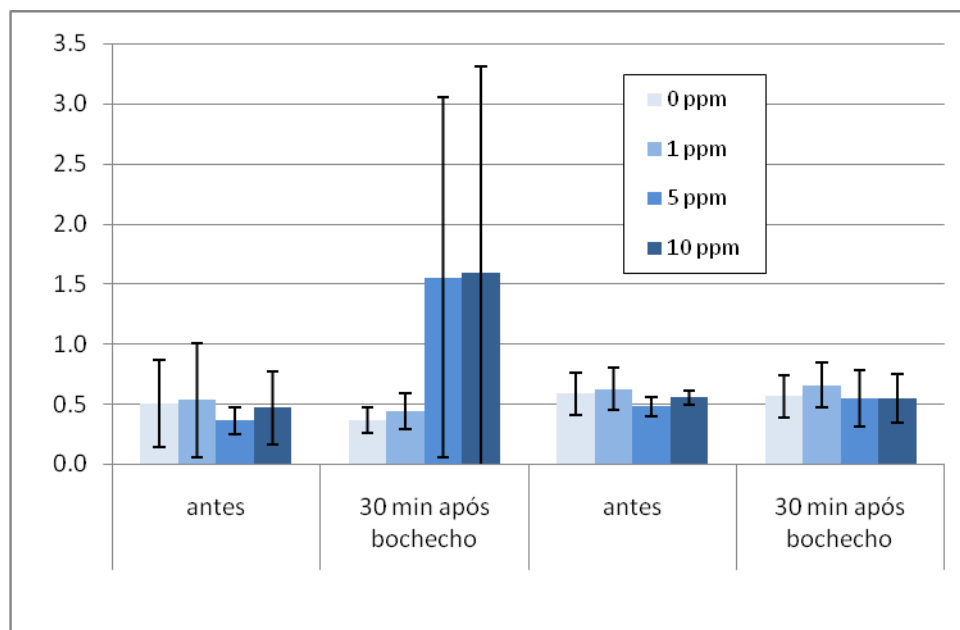


Figura 4: Concentração de F e Ca na saliva dos voluntários, antes ou 30 minutos após o bochecho com as respectivas soluções fluoretadas.

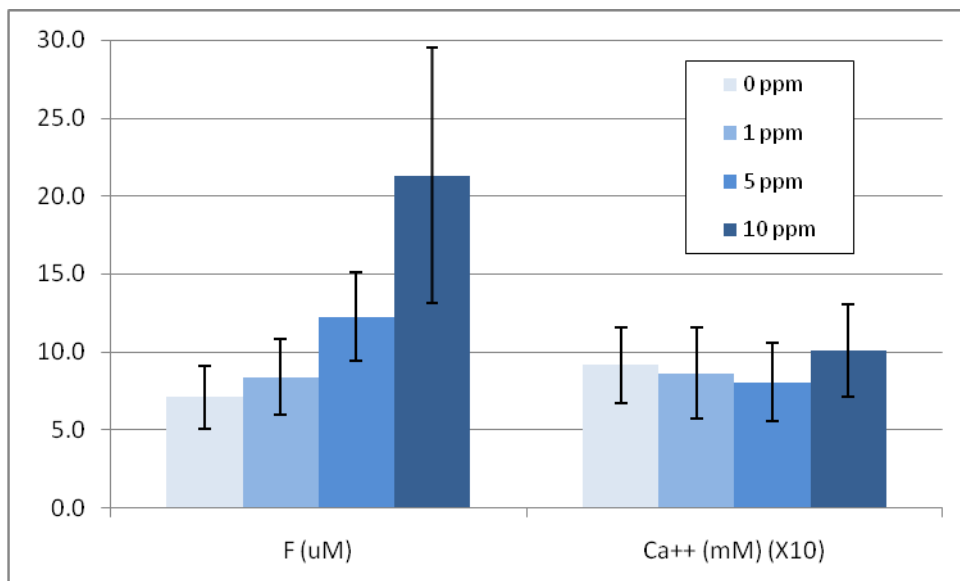


Figura 5: Concentração de F e Ca iônico no fluido da placa teste coletada 30 minutos após o bochecho com as respectivas soluções fluoretadas.

