



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Monografia de Final de Curso

Aluno(a): Leandro Bernardo Braz Ventura

Orientador(a): Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo

Ano de Conclusão do Curso: 2006

TCC 279

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
BIBLIOTECA

Leandro Bernardo Braz Ventura

**Avaliação *in-vitro* do efeito da nicotina, cotinina e cafeína sobre a
microbiota periodontal.**

Monografia apresentada ao Curso de
Odontologia da Faculdade de Odontologia de
Piracicaba – UNICAMP, para obtenção do
diploma de Cirurgião-Dentista.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo

Piracicaba
(2006)

Dedico este trabalho aos meus pais Elcio e Marise, modelos de vida, que sempre estiveram ao meu lado e não mediram esforços para que todos os meus sonhos se realizassem.

Ao meu irmão Tiago, pelo seu carinho e companheirismo nesta caminhada.

Às minhas avós Dagmar e Benedita, por sempre rezarem por mim.

Ao meu amigo Mário e família, por conviverem comigo durante todo esse tempo, sempre com alegria e inesquecível amizade;

Ao Prof. Dr. Sérgio Cândido Dias e sua equipe pela grande colaboração em meu estágio, realizado em sua clínica.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo pelo carinho e atenção com que sempre me orientou, por sua dedicação exemplar e por dar-me a oportunidade de desenvolver este trabalho;

À Karina Cogo, minha co-orientadora, que sempre esteve disposta a ajudar, pacientemente, oferecendo-me condições para chegar até aqui.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP por possibilitar a realização deste curso de graduação.

A todos os meus amigos, em especial Victor e João Leandro, que me acompanharam durante esses quatro anos, trazendo-me alegrias e o apoio necessário;

Sobretudo a DEUS, por permitir tantas conquistas e por sempre dar-me forças para continuar minha jornada.

SUMÁRIO

Página

LISTA DE GRÁFICOS.....	6
LISTA DE ABREVIATURAS E PALAVRAS EM LATIM.....	7
RESUMO.....	8
INTRODUÇÃO.....	9
OBJETIVO.....	15
DESENVOLVIMENTO	
- Justificativa.....	16
- Materiais e Métodos.....	18
- Resultados.....	24
DISCUSSÃO.....	30
CONCLUSÃO.....	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34

LISTAS DE GRÁFICOS

Página

Gráfico 1. Curva de crescimento <i>Streptococcus mitis</i>	24
Gráfico 2. Curva de crescimento <i>Streptococcus oralis</i>	24
Gráfico 3. Crescimento bacteriano (<i>Streptococcus mitis</i>) após 18 horas de exposição às substâncias teste. Os valores de concentração iguais a zero referem-se ao controle positivo de crescimento.....	26
Gráfico 4. Crescimento bacteriano (<i>Streptococcus oralis</i>) após 18 horas de exposição às substâncias teste. Os valores de concentração iguais a zero referem-se ao controle positivo de crescimento.....	26/27

LISTA DE ABREVIATURAS E PALAVRAS EM LATIM

in vitro = em vidro

in vivo = em vida

et. al. = e outros

RESUMO

As doenças periodontais são infecções causadas por microrganismos que colonizam a superfície dental na margem gengival ou abaixo dela. Um dos principais agravantes dessa patologia é o uso do tabaco. Estudos têm reportado associação entre o cigarro e a perda óssea alveolar, perda de inserção periodontal, bem como aumento da severidade das periodontopatias. No entanto, pouco se sabe sobre o efeito das principais substâncias presentes no cigarro, entre elas a nicotina e a cotinina, sobre os agentes etiológicos destas doenças. Pouco se sabe também a respeito da cafeína, a qual está intimamente relacionada com o tabagismo. Assim, o objetivo desse estudo será avaliar a *atividade in vitro* da nicotina, cotinina e cafeína, comparando-os com a clorexidina, sobre estreptococos orais. As ações dessas substâncias serão avaliadas em culturas planctônicas.

INTRODUÇÃO

A cavidade bucal, de modo similar a outros sítios do corpo humano apresenta uma microbiota natural com composição característica, a qual coexiste de modo harmônico com o hospedeiro. Entretanto, a maioria dos indivíduos sofre, em algum período de sua vida, episódios localizados de doenças bucais que são causados por um desequilíbrio na composição da microbiota bucal residente (MARSH & MARTIN, 1992). As manifestações clínicas deste desequilíbrio incluem a cárie dental e a doença periodontal.

As doenças periodontais são infecções causadas por microrganismos que colonizam a superfície dental na margem gengival ou abaixo dela. Esses formam um biofilme patogênico que se adere sobre a superfície dental, de modo a produzir ácidos e produtos citotóxicos que levam a desmineralização do esmalte e/ou à inflamação gengival (SOCRANSKY & HAFFAJEE, 2002). Uma das principais causas da instalação dessas doenças é o tabagismo.

Existem evidências substanciais sobre o efeito prejudicial do fumo na saúde periodontal. Em um trabalho conduzido por CALSINA et al. (2002), indivíduos fumantes e fumantes antigos tiveram incidência de doença periodontal 2,7 e 2,3 vezes maior do que indivíduos não fumantes, independente de sexo, idade ou índice de placa.

Estudos têm mostrado a associação entre o cigarro e a perda óssea alveolar, redução da inserção periodontal, bem como o aumento da prevalência e a severidade das periodontites (MACGREGOR, 1992; PREBER & BERGSTROM,

1986; BERGSTROM & ELIASSON, 1987; BERGSTROM, 1989, HABER et al., 1993; BROWN et al., 1994; BERGSTROM & PREBER, 1994; GROSSI et al., 1994, 1995; SCHENKEIN et al., 1995; ALPAGOT et al., 1996; MULLALY et al., 1996; BECK et al., 1997; DOLAN et al., 1997; MACHTEI et al., 1997, 1999; AXELSSON et al., 1998; GUNSOLLEY et al., 1998; NORDERYD & HUGOSON, 1998; PERSSON et al., 1998; ELTER et al., 1999; HAFFAJEE & SOCRANSKY, 2001). As alterações do ligamento periodontal ocorrem devido a modificações nos fibroblastos, ocasionadas pelo fumo (GAMAL & BAYOMY, 2002).

Foi observado que em mulheres fumantes no período de pós-menopausa (HILDEBOLT et al., 1997) e em pacientes com AIDS fumantes (PERSSON et al., 1998b) existe um maior risco de perda de inserção alveolar quando comparado com pacientes não fumantes da mesma condição. Pacientes diabéticos fumantes também têm maior probabilidade de desenvolver doenças periodontais do que aqueles que não fumam (MOORE et al., 1999).

A terapia periodontal em fumantes é menos eficaz do que em não fumantes, apresentando menor melhoria da profundidade de sondagem, dos níveis de inserção periodontal e resultados menos promissores em cirurgias de implantes (JOHNSON & HILL, 2004).

O tabaco tem sido associado a várias lesões da cavidade oral, como manchas nos dentes, melanoses, gengivite ulcerativa necrosante aguda, e outras condições de lesões periodontais, assim como queimaduras e placas queratinosas, língua saburrosa negra, estomatites, erosões no palato, leucoplasia, displasia epitelial e carcinoma (MIRBOD & AHING, 2000).

