

Efetividade antimicrobiana *in vitro* de enxaguatórios bucais frente aos microorganismos *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*

In vitro antimicrobial effectiveness of mouthwashes against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*

Resumo

Objetivo: Este estudo comparou a efetividade antimicrobiana *in vitro* dos enxaguatórios bucais Periogard®, Cepacol® e Plax® nos microorganismos *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Metodologia: Utilizaram-se 16 placas de Petri, com meio de cultura Ágar Sangue e 16 com Mueller Hinton. Quatro placas de cada meio foram usadas como controle positivo e negativo. Nas 24 placas restantes, distribuíram-se 4 discos umedecidos em cada placa, sendo: 1 em água destilada (controle), 1 em Periogard®, 1 em Plax® e 1 em Cepacol®. Após 48h, os halos de inibição de crescimento dos microorganismos foram medidos com paquímetro digital. Os dados foram analisados por ANOVA e teste de Bonferroni ($\alpha=0,05$).

Resultados: Em relação a *P. aeruginosa*, o Periogard® foi a substância mais efetiva ($P<0,05$), seguida pelo Cepacol®; Plax® e água destilada não tiveram efeito inibitório. Para *S. aureus*, todas as substâncias apresentaram efetividade antimicrobiana, em ordem decrescente: Plax® > Periogard® > Cepacol® ($P<0,05$).

Conclusão: Os resultados sugerem que os enxaguatórios bucais testados apresentam diferente potencial de inibição para o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Palavras-chave: Anti-sépticos bucais; *Staphylococcus aureus*; *Pseudomonas aeruginosa*; Clorexidina; Triclosan; Cetilpiridínio

Abstract

Purpose: The purpose of this study was to compare the *in vitro* antimicrobial effectiveness of Periogard®, Cepacol®, and Plax® against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*.

Methods: Sixteen Petri dishes with blood agar and 16 with Mueller-Hinton agar culture media were used. Four dishes of each culture media were used as negative and positive controls. In the remaining 24 dishes, 4 wet discs were distributed in each Petri dish, as follows: 1 soaked in distilled water (control), 1 in Periogard®, 1 in Plax®, and 1 in Cepacol®. After 48h the inhibition halos of microbial growth were measured with digital calipers. Data were analyzed by ANOVA and Bonferroni test ($\alpha=0.05$).

Results: Regarding *P. Aeruginosa*, Periogard® was significantly more effective than the other mouthwashes ($P<0.05$), followed by Cepacol; Plax® and distilled water did not show inhibition of microorganism growth. Regarding *S. aureus*, all mouthwashes had significant inhibitory effect in the following descending order: Plax® > Periogard® > Cepacol® ($P<0.05$).

Conclusion: The results suggest that the tested mouthwashes show different inhibitory potential for growth of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*.

Key words: Mouthwashes; *Staphylococcus aureus*; *Pseudomonas aeruginosa*; chlorhexidine; triclosan; cetylpyridinium

Tereza A. Delle Vedove Semenoff^{a,b}
Alex Semenoff-Segundo^{b,c}
Éder Ricardo Biasoli^d

^a Programa de Pós-Graduação, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP, Araçatuba, SP, Brasil

^b Universidade de Cuiabá (UNIC), Cuiabá, MT, Brasil

^c Área de Periodontia, Centro de Especialidades Odontológicas para Pacientes Especiais – CEOPE, Cuiabá, MT, Brasil

^d Departamento de Patologia e Propedêutica Clínica, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP, Araçatuba, SP, Brasil

Correspondência:
Alex Semenoff Segundo
Rua Profª Azélia Mamoré de Melo, 318, apt. 63
Cuiabá, MT – Brasil
78005-700
E-mail: semenoff@uol.com.br

Recebido: 13 de dezembro, 2007
Aceito: 18 de junho, 2008

Introdução

O enxaguatório bucal pode apresentar componentes antimicrobianos em sua composição, o que o torna um potencial auxiliar da higiene bucal diária por reduzir a formação do biofilme microbiano dentário. Além do uso na Odontologia, as diversas substâncias ativas podem ser utilizadas em variadas concentrações e indicações, como lavagem das mãos, desinfecção de superfícies, desinfecção da via aérea superior, limpeza do cordão umbilical em recém-nascidos, limpeza de pequenos ferimentos e em unidades de terapia intensiva (1-3). As diferentes substâncias ativas em enxaguatórios bucais possuem características distintas.

