



POTENCIAL DE CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS CARIOGÊNICAS EM DIFERENTES TIPOS DE LEITE

Theresa Cristina Cawahisa¹; Cristiane Faccio Gomes²; Cristiane Maria Montanari Figueira³; Maria Paula Jacobucci Botelho⁴

RESUMO: O alimento básico nos primeiros anos de vida é o leite, porém há necessidade de realização de novos estudos pela falta de consenso sobre o potencial cariogênico deste alimento. Neste trabalho serão testados como meio de cultura para duas espécies bacterianas implicadas na instalação e desenvolvimento da cárie (*Streptococcus mutans* e *Lactobacillus casei*), cinco tipos de leite (humano, bovino, caprino, de soja e formulação para recém nascidos). A primeira etapa deste estudo foi a verificação da atividade antimicrobiana através do teste de difusão em agar, para posterior verificação dos halos de inibição promovidos por cada um dos leites. A segunda fase do trabalho, também "in vitro", se constituiu na cultura de biofilme de *Streptococcus mutans* em cada um dos tipos de leite estudados. Nenhum dos cinco tipos de leite foi capaz de inibir o crescimento das espécies bacterianas. A realização da cultura de biofilme de *S. mutans* em membranas não foi possível devido ao período de tempo testado (48 horas). A segunda etapa do estudo está sendo refeita para permitir avaliar o potencial de formação de biofilme por *S. mutans* quando tem como substrato cada um dos cinco tipos de leite.

PALAVRAS-CHAVE: Cárie dentária; Leite; Prevenção de doenças; Substitutos do leite humano; Suscetibilidade à cárie dentária.

ABSTRACT: The staple food in early life is milk, but there is need for further studies by the lack of consensus on the cariogenic potential of this food. This work is tested as culture media for two bacterial species involved in the development and installation of dental caries (*Streptococcus mutans* and *Lactobacillus casei*), five types of milk (human, cattle, goat, and soy formulation for neonates). The first step of this study was to verify the antimicrobial activity by agar diffusion test, for subsequent verification of the zones of inhibition promoted by each of the milks. The second stage of labor, also "in vitro" was formed in the culture of *Streptococcus mutans* biofilm at each of the studied types of milk. None of the five types of milk was able to inhibit the growth of bacterial species. The realization of culture biofilm *S. mutans* membrane was not possible due to the time period tested (48 hours). The second stage of the study is being redone to allow assessment of the potential for biofilm formation by *S. mutans* as a substrate is when each of the five types of milk.

KEYWORDS: Dental caries; milk; disease prevention; human milk substitutes; Susceptibility to dental caries.

1. INTRODUÇÃO:

O alimento básico de uma criança, nos primeiros anos de vida, é o leite. O leite é formado por proteínas, gorduras, lactose, minerais e outros constituintes como ferro, iodo, cálcio e enzimas, que são necessários para a formação biológica e fisiológica do

Curso de Odontologia/Mestrado em Saúde/Centro Universitário de Maringá – Unicesumar
tetê_kwa@hotmail.com; fono.crisgomes@hotmail.com; cristianefigueira@yahoo.com.br; paulajacobucci@hotmail.com

organismo humano. Na espécie humana, são usados vários leites, além daquele que lhe é próprio, tais como o leite de vaca, de cabra, de soja, entre outros. Dentre seus diversos componentes, encontramos a lactose, que é um dissacarídeo que se desdobra em glicose e galactose (PRESTES, 2001).

A cárie dentária é uma doença infecto contagiosa e multifatorial que necessita de um substrato cariogênico para seu desenvolvimento, oriundo dos carboidratos presentes na dieta, os quais são utilizados pelas bactérias presentes na cavidade bucal para seu metabolismo, e cuja fermentação resulta como catabólito a produção do ácido lático que desmineraliza o tecido duro do dente no local em que a placa bacteriana se adere ao esmalte (KRASSE, 1998; RIBEIRO, 2004; PRESTES, 2001). Fatores do hospedeiro, tais como a capacidade tampão salivar, também são importantes no processo, por aumentar ou reduzir o tempo pelo qual o pH bucal fica reduzido após a alimentação, estimulando ou retardando a produção das lesões de desmineralização.