Indivíduos fumantes apresentam as respostas inflamatórias e imunes aos patógenos periodontais prejudicadas, com deficiência da função neutrofílica (OBEID & BERCY, 2000; KINANE & CHESTNUTT, 2000). Além dessa alteração, a produção de citocinas inflamatórias como a IL-1b e IL-8, está aumentada no fluido gengival crevicular de pacientes fumantes com gengivites (GIANNOPOULOU et al., 2003). O aumento de citocinas como a IL-1b e TNF- α também foi observado em um estudo *in vitro* que avaliou a secreção dessas substâncias por células mononucleares expostas à fumaça de tabaco (RYDER et al., 2002).

Estudos associam o uso do tabaco ao aumento da hemorragia (BERGSTROM & BOSTRON, 2001) e a resposta vasoconstritora do tecido gengival (MAVROPOULOS et al., 2003).

No entanto, a relação entre o uso do tabaco e a microbiota oral ainda não foi bem esclarecida. HAFFAJEE & SOCRANSKY (2001) examinaram a prevalência, a proporção e os níveis de espécies bacterianas subgengivais em adultos fumantes e não fumantes. Foram observadas grandes diferenças na prevalência de algumas bactérias, principalmente dos periodontopatógenos, na microbiota de pacientes fumantes durante a formação do biofilme. Em outro estudo conduzido, foram avaliadas as proporções de 40 espécies bacterianas em amostras de superfície de tecidos moles e saliva de indivíduos, com ou sem periodontite em fumantes e não fumantes. No entanto, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre a proporção de espécies

bacterianas de fumantes e não fumantes, havendo somente diferença entre os grupos compostos por indivíduos com ou sem periodontite (MAGER et al., 2003).

Entre as mais de 4000 substâncias resultantes da combustão do tabaco e presentes na fumaça do cigarro, como o monóxido de carbono, radicais oxidativos, carcinógenos (ex. nitrosaminas), etc., estão as substâncias psicoativas viciantes, como a nicotina e a cotinina (TONETTI, 1998). A nicotina é considerada a substância farmacologicamente mais ativa do tabaco. A maior parte dela é absorvida pela mucosa alveolar, mas a sua absorção pode ocorrer também, de forma mais lenta, através da mucosa oral, em quantidades suficientes para induzir efeitos farmacológicos (ARMITAGE & TURNER, 1970). Sua metabolização ocorre rapidamente no organismo, tendo uma meia vida plasmática de aproximadamente 2 horas (HAGAN, 1996).

Muitos dos efeitos indesejáveis do cigarro são atribuídos à nicotina, relacionando-a com os processos patológicos do tecido periodontal. A perda óssea alveolar que ocorre em indivíduos fumantes pode estar relacionada a estímulos dos osteoclastos pela nicotina (HENEMYRE et al., 2003). Muitos estudos têm observado modificações nos fibroblastos induzidas pela nicotina (LEONARDI, 1999; LAHMOUZI et al., 2000; CHANG et al., 2002; CHANG et al., 2003a; XU et al., 2003). O stress pode elevar os efeitos maléficos da nicotina no tecido periodontal (BENATTI et al., 2003).

Têm sido reportadas alterações no processo inflamatório pela nicotina, como a estimulação da secreção de prostaglandina E_2 por monócitos plasmáticos (PAYNE et al., 1996), o aumento de um mediador pró-inflamatório, o peptídeo relacionado ao gene de calcitonina contribuindo para a inflamação neurogênica

(DUSSOR et al., 2003), expressão ativada do RNA mensageiro para produção da enzima COX-2 em fibroblastos (CHANG et al., 2003b), inibição das funções de defesa dos neutrófilos (PABST et al., 1995), estimulação de apoptose por células polimorfonucleares e inibição da liberação de IL-1 e da expressão da atividade pró-coagulante de monócitos induzidos por lipopolissacarídeos (MARIGGIO et al., 2001).

A cotinina, um dos seus principais metabólitos, possui uma meia-vida bem mais longa, aproximadamente de 20 horas, o que faz com que sua presença seja pesquisada como indicador de exposição à nicotina (ERAMO et al., 2000). Devido à rápida metabolização da nicotina, a cotinina é encontrada em maior quantidade do que a nicotina nos fluídos biológicos, inclusive na saliva (GHOSHEH, 2000).

Além da nicotina e da cotinina, a cafeína está presente em maior quantidade nos líquidos biológicos de indivíduos fumantes. Essa evidência foi relatada em estudos epidemiológicos que constataram que os fumantes tendem a consumir em maior quantidade, bebidas e outros produtos que contenham cafeína do que não fumantes. Esses estudos têm demonstrado uma associação positiva entre o fumo e o hábito de beber café (BROWN & BENOWITZ, 1989; KALOW & TANG, 1991; SWASON et al., 1994).

Mesmo tendo o conhecimento de que substâncias como a nicotina, cotinina e cafeína estão presentes na cavidade oral de fumantes e que elas podem estar intimamente ligadas à causa das doenças periodontais, pouco se sabe sobre os seus efeitos na microbiota bacteriana bucal.

Desse modo, o presente estudo pretende avaliar o efeito dessas substâncias sobre estreptococos orais, nas formas planctônicas, comparando os resultados à ação anti-séptica já conhecida da clorexidina.

OBJETIVO

Avaliar *in vitro* a atividade da nicotina, cotinina e cafeína, comparando-as com a clorexidina, sobre estreptococos orais em culturas planctônicas.

DESENVOLVIMENTO

Justificativa

O vício de fumar ainda é uma prática comum e aceita na sociedade contemporânea e vem acarretando sérios desarranjos à integridade dos indivíduos que fazem uso do tabaco. Entre a variedade de enfermidades causadas pelo tabaco, estão as doenças periodontais.

Vários estudos já evidenciaram a relação entre o cigarro, particularmente a nicotina, e a ocorrência dessas doenças. No entanto, pouco se sabe sobre os efeitos da nicotina, da cotinina e também da cafeína (intimamente relacionada com o hábito de fumar) sobre as bactérias da microbiota oral.

PAVIA *et al.* (2000) em um estudo relacionando a atividade da nicotina sobre o desenvolvimento microbiológico de alguns fungos e bactérias (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus* do grupo *viridans*, *Cryptococcus neoformans*, *Borrelia burgdorferi*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium phlei* e *Candida albicans*) constataram que quantidades entre 100 a 250 µg/mL inibiam cerca de 50% destes microrganismos. Entretanto, nenhum dos microrganismos estudados tem relação direta com a doença periodontal, o que aponta para a necessidade de aprofundamento dos estudos sobre a atividade da nicotina e das outras substâncias sobre as bactérias patogênicas do sulco periodontal.

A atividade *in vitro* da nicotina, cotinina e cafeína sobre os microrganismos que propiciam a formação do biofilme periodontal poderá contribuir para o

entendimento da relação entre as periodontopatias e estas substâncias. Assim, uma vez que estas substâncias estão normalmente presentes na saliva de fumantes, são necessários novos estudos para o conhecimento dos seus efeitos ou sobre sua possível contribuição como substrato para o crescimento dos estreptococos orais.