Por mais de três décadas, a clorexidina tem sido considerada o padrão-ouro em comparações com outros agentes químicos em Odontologia devido à sua capacidade de evitar a formação do biofilme dental (4). Uma das principais vantagens de seu uso é o amplo espectro antimicrobiano, atuando tanto em microrganismos gram-positivos como em gram-negativos, além da substantividade prolongada e contínua, mesmo na presença de sangue e demais fluidos corporais (5).

Outra substância ativa presente em enxaguatório bucal com bastante tempo no mercado é o cloreto de cetilpiridínio. Este agente monocatônico é um composto quaternário de amônia, cujo mecanismo de ação está relacionado com o aumento da permeabilidade da parede celular bacteriana, que favorece a lise, diminui o metabolismo e a habilidade da bactéria se aderir à superfície dentária (6,7). Este agente, apesar de apresentar mecanismo de ação semelhante ao da clorexidina para interferir no metabolismo celular bacteriano, apresenta menor eficácia clínica por possuir baixa substantividade (8).

O triclosan, muito utilizado também em dentifrícos, desorganiza a membrana celular bacteriana, inibindo seu funcionamento enzimático (6). Em concentrações baixas, há adsorção à porção lipídica dos microrganismos, o que causa uma modificação drástica no transporte celular, impedindo o adequado metabolismo e reprodução celular, tendo, portanto, um efeito antimicrobiano de largo espectro. Apesar de ser um agente químico capaz de agir bacteriostaticamente, sua carga aniônica faz com que possua baixa substantividade. Sua principal deficiência consiste em ser aniônico, diferente clorexidina e do cloreto de cetilpiridínio, que são catiônicos. Na tentativa de suprir esta deficiência, os fabricantes adicionam substâncias como o gantrez e o citrato de zinco, que aumentam sua substantividade e potencializam seus efeitos, respectivamente (6,9).

Os microrganismos escolhidos para este trabalho têm sido relacionados com o periodonto doente (10) e com complicações de infecções hospitalares simples ou complexas, além de apresentarem grande resistência aos antimicrobianos sistêmicos (3,11,12). Os processos infecto-inflamatórios no periodonto podem conduzir ao estabelecimento de gengivite e/ou periodontite, que pode ter relação de risco para doenças como diabetes, doenças cardiovasculares, parto pré-maturo, endocardite bacteriana, pneumonia, dentre outras (13,14). O *Staphylococcus aureus*, que faz parte do grupo dos cocos Gram positivos, é o agente mais comum em infecções

piogênicas e abscessos. Em indivíduos imunodreprimidos ou que tenham sofrido traumatismos ou queimaduras este microrganismo pode causar infecções mais graves como osteomielite, bacteremia geralmente associada a abscessos metastáticos que, por sua vez, pode causar quadros de endocardite (15). A espécie *Pseudomonas aeruginosa*, bacilo Gram negativo, é responsável por 70% das infecções por *pseudomonas* no ser humano; a exemplo do *S. aureus*, é um microrganismo oportunista e pode causar diversos processos patológicos em decorrência de cirurgias ou queimaduras. Podem colonizar respiradores das unidades de terapia intensiva levando os pacientes a severas pneumonias. A infecção por esta espécie vem aumentando progressivamente e já é considerada responsável por 15% de todos os casos de bacteremias do ser humano. Entretanto, o mais grave é que a mortalidade destes processos chega a 50% dos casos. Esta situação deve-se em parte pela alta resistência deste microrganismo a variados antimicrobianos e anti-sépticos (16).

Portanto, este estudo teve por objetivo comparar a efetividade antimicrobiana *in vitro* sobre os microrganismos *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* dos enxaguatórios bucais Periogard®, Cepacol® e Plax®, cujas composições contêm digluconato de clorexidina a 0,12%, cloreto de cetilpiridíneo e triclosan, respectivamente.

Metodologia

Os enxaguatórios bucais estudados foram: Periogard® (Colgate-Palmolive, São Bernardo do Campo, SP, Brasil. Lote BR121R), Cepacol® (Hoechst Marion Roussel, São Paulo, SP, Brasil. Lote 700276) e Plax® Classic (Colgate-Palmolive, São Bernardo do Campo, SP, Brasil. Lote BR122A). Os produtos foram adquiridos em farmácias na cidade de Cuiabá, MT.