Existe um grupo limitado de microrganismos encontrados na cavidade bucal, que são capazes de se aderir aos dentes, tendo destaque os estreptococos do grupo mutans, tendo interesse particular no desenvolvimento da cárie a espécie *Streptococcus mutans*. Os estreptococos do grupo mutans, segundo Krasse, estão associados com a fase inicial da cárie e os *Lactobacillus*, com pouca capacidade de adesão à estrutura dentária, estão relacionados com o desenvolvimento posterior da doença (KRASSE, 1998). As colonizações por bactérias deste grupo, como os *S. mitis* e o *S. salivarius* ocorrem por volta do primeiro ou segundo ano de vida, enquanto que a colonização pelo *S. mutans* ocorre por volta do terceiro e quarto anos de vida (SOUZA, 2001). O *Streptococcus sanguis* participa também da colonização inicial, porém, não é uma cepa considerada significativamente cariogênica para os humanos (TARDIF, 1989). A cárie começa com a infecção primária pelos estreptococos, seguida pelo acúmulo destes dentro do biofilme em concentrações patogênicas, secundária à exposição frequente e prolongada a uma dieta cariogênica. Por fim, a fermentação de açúcares pelos estreptococos no interior da placa dentária causa a desmineralização do esmalte, resultando na cavitação das estruturas dentárias (RIBEIRO, 2004).

Prabhakar et al. (2010) afirmam que o leite humano pode causar cárie na infância se for consumido com frequência e por um tempo prolongado sem a devida higienização posterior. A utilização de açúcar no leite bovino é comum para deixá-lo palatável às crianças, o que aumenta mais ainda a suscetibilidade da cavidade bucal do hospedeiro, quanto à fermentação e produção de ácido por microrganismos.

Em uma revisão de literatura, Duarte (2000) evidencia que o leite bovino possui propriedades físicas similares à saliva que poderiam, segundo alguns autores, torná-lo um bom substituto salivar. Uma vez que leite comum ou com baixo teor de lactose tem um insignificante potencial cariogênico, poderiam ser recomendados para aliviar o desconforto de pacientes que sofrem de hipossalivação sem que estes corram riscos de desenvolver cárie. Para os leites formulados, os estudos são bem escassos, porém sugerem que este tipo de alimento seja bastante cariogênico pela composição de seu conteúdo (DUARTE, 2000).

Considerando o alto consumo e os relatos clínicos nos quais é sugerida a participação do leite no desenvolvimento da cárie, Prestes (2003) avaliou o efeito *in vitro* de três tipos de leite *in natura*: materno, de vaca e de cabra sobre o metabolismo da placa dentária humana, com relação à capacidade de fermentação e síntese de polissacarídeos extracelulares de um *pool* de placa bacteriana colhida de 50 crianças e adolescentes, concluindo que os leites testados produziram a fermentação e a síntese de polissacarídeos extracelulares, sendo que o leite de cabra apresentou a menor

fermentação, seguido pelo bovino e pelo materno. Para a síntese de polissacarídeos, o maior resultado foi obtido pelo leite de cabra e pelo leite materno.

Ribeiro (2005) relata que a “cárie precoce na infância é um termo utilizado para determinar o acometimento da lesão cariiosa em crianças.”. A alimentação inadequada nos primeiros anos de vida é responsável pelo início da cárie ainda durante a formação da dentição decídua e que tende a prevalecer e aumentar com a idade (RODRIGUES, 1996). Isso acontece porque o padrão de alimentação da população tem mudado com o aumento do uso de carboidratos. Assim, sabe-se que a ingestão frequente dos açúcares como a sacarose, a glicose e a frutose estão relacionadas com o desenvolvimento da cárie (RIBEIRO, 2004; LOSSO, 2009).