MATERIAIS E MÉTODOS

Substâncias utilizadas

Foram utilizadas para a avaliação de suas atividades, as seguintes substâncias: nicotina (hidrogeno-tartarato de (-)-nicotina, Sigma[®] Co), cotinina ((-)-cotinina, Sigma[®] Co), cafeína (Sigma[®] Co) e digluconato de clorexidina a 12%. As soluções foram feitas utilizando água (cafeína) ou álcool etílico como solvente (cotinina).

Bactérias utilizadas para o estudo

Foram utilizadas as cepas das bactérias: *Streptococcus oralis* (PB-182), *Streptococcus mitis* (ATCC-903) e *Streptococcus gordonii* (ATCC-10558). As bactérias são rotineiramente mantidas em freezer à -70°C, em caldo infuso cérebro coração (BHI, Difco[®]) contendo solução de glicerol a 40% (v/v).

Procedimento para congelamento de microorganismos

Etapas anteriores ao congelamento do microrganismo:

1. Foi feita uma cultura overnight do microrganismo selecionado;
2. No dia seguinte, verificou-se (se não havia contaminação) na cultura de overnight (Gram e análises microscópicas);
3. Após as análises, iniciou-se o procedimento para congelar o microrganismo.

Congelamento

1. Preparou-se uma solução de glicerol a 40% em meio de cultura BHI caldo a ser congelado, da seguinte forma:

Num tubo de ensaio foi colocado 2,0 mL de glicerol e 3,0 mL do meio de cultura e agitado, produzindo assim a solução de glicerol a 40% . O procedimento foi feito em câmara de fluxo laminar;

2. A solução foi autoclavada por 15 min, a 1 atm e 121^o C;
3. Etiquetou-se os tubos eppendorf a serem congelados com o microrganismo;
4. Foi colocado 0,4mL da mistura de glicerol + meio de cultura em cada tubo eppendorf esterilizado;
5. Adicionou-se 0,4 mL da cultura contendo o microrganismo a ser congelado aos 0,4 mL já pipetados no eppendorf e estes foram agitados;
6. A mistura foi rapidamente congelada;
7. Após 3 dias, um eppendorf qualquer congelado foi semeado em uma placa para verificar o sucesso ou não do isolamento e congelamento.

Procedimento realizado na University of Rochester, laboratório de Modelo de Cárie Animal, do Dr. W. H. Bowen (Prof. Pedro L. Rosalen, 1995).

Curva de crescimento bacteriano

Etapa 1 - Preparação da cultura para curva de crescimento:

1. Reativou-se a bactéria que estava congelada em solução de glicerol a 40%. Colocou-se uma alíquota de 100 µl em 10 mL de caldo infuso-

cérebro coração (BHI). A cultura foi incubada em estufa com 10% CO₂, à 37° C, por volta de 18 h (overnight);

2. No dia seguinte, verificou-se (se não havia contaminação) na cultura (Gram, motilidade);
3. Após verificação da pureza da cultura, a mesma foi preparada para inoculação. O inóculo final continha por volta de 10⁷ Unidades Formadoras de Colônia/ mL (UFC/mL);
4. Para obtenção desse inóculo, preparou-se uma mistura de solução fisiológica (NaCl 0,9%) adicionando uma quantidade igual da cultura overnight. Comparou-se com o padrão MacFarland 5 (ver abaixo). A comparação deve ser visual e espectrofotométrica. Para a comparação espectrofotométrica, os valores de transmitância de ambas devem ser o mesmo, num comprimento de onda de 880 nm;
5. Após a obtenção da suspensão bacteriana contendo aproximadamente 10⁸ UFC/mL, foi feita a diluição em solução fisiológica até obter uma diluição com 10⁷ UFC/mL.

Preparação de solução padrão 0,5 de MacFarland de BaSO₄

1. A preparação foi realizada em capela de fluxo;
2. Preparou-se uma solução de BaCl₂ 0,048M em balão volumétrico. Cobriu-se o balão com papel alumínio para evitar a degradação pela luz do BaCl₂;
3. Preparou-se a solução de H₂SO₄ a 0,36N.
4. Preparou-se o padrão adicionando 0,5 mL de BaCl₂ 0,048M e 99,5 mL H₂SO₄ a 0,36N.

5. Os tubos foram armazenados hermeticamente fechados e conservados a temperatura ambiente, no escuro.

Etapa 2 - Curva de crescimento:

1. Preparou-se quatro tubos de ensaio (quadruplicatas) contendo 9.9 mL de BHI caldo. Inoculou-se 0.1 mL de da diluição contendo 10^7 UFC/mL. Dessa forma, cada tubo continha 10^5 UFC/mL;
2. Foram feitas leituras de absorbância e transmitância desses tubos em espectrofotômetro, num comprimento de onda 880 nm;
3. A cada leitura feita, inoculou-se uma alíquota de 20 μ L da cultura em crescimento em placas de BHI ágar, através de espalhamento com alça de Drigalsky. Foram feitas diluições prévias, quando necessário. Cada diluição foi inoculada em duplicatas. As placas foram incubadas em estufa de CO₂ 10%, à 37° C, por 48 h;
4. Procedeu-se às leituras de absorbância e transmitância e o plaqueamento seguindo um esquema de horários, a partir do momento da incubação:
0 h – 1 h, 3 h - 5 h – 5,5 h – 6 h – 6,5 h – 8 h - 11h – 23 h.

Obs.: Os horários podem ser alterados de acordo com o ritmo de crescimento bacteriano. As leituras e plaqueamento de meia em meia hora foram assim feitas na fase exponencial de crescimento. Dessa forma, essas leituras podem ser modificadas para diferentes horários, desde que coincidam com a fase logarítmica de crescimento.

5. Após 48 h de incubação das placas contendo a bactéria pesquisada, procedeu-se a contagem de colônias, obtendo posteriormente a quantidade de UFC/mL.

Prova de sensibilidade dos microrganismos em estado planctônico por diluição em caldo:

1. Preparou-se a bateria de tubos de ensaio com as substâncias a serem testadas. Todas as concentrações foram feitas em triplicatas;
2. Adicionou-se 7,5 mL de meio de caldo infuso cérebro coração em cada tubo;
3. Tubos teste: Os tubos continham seis concentrações regressivas das substâncias: nicotina, cotinina e cafeína (400, 100, 25, 6.25, 1.5 e 0.39 µg/mL). As concentrações de clorexidina foram: 1, 0.25, 0.0625, 0.0156, 0.0039 e 0.00097%. Os solventes para a preparação da solução-mãe foram: água para a nicotina e cafeína; etanol absoluto para a cotinina.
4. Em três baterias de tubos foram inoculados 75µl da cultura com o microrganismo a ser testado. Os inóculos foram feitos com o microrganismo na fase exponencial. Os tubos continham 10^5 UFC/mL;
5. Controles: Controle positivo de crescimento: sem nenhuma das soluções, porém com o inóculo. Controle negativo: todas as concentrações da substância em teste, porém sem inóculo; Controle negativo/negativo: sem nenhum inóculo ou solução; Controle para veículos: foram acrescidos com o maior volume do solvente da cotinina, no caso 30 µL de etanol absoluto.