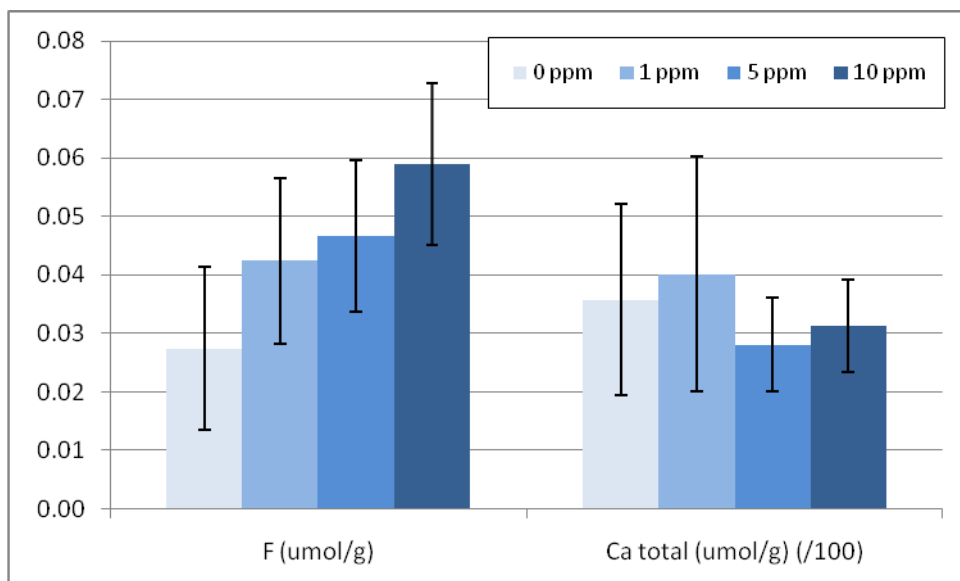


Figura 6: Concentração de F e Ca total na parte sólida da placa teste coletada 30 minutos após o bochecho com as respectivas soluções fluoretadas.

A figura 4 apresenta as concentrações de F e Ca na saliva, antes e após o bochecho com as soluções fluoretadas (0,1, 5 e 10 ppm). É possível observar que, mesmo após 30 minutos do bochecho, a concentração de F na saliva permanece ligeiramente alta para os grupos 5 e 10 ppm F, em relação

aos demais. O bochecho com solução de 1 ppm de F, já não apresenta diferença em relação ao controle negativo nesse tempo. Para o Ca, não foram observadas alterações. Na figura 5 e 6, pode-se observar que a concentração de F no fluido e na parte sólida da placa teste após o bochecho com as soluções fluoretadas apresentaram tendência de aumento de acordo com o aumento na concentração da solução utilizada. Isso demonstra que, mesmo após utilizar uma solução fluoretada com uma concentração de F relativamente baixa (5 a 10 ppm F), é possível aumentar a quantidade de F ligado nos sítios bacterianos. Para o Ca, nenhuma tendência de alteração foi observada em relação as soluções fluoretadas usadas.

5. CONCLUSÃO

Os resultados sugerem que após uma exposição de curta duração da placa a baixas concentrações de F são capazes de dose dependente o aumento de reservatório de F biológico que pode atuar como um tipo de F no fluído da placa

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cury JA, Francisco SB, Simões GS et al. Effect of a calcium carbonate-based dentifrice on enamel demineralization in situ. **Caries Res.**, v.37, n.3, p.194-9, May/Jun. 2003.
2. Cury JA et al. Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in the presence of sucrose or glucose and fructose. **Caries Res.**, v.34, p.491-7, 2000.
3. Narvai PC, Frazão P, Roncalli AG, Antunes JLF. Cárie dentária no Brasil: declínio, polarização, iniquidade e exclusão social. **Revista Panam Salud Publica** 2006; 19(6):385-93.
4. Pearce E. Plaque minerals and dental caries. **N. Zeal. dent. J.**, v.94, p.12-5, Mar. 1998.
5. Rose RK, Dibdin GH, Shellis RP. A quantitative study of calcium binding and aggregation in selected oral bacteria. **J Dent Res** 1993;72(1):78-84.
6. Rose RK, Shellis RP, Lee AR. The role of cation bridging in microbial fluoride binding. **Caries Res** 1996;30:458-64.
7. Ten Cate JM. Current concepts on the theories of the mechanism of action of fluoride. **Acta Odontol. Scand.**, v.57, p.325-9, 1999.
8. Tenuta LMA, Del Bel Cury AA, Bortolin MC, Vogel GL, Cury JA. Ca, Pi and F in the fluid of biofilm formed under sucrose. **J. dent. Res.**, v.85, p.834-8, 2006.
9. Vogel GL, Chow LC, Brown WE. A microanalytical procedure for the determination of calcium phosphate and fluoride in enamel biopsy samples. **Caries Res.**, v.17, p.23-31, 1983.
10. Vogel GL, Zhang Z, Chow LC, Carey CM, Schumacher GE, Banting DW. Effect in vitro acidification on plaque fluid composition with and without a NaF or a controlled-release fluoride rinse **J Dent Res.** 2000 Apr;79(4):983-90.
11. Zero DT, Fu J, Anne KM et al. An improved intra-oral enamel demineralization test model for the study of dental caries. **J Dent Res.** 1992;71(Spec Iss):871-8.