Além do desenvolvimento bacteriano por processo de fermentação de açúcares, leva-se em consideração a formação da doença por contaminação. Como a cárie é uma doença infecciosa, existem microrganismos na cavidade bucal que são cariogênicos, podendo ser transmitidos pela saliva. A relação mãe e filho, que favorece um íntimo contato pelo beijo, por assoprar o alimento quente produzindo gotículas salivares, pelo uso compartilhado de talheres e copos, pode aumentar o risco de cárie para o filho, dependendo dos níveis de contaminação bacteriana na saliva da mãe (RODRIGUES, 1996).

A odontologia preconiza o atendimento aos bebês, para determinar precocemente medidas educativas e preventivas. É importante o estímulo do aleitamento materno, o desestímulo à adição de açúcar no leite, sucos e chás e, mesmo antes da erupção dentária, deve-se iniciar procedimentos de higienização da cavidade bucal do recém-nascido, utilizando uma gaze úmida (RODRIGUES, 1996).

2. DESENVOLVIMENTO:

O Projeto foi submetido à aprovação pelo Comitê de Ética do Cesumar e recebeu aprovação sob o número 20384413.7.0000.5539.

A primeira etapa deste estudo foi a verificação da atividade antimicrobiana através do teste de difusão em ágar. Para tanto, foram utilizadas cepas padrão de *Streptococcus mutans* (Fundação André Tosello ATCC 25175) e *Lactobacillus casei* (Cefar CCCD LL001 – LT BF J 983), que foram cultivadas e ativadas em meio “Brain Heart Infusion” (B.H.I. - ágar) - (Difco-Detroit- Michigan) com as referidas bactérias incubadas em caldo a 37°C por 48 horas em condições de anaerobiose.

As cepas de *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus casei* foram semeadas nas placas com meio *Agar mitis salivarius* com bacitracina, telurito de potássio e sacarose e meio rogosa, respectivamente, com o auxílio de *swabs* estéreis por esgotamento. Logo a seguir, discos de antibiograma estéreis, cada um com 6 milímetros de diâmetro, foram embebidos com as soluções teste e dispostos de modo equidistante nas placas com os meios de cultura para posterior verificação dos halos de inibição promovidos por cada solução-teste em milímetros. Foram necessários 0,25 µL de solução para saturar cada disco (Figura 1).



Figura 1: Placas semeadas com *Streptococcus mutans* (esquerda) em meio mitis salivarius e placas semeadas com *Lactobacillus casei* (direita), com discos saturados nos cinco tipos de leite.

Após todo esse processo, fez-se necessário que se promovesse condições de anaerobiose para o crescimento bacteriano em toda a placa semeada. Tal anaerobiose foi realizada através de jarras de Gaspak a 37°C por 48 horas para posterior verificação dos halos de inibição em milímetros. Com objetivo de reduzir a variabilidade e conseguir resultados precisos, o experimento foi feito em triplicata para cada microrganismo.

A segunda fase do trabalho, também “*in vitro*”, foi da seguinte maneira: as mesmas soluções teste da etapa anterior foram confeccionadas e numeradas de 1 a 5 como na etapa anterior. Porém foram utilizados apenas os *Streptococcus mutans*, já que os *Lactobacillus casei* não têm a capacidade de adesão para a formação inicial de biofilme. Os *Streptococcus mutans* foram utilizados para testar a ação dos diversos tipos de leites (leite materno, leite de vaca, leite de cabra, leite de soja e formulação para recém nascido) na formação de biofilme bacteriano. Estes biofilmes foram produzidos em membranas de filtro de nitrato de celulose de 13 milímetros de diâmetro com 0,22 micrômetros de diâmetro do poro (Milipore Corp., New York- NY). Os discos foram colocados em imersão em meio BHI, sendo realizados em triplicata com respectivos discos controle. Os discos-teste foram imersos nos diversos tipos de leites durante 10 minutos a cada 3 horas, com intervalo noturno. Após 48 horas, os discos-teste e os discos-controle foram transferidos para um recipiente contendo 10 mL de cada solução teste e 10 mL do meio BHI, respectivamente (Figura 2).