6. Estando preparados os tubos, estes foram incubados em estufa de microaerofilia (10% de CO₂), em temperatura constante de 37°C, durante 18 horas;
7. Decorrido este período, os tubos foram submetidos à leitura em espectrofotometria (medidas de absorbância em espectrofotômetro Beckman, modelo DU-65, com $\lambda = 660\text{nm}$, em cubetas descartáveis);
8. Após este procedimento, foram inoculados 50 μL de cada tubo, depois da diluição em soro fisiológico. Os inóculos foram dispersos em placas de Petri contendo meio de cultura BHI-ágar, utilizando a Spiral Plater (Don Withley[®]).
9. As placas foram incubadas em estufa de microaerofilia (10% de CO₂), em temperatura constante de 37°C. Após este período, as placas foram submetidas à contagem manual de colônias, utilizando a técnica de contagem por áreas (para dispersões em placa feitas utilizando a Spiral Plater).

RESULTADOS

Curva de Crescimento Bacteriano

Foi observado o crescimento bacteriano das duas cepas de bactéria em estudo, com o intuito de conhecer o seu tempo de crescimento, visando maior interesse em encontrar o período de tempo em que a bactéria atinge sua fase de crescimento logarítmico e relacionar a densidade óptica da cultura com a quantidade de unidades formadoras de colônia por mL. Conhecendo a curva de crescimento dessas bactérias, os testes de sensibilidade dos microrganismos em estado planctônico por diluição em caldo puderam ser iniciados com o inóculo de culturas que já haviam atingido essa fase.

A curva de crescimento também foi útil para conhecer todas as fases de crescimento e seus respectivos tempos, a fim de poder conduzir os testes dentro do período em que a bactéria se mantém viável.

Seguem-se abaixo as curvas de crescimento, relacionando a densidade óptica (leitura de absorvância - comprimento de onda 880nm) e o logaritmo das unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL).

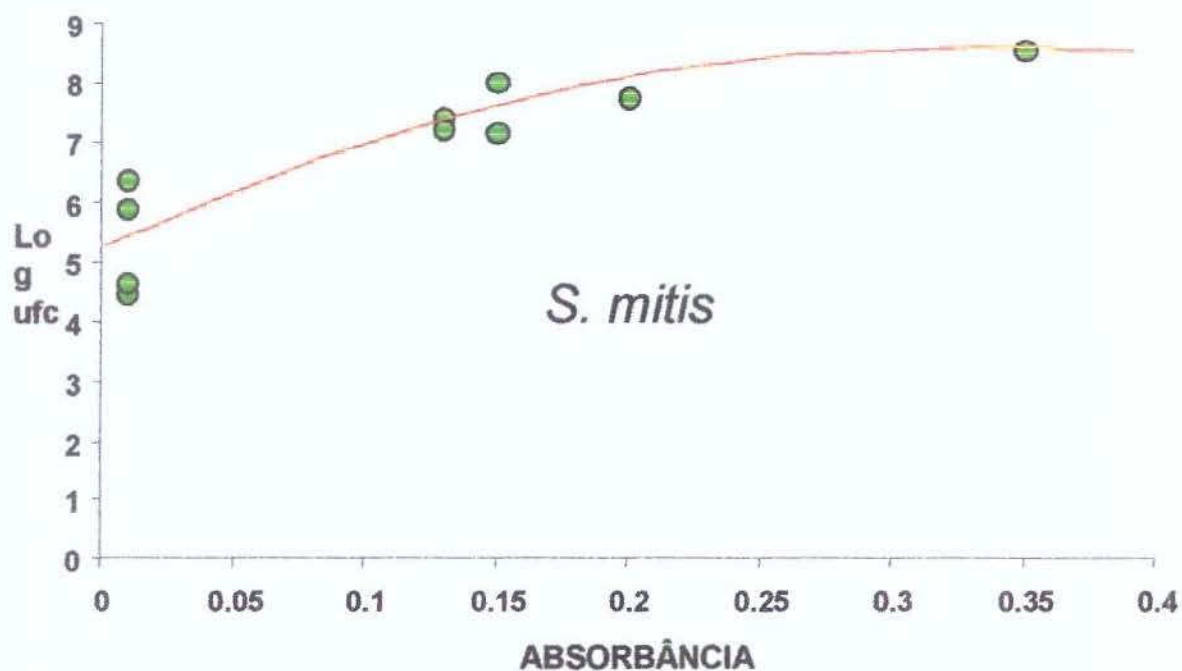


Gráfico 1. Curva de crescimento *Streptococcus mitis*

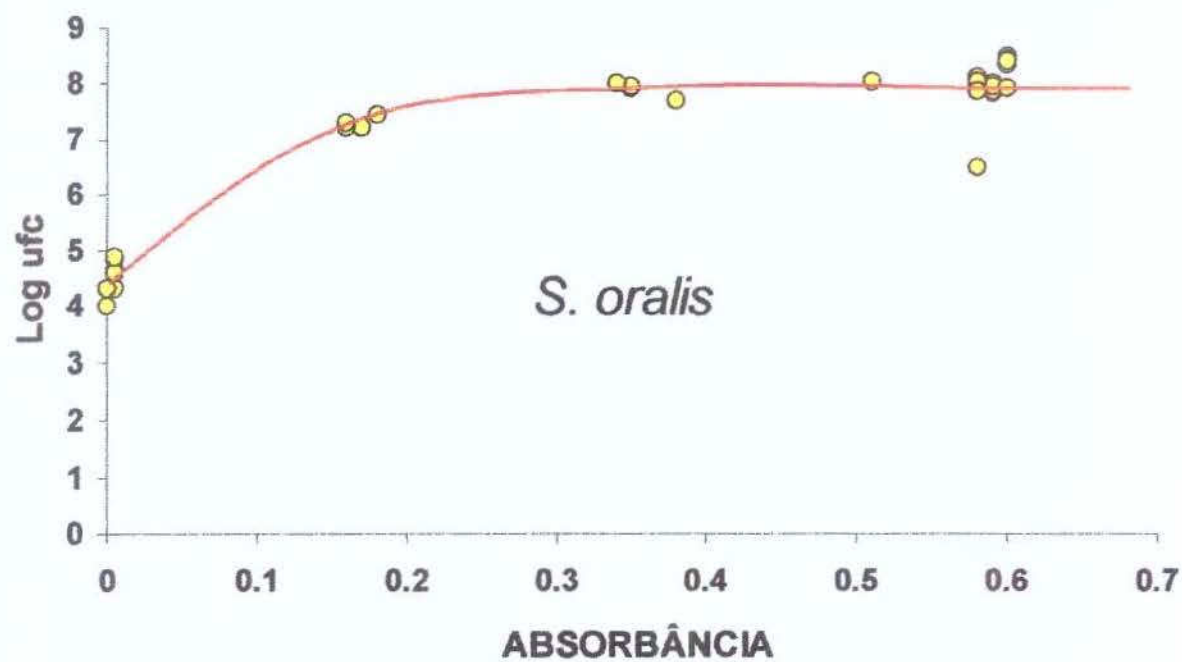


Gráfico 2. Curva de crescimento *Streptococcus oralis*

Analisando os gráficos, observa-se uma boa correlação entre a absorbância e a densidade óptica, que foi importante para encontrar os inóculos iniciais dos experimentos conduzidos. Esses resultados ajudaram também a relacionar a densidade óptica das culturas testadas e a diluição em soro fisiológico a ser feita para dispersão em placas com BHI-ágar nos testes de sensibilidade bacteriana, a fim de tomar contável o número de colônias na placa.