Utilizaram-se 16 placas como meio de cultura Mueller Hinton (MH) (Acumedia Manufacturers Inc., Baltimore, MD, EUA) para o microrganismo *P. aeruginosa* (ATCC 27853) e 16 placas de Agar Sangue (AS) (Newprov Produtos para Laboratório, Pinhais, PR, Brasil) para o microrganismo *S. aureus* (ATCC 6538). Destinaram-se 2 placas de AS e 2 placas de MH para avaliação do crescimento dos respectivos microrganismos, servindo como controle positivo. Para o controle negativo, usaram-se 2 placas de AS e 2 placas de MH, não se realizando a semeadura dos microrganismos para avaliar a ausência de contaminação dos respectivos meios de cultura. Os microrganismos foram inoculados em 7mL de Brain Heart Infusion (BHI) (Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA) e levados à estufa em temperatura constante de 37°C por 24h para replicação. Buscou-se ao final desta etapa atingir uma concentração próxima de 3x10⁸ cel/mL, obtendo um turvamento similar ao tubo #1 da escala MacFarland.

Para o teste de difusão foi inoculado 0,1mL da suspensão com o auxílio de swabs estéreis (Rayswab Indústria Brasileira, Diadema, SP, Brasil). Discos de papel absorvente com 5mm de diâmetro (Qualy, São José dos Pinhais, PR, Brasil), previamente esterilizados, foram embebidos por um

período superior a 1min em: Periogard®, Cepacol®, Plax® e água destilada (controle). A inserção dos discos de papel nas placas seguiu o exemplo de um mostrador de relógio, sendo Plax® às 12h, Cepacol® às 15h, Periogard® às 18h e água destilada às 21h. As placas foram colocadas em estufa a 37°C por 48h.

Para a mensuração dos halos de inibição, um único examinador cego e calibrado utilizou uma lupa estereoscópica (Estek, São Paulo, SP, Brasil) e um paquímetro digital (Mitutoyo Sul Americana, Suzano, SP, Brasil). Os dados foram analisados por ANOVA e teste de Bonferroni, ao nível de significância de 5%. Para calibragem utilizou-se o teste t de Student para amostras pareadas, ao nível de significância de 5%.

Resultados

A Figura 1 demonstra os halos de inibição referentes aos microrganismos *P. aeruginosa* e *S. aureus*. Para *P. aeruginosa* os halos do grupo Periogard® foram significativamente maiores ($P<0,05$) que os demais. O Cepacol® mostrou-se com maior eficiência que Plax® e água destilada, os quais não apresentaram halos de inibição. Os halos de inibição referentes a *S. aureus* do Plax® foram significativamente maiores ($P<0,05$) que os demais, sendo seguido por Periogard®, Cepacol® e água destilada, os quais também diferiram entre si.

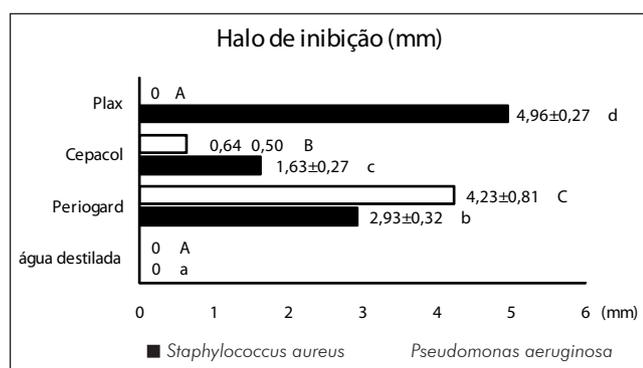


Fig. 1. Comparação dos halos de inibição (média+desvio-padrão) dos enxaguatórios bucais usados no estudo, para os microrganismos *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Médias seguidas de letras distintas são estatisticamente diferentes ($P<0,05$).

As placas de controle negativo apresentaram-se livres de qualquer crescimento fúngico ou bacteriano, e as de controle positivo demonstraram crescimento uniforme dos microrganismos por toda a extensão do meio de cultura.

Discussão

Uma vez estabelecidos os microrganismos como agentes etiológicos da doença periodontal e da cárie dentária, os agentes químicos e mecânicos que evitam ou auxiliam no controle mecânico de higiene bucal tornaram-se de grande importância na Odontologia. Os microrganismos investigados

neste estudo não são periodonto-patogênicos diretos (17); entretanto, em recente estudo, foram correlacionados ao periodonto doente (10). Outra questão relevante é o albergue de microrganismos encontrados no meio bucal. Sabe-se que o ambiente bucal tem por volta de 215cm² de área, podendo abrigar mais de 700 espécies de microrganismos capazes de colonizar este ambiente, o que o torna um local propício para sua disseminação nos próprios locais da boca como o dorso da língua, a saliva, o sulco gengival e os dentes, auxiliando na manutenção do biofilme aderido aos dentes ou contribuindo para infecção de lesões agudas (13,18).