Figura 2: Membrana mergulhada na solução controle (BHI), e no meio BHI com *S. mutans* (esquerda). Membrana mergulhada, na solução controle (BHI), e na solução teste (direita)

A partir daí, foram transferidos cada um para um recipiente contendo 10 ml de solução salina estéril e homogeneizado em vibrador “vortex” por 1 minuto para ressuspender os microrganismos. Então, foram transferidos 0,1 mL desta suspensão resultante para 0,9 mL de solução salina redutora estéril, quando será diluída. Foram realizadas 07 diluições em meio BHI (Figura 3).



Figura 3: Diluição até 10^{-7}

Após as diluições foi semeado $25\mu\text{L}$ da diluição 10^{-7} em placas de Petri com meio *Agar mitis salivarius* com bacitracina, telurito de potássio e sacarose (experimento feito em triplicata para cada um dos tipos de leite). As placas foram incubadas em jarras de Gaspak a 37°C por 48 horas (Figura 4).



Figura 4: $25\mu\text{L}$ de solução diluída a 10^{-7} semeada em meio *ágar mitis salivarius*

3. RESULTADOS:

Após 48 horas de crescimento de *S. mutans* e de *L. casei*, observou-se crescimento uniforme em todas as seis placas, não sendo observado nenhum halo de inibição ao redor dos cinco tipos de leite (Figura 5).

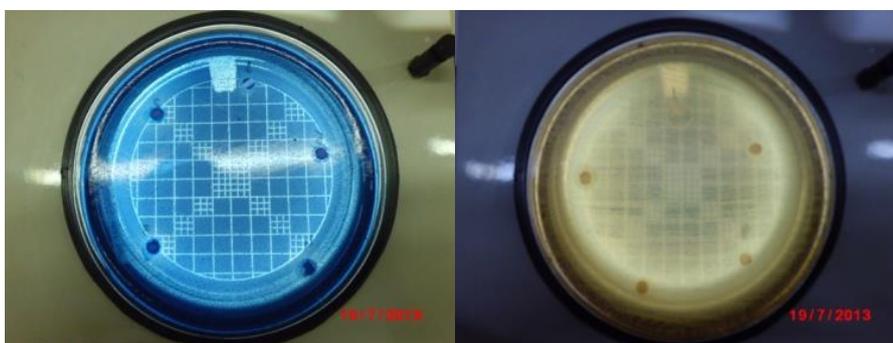


Figura 5: Verificação dos halos de inibição, de cima para baixo, para *S. mutans* e *L. casei*

Não houve crescimento de biofilme nas membranas após 48 horas embebidos em meio BHI e em regime intermitente nos cinco tipos de leite (Figura 6). O resultado provavelmente deve-se ao pouco tempo (48h), de cultura do biofilme já que não foi

observado crescimento nem nos discos-teste nem nos discos-controle. De acordo com Van de Sande et al. (2011) o crescimento de biofilme nessas condições requer um tempo de 10 dias. A dificuldade de se obter o enriquecedor de mucina (DMM), cujo autor utilizou, contribuiu também ao insucesso, uma vez que foi realizado com meio BHI. Conforme Prestes (2001) em sua metodologia, com 48h obteve-se resultado, assim, este trabalho seguiu como o tempo utilizado por este autor.

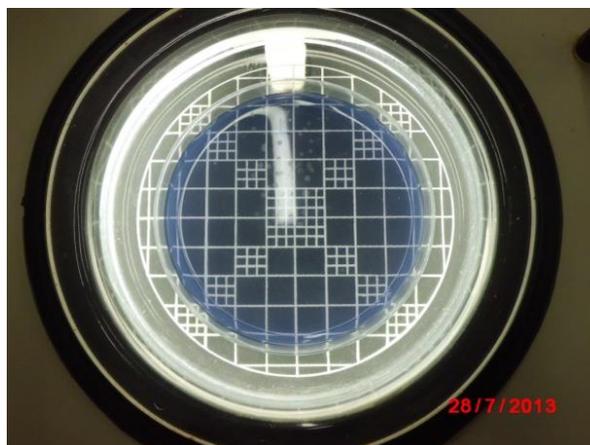


Figura 6: Insucesso do crescimento bacteriano após 48h.