Foi verificada uma excelente correlação ($R^2 > 0.9$) entre os valores de absorbância e de número de ufc/mL, o que permitiu que os dados proporcionados por essas curvas de crescimento fossem utilizados com grande sucesso nos experimentos de Sensibilidade bacteriana em estado planctônico.

Prova de sensibilidade dos microrganismos em estado planctônico por diluição em caldo

Os resultados a seguir relacionam absorbância e o logaritmo das unidades formadoras de colônia (log ufc/mL) das culturas de bactérias que foram expostas às substâncias-teste (cafeína, cotinina e nicotina) durante um período de 18 horas. O crescimento bacteriano também foi avaliado na presença da clorexidina. Os gráficos mostram as médias dos valores de absorbância e do logaritmo das unidades formadoras de colônia e os valores de desvio padrão.

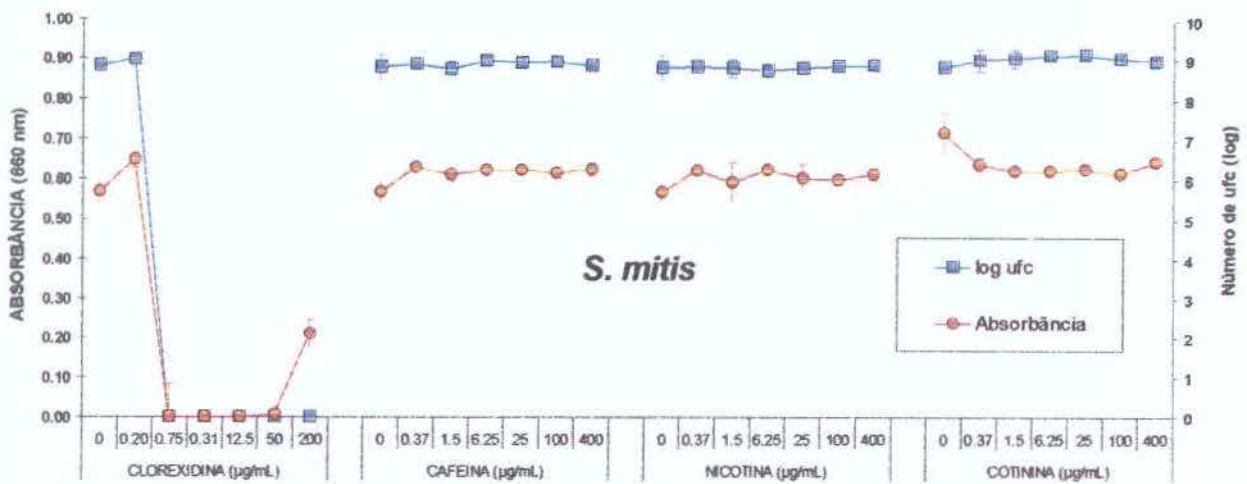


Gráfico 3. Crescimento bacteriano (*Streptococcus mitis*) após 18 horas de exposição às substâncias teste. Os valores de concentração iguais a zero referem-se ao controle positivo de crescimento.

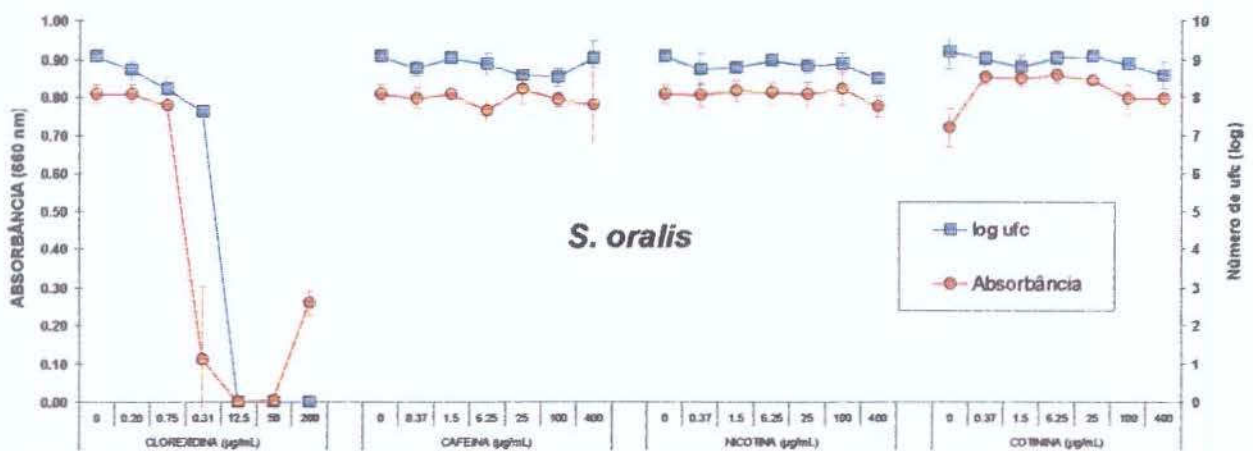


Gráfico 4. Crescimento bacteriano (*Streptococcus oralis*) após 18 horas de exposição às substâncias teste. Os valores de concentração iguais a zero referem-se ao controle positivo de crescimento

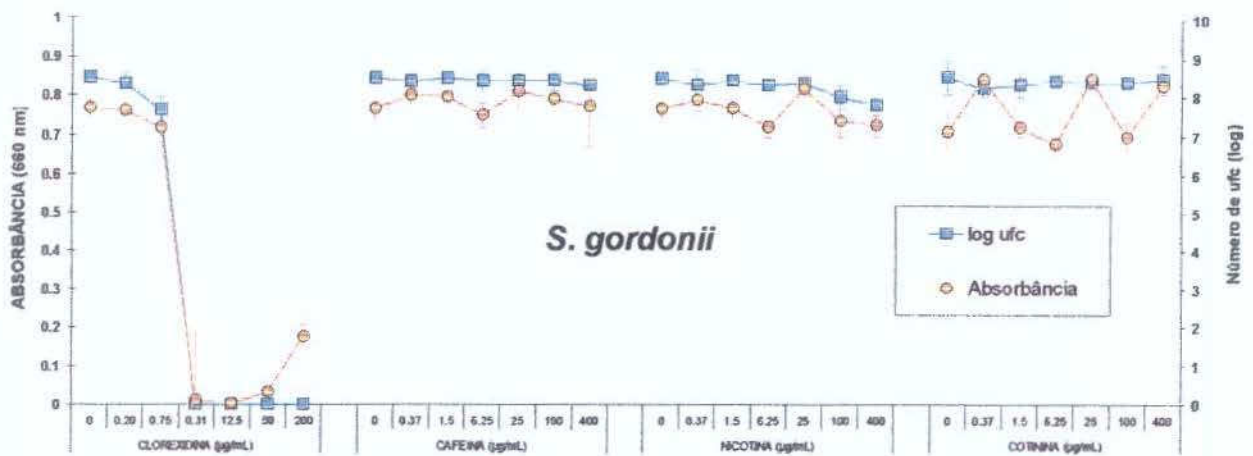


Gráfico 4. Crescimento bacteriano (*Streptococcus oralis*) após 18 horas de exposição às substâncias teste. Os valores de concentração iguais a zero referem-se ao controle positivo de crescimento.