A utilização dos enxaguatórios bucais deve seguir características importantes, como a substantividade, ou seja, capacidade de manter-se dentro da cavidade bucal, a eficiência contra microrganismos, a garantia contra a formação de biofilme e a inocuidade quando utilizados por seres humanos (19), além de boa relação custo-benefício. Os enxaguatórios bucais selecionados para o estudo são amplamente utilizados pela população e descritos na literatura.

Os resultados do presente estudo mostraram maior eficácia antimicrobiana do Periogard® para o microrganismo *Pseudomonas aeruginosa*, seguido pelo Cepacol®, em menor proporção. Possivelmente esses resultados são explicados pelas características físico-químicas catiônicas dos seus componentes, o que leva à adsorção da parede bacteriana, conduzindo a uma desestabilização de sua membrana celular, nos componentes lipídicos e aquosos, e a um colapso em sua permeabilidade (20). Resultados clínicos anteriores também demonstraram que a clorexidina manteve bom controle microbiano no período de 12h; os resultados foram similares somente quando o cloreto de cetildipiridíneo foi utilizado quatro vezes por dia, o que demonstra sua menor substantividade (20). Em um ensaio clínico randomizado, Moran et al. (21) testaram três diferentes enxaguatórios, dentre eles o cloreto de cetildipiridíneo e a clorexidina a 0,12%, e relataram a mesma eficiência antimicrobiana apresentada no presente estudo.

Os resultados em relação ao microrganismo *Staphylococcus aureus* surpreendem pela melhor eficiência antimicrobiana do Plax® sobre o Periogard®. Em estudo *in vitro* e *in vivo* utilizando o triclosan, principal componente do Plax®, associado ou não ao lauril sulfato de sódio, observou-se uma melhor ação *in vitro*, o que pode ter sido semelhante a este estudo (9). Arweiler et al. (22) observaram a superioridade da clorexidina sobre o triclosan tanto para diminuir a formação do biofilme como de provocar lise dos microrganismos.

Estas divergências de resultados podem ocorrer por variação nas técnicas de avaliação da efetividade antimicrobiana *in vitro*, sendo que as mais utilizadas são contato direto, dose inibitória mínima e difusão em placa. Optou-se pela difusão em ágar, com mensuração do halo, por ser bem utilizada na atualidade (23) e por usar o processo de difusão entre os microrganismos, um dos componentes mais importantes para o relacionamento e a interação do biofilme. Apesar disso, devido à variabilidade nas técnicas, e da substantividade da clorexidina, deve-se ter uma cautelosa interpretação dos resultados (24).

O resultado do Plax® frente ao Periogard® para o microrganismo *Staphylococcus aureus* levanta algumas dúvidas; no entanto, isto pode se constituir em um achado interessante para controle de infecções de origem não-odontogênica. Esta bactéria está fortemente ligada a complicações hospitalares e infecções resistentes (11,12), e, assim, talvez o Plax® possa ser uma alternativa em casos de riscos de contaminação por este microrganismo.

Outro aspecto metodológico importante foi a característica líquida de todas as substâncias, sendo que um veículo em gel poderia levar a diferentes resultados para a formação de

biofilme (25). Além disso, a presença de outras substâncias, como álcool, nas formulações dos enxaguatórios pode ter um efeito adicional de inibição para o crescimento de alguns microorganismos e para a formação de biofilme (25).

Conclusões

Dentro das limitações deste estudo, pode-se concluir que Periogard®, Cepacol® e Plax® apresentam diferente potencial de inibição para o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Referências