Erickson (1999) verificando a fermentação e o crescimento bacteriano do leite materno com a capacidade tampão do mesmo mostrou que não houve crescimento significativo de bactérias cariogênicas, porém com a suplementação de sacarose, verificou a formação de cárie em 3,2 semanas.

Sendo assim, reflita-se o conhecimento materno sobre a cariogenicidade do leite associado ao açúcar e a higiene oral. Cruz et al. (2004) ao realizar um estudo, por meio de um questionário, concluiu que poucas mães entrevistadas receberam orientações sobre a higiene bucal do bebê.

4. CONCLUSÃO:

Nenhum dos tipos de leite testados teve a capacidade de inibir o crescimento de *S. mutans* e de *L. casei*. Por outro lado, o crescimento bacteriano não foi maior ao redor dos discos com os diversos tipos de leites. Já o modelo para crescimento de biofilme testado neste estudo não demonstrou alcançar sucesso. Ajuste são necessários para verificar se algum dos cinco tipos de leites testados pode interferir no processo de formação de biofilme por *S. mutans*. Este trabalho dará continuidade seguindo metodologia de Van de Sande et al. (2011) para que sejam completados os 10 dias.

5. REFERÊNCIAS:

CRUZ, Ana Amélia Gomes et al. Percepção Materna Sobre a Higiene Bucal de Bebês. **Pesq Bras Odontoped Clin Integr.**, João Pessoa, v. 4, n. 3, p.185-189, 2004.

DUARTE, Poliana Mendes; COPPI, Luciane Cristina; ROSALEN, Pedro Luiz. Cariogenicidade e propriedades cariostáticas por diferentes tipos de leite-revisão. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v. 50, n. 2, 2000.

ERICKSON, Pamela R.; MAZHARI, Elham. Investigation of the role of human breast milk in caries development. **American Academy Of Pediatrics Dentistry**, Chicago, v. 21, n. 2, p.86-90, 1999.

KRASSE, Bo. **Risco de Cáries: Guia Prático para Controle e Assessoramento**. 2. ed. São Paulo: Quintessence, 1998. 112 p.

LOSSO, Estela M. *et al.* Cárie precoce e severa na infância: uma abordagem integral. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v.85, n.4, 16 jan. 2009.

Prabhakar R.A.; KURTHUKOTI, Ameet J.; GRUPTA, Pranjali. Cariogenicity and Acidogenicity of Human Milk, Plain and Sweetened Bovine Milk: An In Vitro Study. **The Journal Of Clinical Pediatric Dentistry**, [s.i], p. 239-247. 2010.

PRESTES, Marcelo Pires. **Avaliação do efeito dos leites materno, de vaca e de cabra sobre a fermentação e síntese de polissacarídeos extracelulares na placa dentária humana - estudo in vitro**. 2003. 149 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Odontologia, Faculdade de Odontologia de Bauru/USP, Bauru, 2001.

RIBEIRO, Andréa Gadelha *et al.* Cárie precoce na infância: prevalência e fatores de risco em pré-escolares, aos 48 meses, na cidade de João Pessoa, Paraíba, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, p.1695-1700, nov-dez. 2005.

RIBEIRO, Nilza M. E.; RIBEIRO, Manuel A. S.. Aleitamento materno e cárie do lactente e do pré-escolar: uma revisão crítica. **Nilza M. E. Ribeiro**, Rio J., jan. 2004. p. 199-210.

RODRIGUES, Mariângela M. S. Schalka e Célia R. M. D.. A importância do médico pediatra na promoção da saúde bucal. **Revista Saúde Pública**, São Paulo, v. 30, n. 2, p.179-186, 11 dez. 1996.

SOUZA, Gleicy Fátima Medeiros De *et al.* Abordagem imunológica da cárie dental. **Rev Fac Odontol São José Dos Campos**, São Paulo, v. 4, n. 2, p.28-34, mai-ago. 2001.

TARDIF, Ginette *et al.* Spontaneous Switching of the Sucrose-Promoted Colony Phenotype in *Streptococcus sanguis*. **American Society For Microbiology**, Michigan, v. 57, n. 12, p.3945-3948, 30 ago. 1989.