A partir dos dados dos gráficos, é possível notar que não houve diferença significativa no crescimento bacteriano entre os diferentes grupos (cafeína, nicotina e cotinina). Em comparação com os controles positivos de crescimento, ou seja, a bactéria na ausência das substâncias testadas, também não houve diferenças. Dessa forma, pode-se concluir que as substâncias teste não interferem no crescimento bacteriano das espécies *S. oralis*, *S. mitis* e *S. gordonii* de maneira significativa.

Em relação ao controle clorexidina, observa-se que nas concentrações 0,20 µg/mL e 0,75 µg/mL para *S. oralis*, 0,195 µg/mL para *S. mitis* e 0,20 µg/mL e 0,75 µg/mL para *S. gordonii* houve um crescimento bacteriano, havendo inibição do crescimento em concentrações superiores, o que indica que a metodologia usada para o desenvolvimento do experimento é adequada.

Quanto aos controles, houve um bom crescimento nos controles positivos (meio de cultura + bactéria; meio de cultura + 30 µL de etanol + bactéria), este

último indicando que a quantidade de etanol utilizada para diluir a cotinina não teve alguma atividade inibitória, ou seja, não interferiu nos resultados. Os controles negativos mostraram-se sem contaminações (meio de cultura; meio de cultura + etanol; meio de cultura + substâncias testadas).

DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo sugerem que o crescimento bacteriano das espécies *S. oralis*, *S. mitis* e *S. gordonii* não é modificado na presença de cotinina, nicotina e cafeína. No entanto, esse foi um estudo *in vitro*, onde as cepas testadas tiveram todas as condições ótimas de nutrientes, temperatura e ambiente (microaerófilia) para o seu crescimento. Provavelmente, *in vivo*, onde estas bactérias se encontram formando o biofilme periodontal, no qual as condições de crescimento não são tão favoráveis, essas substâncias possam interferir com o crescimento.

Não foram encontrados na literatura estudos *in vivo* ou *in vitro* que relacionassem a nicotina, cotinina e cafeína com o crescimento de estreptococos orais. Um único relato na literatura relacionando a nicotina e sua atividade antimicrobiana foi descrito por PAVIA *et al.* (2000). Neste estudo, concentrações de nicotina de 100 e 250 µg/mL inibiram o crescimento em 50% de várias espécies bacterianas entre elas estreptococos do grupo *viridans*. Porém, os autores não citam quais espécies de estreptococos foram testadas. Embora o *S. gordonii* faça parte desse grupo, a espécie difere marcadamente de outros estreptococos do mesmo grupo. Na realidade, muitos dos estreptococos do grupo *viridans* têm como única característica comum a capacidade de hemolisar parcialmente o sangue.

A clorexidina vem sendo utilizada para o controle da formação da microbiota dental há muito tempo (LANG & BRECX 1986). Além disso, é também

utilizada para causar alteração na composição bacteriana supra-gengival, produzindo significativa redução na proporção de estreptococos, particularmente dos *S. mutans* (EMILSON 1981).

Os resultados obtidos com o uso da clorexidina demonstraram inibição do crescimento bacteriano de forma concentração-dependente, como já observado previamente por LANG & BRECX, 1986; GROppo *et al.*, 2002; HERRERA *et al.*, 2003.

As concentrações de clorexidina que promoveram a inibição do crescimento bacteriano (CIM) foram diferentes entre as três espécies. O *S. gordonii* (0,31 µg/mL) foi o mais sensível ao efeito da clorexidina, seguido do *S. mitis* (0,75µg/mL) e do *S. oralis* (12,5 µg/mL). A sensibilidade dessas espécies bacterianas à clorexidina já foi demonstrada em outros estudos.

Num estudo *in vivo* conduzido por D'ARCANGELO *et al.* (1999), o digluconato clorexidina a 0,12% foi bactericida para o *S. mitis*, num tempo de exposição à substância de 10 minutos. Em outro estudo *in vitro*, onde o *S. mitis* foi exposto à clorexidina por 1 minuto, não foi observado inibição do crescimento estatisticamente significativa.

Outros trabalhos também demonstram que a coagregação bacteriana também pode ser alterada na presença de clorexidina (LEE, 2001). A coagregação entre *P.gingivalis* (ATCC-381) e *S. oralis* (ATCC-9811) ou *S. gordonii* (DL-1) foi prejudicada em concentrações de clorexidina de 0,02%, quando expostas a essa substância por 1 hora. Esse achado é muito importante, já que a coagregação é uma etapa crucial para a formação do biofilme. No entanto, não foi mencionado se

houve inibição do crescimento dessas bactérias. Porém, foi relatado que, na concentração de 0,02% a clorexidina não foi bactericida para as espécies de estreptococos, o que contradiz o achado do nosso estudo. Em nossos experimentos, a maior concentração de clorexidina testada (0,02%) promoveu a morte de todas as bactérias estudadas, mostrando um forte efeito bactericida. Essa diferença de resultados pode ser explicada pelo tempo de exposição à clorexidina, que em nosso trabalho foi de 18 horas, enquanto no estudo de LEE (2001) foi de apenas 1 hora.

CONCLUSÃO

Pode-se concluir que, à exceção da clorexidina, a nicotina, cotinina e cafeína não afetam o crescimento de alguns estreptococos orais (*S. oralis*, *S. mitis* e *S. gordonii*).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alpagot T., Wolff L.F., Smith Q.T., Tran S. D. Risk indicators for periodontal disease in a racially diverse urban population. **J Clin Periodontol.** 1996; 23: 982–988.
2. Armitage A. K., Turner D. M. Absorption of nicotine in cigarette and cigar smoke through the oral mucosa. **Nature.** 1970; 266: 1231–1232.
3. Axelsson P., Paulander, J., Lindhe, J. Relationship between smoking and disease status in 35-, 50-, 65-, and 75- year old individuals. **J Clin Periodontol.** 1998; 25: 297–305.
4. Beck J.D., Cusmano L., Green-Helms W., Koch G.G., Offenbacher, S. A 5-year study of attachment loss in community-dwelling older adults: incidence density. **J Periodont Res.** 1997; 32: 506–515.
5. Beighton D., Decker J and Homer KA. Effects of chlorhexidine on proteolytic and glycosidic enzyme activities of dental plaque bacteria. **J Clin Periodontol** 1991;18:85-89
6. Benatti B.B., Nogueira-Filho G.R., Diniz M.C., Sallum E.A., Sallum A.W., Nociti JR F.H. Stress may enhance nicotine effects on periodontal tissues. An in vivo study in rats. **J Periodont Res.** 2003; 38: 351–353
7. Bergstrom J. Cigarette smoking as a risk factor in chronic periodontal disease. **Com m Dent and Oral Epidemiology** 1989; 17, 245–247.
8. Bergstrom J., Bostron L. Tobacco smoking and periodontal hemorrhagic responsiveness. **J Clin Periodontol.** 2001; 28: 680–685.