1. Filgueiras JL, Caçado RP, Silva CH, Salim MA. Avaliação do efeito imediato e residual do sabão anti-séptico, do PVP-I degermante, do PVP-I tópico e da clorexidina na degermação das mãos. Rev Bras Odontol 2004;61:195-198.
2. Mullany LC, Darmstadt GL, Khatry SK, Katz J, LeClerq SC, Shrestha S, et al. Topical applications of chlorhexidine to the umbilical cord for prevention of omphalitis and neonatal mortality in southern Nepal: a community-based, cluster-randomized trial. Lancet 2006;18;367:910-8.
3. Chlebick MP, Safdar N. Topical chlorhexidine for prevention of ventilator-associated pneumonia: a meta-analysis. Crit Care Med 2007;35:595-602.
4. Charles CH, Mostler KM, Bartels LL, Mankodi SM. Comparative antiplaque and antigingivitis effectiveness of a chlorhexidine and an essential oil mouthrinse: 6-month clinical trial. J Clin Periodontol 2004;31:878-84.
5. Rosenthal S, Spangberg L, Safavi K, Conn F. Chlorhexidine substantivity in root canal dentin. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2004;98:488-92.
6. Torres CRG, Kubo CH, Anido AA, Rodrigues JR. Agentes antimicrobianos e seu potencial de uso na Odontologia. Pós Grad Rev Fac Odontol São José dos Campos 2000;3:43-52.
7. Herrera D, Santos S, Ferrús J, Barbieri G, Trombelli L, Sanz M. Efficacy of a 0.15% benzydamine hydrochloride and 0.05% cetylpyridinium chloride mouth rinse on 4-day de novo plaque formation. J Clin Periodontol 2005;32:595-603.
8. Granjeiro JM, Carvalho LE, Bastos, JR, Henriques JF, Tarzia O. O cloreto de cetilpiridínio e a placa bacteriana: uma revisão. Rev Assoc Paul Cir Dent 1993;47:1019-22.
9. Giertsen E. Effects of mouthrinses with triclosan, zinc ions, copolymer, and sodium lauryl sulphate combined with fluoride on acid formation by dental plaque in vivo. Caries Res 2004;38:430-5.
10. Souto R, Andrade AF, Uzeda M, Colombo AP. Prevalence of "non-oral" pathogenic bacteria in subgingival biofilm of subjects with chronic periodontitis. Braz J Microbiol 2006;37:208-15.
11. Toufen Jr C, Hovnanian AL, Franca SA, Carvalho CR. Prevalence rates of infection in intensive care units of a tertiary teaching hospital. Rev Hosp Clin Fac Med São Paulo 2003;58:254-9.
12. Luchetti G, Silva AJ, Ueda SM, Perez MC, Mímica ML. Infecções do trato urinário: análise da frequência e do perfil de sensibilidade dos agentes causadores de infecções do trato urinário em pacientes com cateterização vesical crônica. J Bras Patol Med Lab 2005;41:383-9.
13. Page RC. The pathobiology of periodontal diseases may affect systemic diseases: inversion of a paradigm. Ann Periodontol 1998;3:108-20.
14. Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. Periodontol 2000 2005;38:135-87.
15. Martins, LT. Staphylococcus. In: Trabulsi LR, Alterthum F, Gompertz OF, Candeias JA. Microbiologia. 3.ed. São Paulo: Editora Ateneu; 2002. p.149-156.
16. Toledo MR, Trabulsi LR. Pseudomonas. In: Trabulsi LR, Alterthum F, Gompertz OF, Candeias JA. Microbiologia. 3.ed. São Paulo: Editora Ateneu; 2002. p.269-271.
17. Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. Periodontol 2000 2002;28:12-55.
18. Dahalén G. Microbiology and treatment of dental abscesses and periodontal-endodontic lesions. Periodontol 2000 2002;28:206-39.
19. Loesche WJ. Chemotherapy of dental plaque infections. Oral Sci Rev 1976;9:65-107.
20. Bonesvoll P, Gjermo P. A comparison between chlorhexidine and some quaternary ammonium compounds with regard to retention, salivary concentration and plaque-inhibiting effect in the human mouth after mouth rinses. Arch Oral Biol 1978;23:289-94.
21. Moran J, Addy M, Jackson R, Newcombe RG. Comparative effects of quaternary ammonium mouthrinses on 4-day plaque regrowth. J Clin Periodontol 2000;27:37-40.
22. Arweiler NB, Auschill TM, Baguley N, Netuschil L, Sculean A. Efficacy of an amine fluoride-triclosan mouthrinse as compared to the individual active ingredients. J Clin Periodontol 2003;30:192-6.
23. Tay FR, Hiraishi N, Schuster GS, Pashley DH, Loushine RJ, Ounsi HF, et al. Reduction in antimicrobial substantivity of MTAD after initial sodium hypochlorite irrigation. J Endod 2006;32:970-5.
24. Leonardo MR, da Silva LA, Filho MT, Bonifácio KC, Ito IY. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of a castor oil-based irrigant. J Endod 2001;27:717-9.
25. Rivera S, Yevenes I, Reyes J, Norero H, Monardes V. Efecto de colutorio-gel de clorhexidina sobre el crecimiento de placa en 24 horas. Rev odonto ciênc 2006;21:358-63.