9. Bergstrom J., Eliasson, S. Cigarette smoking and alveolar bone height in subjects with a high standard of oral hygiene. **J Clin Periodontol.** 1987; 14: 466– 469.
10. Bergstrom J., Preber H. Tobacco use as a risk factor. **J Periodontol.** 1994; 65: 545–550.
11. Brown L.F., Beck J.D., Rozier R.G. Incidence of attachment loss in community-dwelling older adults. **J Periodontol.** 1994; 65: 316–323.
12. Brown, C. R. & Benowitz, N. L. Caffeine and cigarette smoking: behavioral, cardiovascular, and metabolic interactions. **Pharm Biochem Behav.** 1989; 34: 565–570.
13. Calsina G, Ramon J.M, Echeverria J.J. Effects of smoking on periodontal tissues. **J Clin Periodontol.** 2002; 29: 771–776
14. Ceppa F., El Jahiri Y., Mayaudon H., Dupuy O., Burnat P. High-performance liquid chromatographic determination of cotinine in urine in isocratic mode. **Journal of Chromatography B.** 2000; 746: 115-122.
15. Chang Y.C., Huang F.M., Tai K.W., Yang L.C., Chou M.Y. Mechanisms of cytotoxicity of nicotine in human periodontal ligament fibroblast cultures in vitro. **J Periodontal Res.** 2002; 37(4):279-85.
16. Chang Y. C., Hsieh Y. S., Lii C. K., Huang F. M., Tai K. W., Chou M. Y. Induction of c-fos expression by nicotine in human periodontal ligament fibroblasts is related to cellular thiol levels. **J Periodontal Res.** 2003a; 38(1):44-50.
17. Chang Y.C., Tsai C.H., Yang S.H., Liu C.M., Chou M.Y. Induction of cyclooxygenase-2 mRNA and protein expression in human gingival

- fibroblasts stimulated with nicotine. **J Periodontal Res.** 2003b; 38(5):496-501.
18. D'Arcangelo C, Varvara G, De Fazio P. An evaluation of the action of different root canal irrigants on facultative aerobic-anaerobic, obligate anaerobic, and microaerophilic bacteria. **J Endod.** 1999;25(5):351-3.
 19. Decker E. M., Weiger R., Von Ohle C., Wiech I., Brex M. Susceptibility of planktonic versus attached *Streptococcus sanguinis* cells to chlorhexidine. **Clin Oral Invest.** 2003; 7:(2) 98-102.
 20. Dolan T.A., Gilbert G.H., Ringelberg M.L., Legler D.W., Antonson D.E., Foerster, U., Heft M.W. Behavioral risk indicators of attachment loss in adult Floridians. **J Clin Periodontol.** 1997; 24: 223–232.
 21. Dussor G.O., Leong A.S., Gracia N. ., Kilo S., Price T.J., Hargreaves K.M., Flores C.M. Potentiation of evoked calcitonin gene-related peptide release from oral mucosa: a potential basis for the pro-inflammatory effects of nicotine. **Eur J Neurosci.** 2003; 18 (9):2515-26 .
 22. Elter J. ., Beck J.D., Slade G.D., Offenbacher, S. Etiologic models for incident periodontal attachment loss in older adults. **J Clin Periodontol.** 1999; 26:113–123.
 23. Eramo S., Tassi C., Negri P., Manta M., Fraschini M., Pedetta F. Elisa analysis of salivary cotinine in smokers. **Minerva Stomatol.** 2000; 49(4):163-8.
 24. Gamal A.Y., Bayomy M.M. Effect of cigarette smoking on human PDL fibroblasts attachment to periodontally involved root surfaces in vitro. **J Clin Periodontol.** 2002; 29: 763–770.

25. Ghosheh O.A., Browne D., Rogers T., Leon J., Dwoskin L. P., Crooks P. A. A simple high performance liquid chromatographic method for the quantification of total cotinine, total 3%-hydroxycotinine and caffeine the plasma of smokers. **J Pharm Biomed Anal.** 2000; 23: 543–549.
26. Giannopoulou C., Cappuyns I., Mombelli A. Effect of smoking on gingival crevicular fluid cytokine profile during experimental gingivitis. **J Clin Periodontol.** 2003; 30: 996–1002.
27. Groppo FC, Ramacciato JC, Simoes RP, Florio FM, Sartoratto A. Antimicrobial activity of garlic, tea tree oil, and chlorhexidine against oral microorganisms. **Int Dent J.** 2002;52(6):433-7.
28. Grossi S. G., Genco R.J., Machtei E.E., Ho A.W., Koch G., Dunford R. G., Zambon J. J., Ausmann, E. Assessment of risk for periodontal disease (II). Indicators for alveolar bone loss. **J Periodontol.** 1995; 66: 23–29.
29. Grossi S.G., Zambon J.J., Ho A.W., Koch G., Dunford R.G., Machtei E.E., NORDERYD O.M., GENCO R.J. Assessment of risk for periodontal disease (I). Indicators for attachment loss. **J Periodontol.** 1994; 65: 260–267.
30. Gunsolley J. C., Quinn S.M., Tew J., Gooss C.M., Brooks C.N., Schenkein H.A. The effect of smoking on individuals with minimal periodontal destruction. **J Periodontol.** 1998; 69: 165– 170.
31. Haber J., Wattles J., Crowley M., Mandell R., Joshipura K., Kent R. L. Evidence for cigarette smoking as a major risk factor for periodontitis. **J Periodontol.** 1993; 64: 16–23.
32. Haffajee A. D., Socransky S.S. Relationship of cigarette smoking to attachment level profiles. **J Clin Periodontol.** 2001; 28:377–388.

33. Hagan R.L., Ramos Jr J.M., Jacob M.M. Increasing urinary cotinine concentrations at elevated temperatures: the role of conjugated metabolites. **J Pharm Biomed Anal.** 1996; 16:191-197.
34. Henemyre C. L., Scales D. K., Hokett S. D., Cuenin M. F., Peacock M. E., Parker M. H., Brewer P. D. , Chuang A. H. Nicotine stimulates osteoclast resorption in a porcine marrow cell model. **J Periodontol.** 2003, 74(10):1440-6.
35. Herrera D, Roldan S, Santacruz I, Santos S, Masdevall M, Sanz. Differences in antimicrobial activity of four commercial 0.12% chlorhexidine mouthrinse formulations: an in vitro contact test and salivary bacterial counts study. **J Clin Periodontol.** 2003;30(4):307-14.
36. Hildebolt C.F., Pilgram T.K., Dotson M., Yokoyama-Crothers N., Muckerman J., Hauser J., Cohen S., Kardaris E., Vannier M.W., Hanes P., Shrout M.K., Civitelli, R. Attachment loss with postmenopausal, age and smoking. **J Periodontal Res** 1997 32, 619–624.
37. Johnson G. K., Hill M. (2004) Cigarette smoking and the periodontal patient. **J Periodontol** 75 (2):196-209.
38. Kalow W., Tang B. K. Caffeine as a metabolic probe: exploration of the enzyme-inducing effect of cigarette smoking. **Clin Pharm Therap.** 1991; 49(1): 44-8.
39. Kinane D. F., Chestnutt I. G. Smoking and periodontal disease. **Crit Rev Oral Biol Med.** 2000; 11(3):356-65.
40. Koneman E.W. et al. **Introduction to diagnostic microbiology.** 1.ed. Philadelphia: J.B. Lippincott Company, 1994.

41. Lahmouzi J., Simain-Sato F., Defresne M.P., De Pauw M.C., Heinen E., Grisar T., Legros J.J., Legrand R. Effect of nicotine on rat gingival fibroblasts in vitro. **Connect Tissue Res.** 2000; 41(1):69-80.
42. Leonardi R., Lanteri E., Stivala F., Caltabiano M., Fenga C., Travali S. Alteration in alpha 2 integrin immunocytochemical expression on cultured human gingival fibroblasts following nicotine exposure. **Minerva Stomatol.** 1999; 48(11):495-9.
43. Macgregor I. D. M. **Smoking and periodontal disease from:** Drugs, diseases, and the periodontium, eds. R. A. Seymour & P. A. Heasman. Oxford University Press, Oxford, 1994.
44. Machtei E. E. Hausmann E., Dunford R., Grossi S., Ho A., Davis G. Chandler J., Zambon J. J., Genco R. J. Longitudinal study of predictive factors (1997) Longitudinal study of prognostic factor of established periodontitis patients. **J Clin Periodontol.** 1999; 24: 102–109.
45. Machtei E.E., Hausmann E., Dunford R., Grossi S., Ho A., Davis G., Chandler J., Zambon J. J., Genco R. J. Longitudinal study of predictive factors for periodontal disease and tooth loss. **J Clin Periodontol.** 1999; 26: 374–380.
46. Mager D. L., Haffajee A. D., Socransky S. S. The effects of periodontitis and smoking on the microbiota of oral mucous membranes and saliva in systemically healthy subjects. **J Clin Periodontol.** 2003; 30, 1031–1037.
47. Marsh P. D., Martin M. **Oral microbiology.** 1992 . 3.ed. London, Chaoman & Hall.

48. Mariggio M.A., Guida L., Laforgia A., Santacroce R., Curci E., Montemurro P., Fumarulo R. Nicotine effects on polymorphonuclear cell apoptosis and lipopolysaccharide-induced monocyte functions. A possible role in periodontal disease? **J Periodontal Res.** 2001; 36(1):32-9.
49. Mavropoulos A., Aars H., Brodin P. Hyperaemic response to cigarette smoking in healthy gingiva. **J Clin Periodontol.** 2003; 30: 214–221.
50. Michael J. Pabst, Karen M. Pabst, John A. Collier, Thomas C. Coleman, Marny L. Lemons-Prince, Mitchel S. Godat, Margaret B. Waring, and Jegdish P. Badu. Inhibition of neutrophil and monocyte defensive functions by nicotine. **J Periodontol.** 1995; 66: 1047-1055.
51. Mirbod S. M., Ahing S. I. (2000) Tobacco-associated lesions of the oral cavity: Part I. Non malignant lesions. **Journal of Canadian Dental Association.** 66 (5):252-6.
52. Moore P.A., Weyant R.J., Mongelluzzo M.B., Myers D.E., Rossie K., Guggenheimer J., Block H.M., Huber H., Orchard T. Type I diabetes mellitus and oral health: assessment of periodontal disease. **J Periodontol.** 1999; 70: 409–417.
53. Mullally B.H., Linden G.J. Molar furcation involvement associated with cigarette smoking in periodontal referrals. **J Clin Periodontol.** 1996; 23: 658– 661.
54. Norderyd, O., Hugoson, A. Risk of severe periodontal disease in a Swedish adult population. A cross-sectional study. **J Clin Periodontol.** 1998; 28:1022–1028.

55. Obeid P., Bercy P. Effects of smoking on periodontal health: a review. **Adv Ther.** 2000 17(5):230-7.
56. Ooshima T., Matsumura M., Hoshino T., Kawabata S., Sobue S., Fujiwara T. Contributions of three glycosyltransferases to sucrose-dependent adherence of *Streptococcus mutans*. **J Dent Res.** 2001; 80:1672–1677.
57. Pabst M.J., Pabst K.M., Collier J.A. et al. Inhibition of neutrophil and monocyte defensive functions by nicotine. **J Periodontol** .1995; 66:1047-1055.
58. Payne J.B., Johnson G.K., Reinhardt R.A., Dyer J.K., Maze C.A., Dunning D.G. Nicotine effects on PGE2 and IL-1b release by LPS-treated human monocytes. **J Periodont Res.** 1996; 31:99-104.
59. Persson R.E., Hollender L.G., Persson G.R. Assessment of alveolar bone levels from intraoral radiographs in subjects between 15 and 94 years seeking dental care. **J Clin Periodontol.** 1998; 25:647–654.
60. Persson R. E. Alveolar bone levels in AIDS and HIV seropositive patients and in control subjects. **J Periodontol.** 1998b; 69:1056–1061.
61. Preber H., Bergstrom, J. Cigarette smoking in patients referred for periodontal treatment. **Scandinavian J Dent Res.**1986; 94: 102–108.
62. Read R.C. Systemic effects of smoking. **Am. J. Surg.** 1984;148:706-711.
63. Roberts S.K., Wei G.X.; Wu C.D. Evaluating biofilm growth of two oral pathogens. **Appl. Mibrob.** 2002;35: 552-556.
64. Ryder MI, Saghizadeh M, Ding Y, Nguyen N, Soskolne A. Effects of tobacco smoke on the secretion of interleukin-1b, tumor necrosis factor-a, and

- transforming growth factor- β from peripheral blood mononuclear cells. **Oral Microbiol Immunol** 2002; 17: 331–336. C Blackwell Munksgaard, 2002.
65. Schenkein H.A. Gunsolley J.C., Koertge T.E., Schenkein J.G., Tew J. Smoking and its effects on early-onset periodontitis. **Journal of the American Dental Association**. 1995; 126:1107–1113.
66. Si Young Lee. Effects of chlorhexidine digluconate and hydrogen peroxide on *Porphyromonas gingivalis* hemin binding and coaggregation with oral streptococci. **J Oral Sci**. 2001; 43: 1-7.
67. Socransky S.G., Haffajee A. D. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. **Periodontol**. 2002; 28:12–55.
68. Swanson J.A., Lee, J.W. Hopp J. W. Caffeine and nicotine: a review of their joint use and possible interactive effects in tobacco withdrawal. **Addict Behavior**. 1994; 19(3): 229-56.
69. Tonetti M.S. (1998) Cigarette smoking and periodontal disease: etiology and management of disease. **Annals of Periodontology**. 1994. 3:88–101.