

Rafaela Fiorotti Fardin¹
Igor Pena Andrade¹
Karla Barcelos Corrêa Xavier²
Ana Paula Ferreira Nunes³

***In vitro* evaluation of different concentrations of chlorhexidine on dental plaque**

| Avaliação *in vitro* das diferentes concentrações de clorexidina no controle da placa dental bacteriana

ABSTRACT | *The oral cavity is colonized by numerous bacteria living in biofilms on the mucosa and hard surface (enamel), mainly Streptococcus mutans. The use of oral rinse, chlorhexidine mainly based has become a widely used method for control of this biofilm and prevent oral diseases. The objective of this study is to compare the efficacy of chlorhexidine mouthwash to 0.12 and 0.2% on biofilm formed by S. mutans in vitro. Sample of Streptococcus mutans (ATCC 25175) were seeded in eppendorf containing Tryptone Soy Broth (TSB) supplemented with 10 g of sucrose and glass coverslip (2x 32mm). With the biofilm, the coverslip was immersed in 10mL of 0.12% chlorhexidine, chlorhexidine 0.2% and sterile water by this time 60s. After the biofilm was scraped off and diluted suspensions were prepared and seeded agar Mitis Salivarius 10µL. The plates were incubated at 36 ° C for 48 hours. We conducted the counts of FCU by the visual method. Through the methodology there was no significant reduction in S. mutans after use of chlorhexidine mouthwash base of 0.12 and 0.2% compared with the control (sterile water). In conclusion, chlorhexidine is not effective in S. mutans biofilm, requiring the prior removal of biofilm prior to use.*

Keywords | *Chlorhexidine; Biofilm; S. mutans; Mouthwash.*

RESUMO | Introdução: A cavidade bucal é colonizada por inúmeras bactérias, que vivem em biofilmes formados na mucosa e superfície dura (esmalte), sendo a mais prevalente o *Streptococcus mutans*. A utilização de enxaguatórios orais, principalmente à base de clorexidina, tornou-se um método muito utilizado para o controle desse biofilme e prevenção de afecções bucais. Objetivo: Comparar a eficácia do enxaguatório de clorexidina a 0,12 e 0,2% sobre biofilme formado por *S. mutans* “*in vitro*”. Metodologia: Foi utilizada uma amostra de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) semeados em eppendorf contendo Caldo Triptona de Soja (TSB) enriquecido com 10g de sacarose e lamínula de vidro (2x 32mm). Com o biofilme formado, a lamínula foi mergulhada em 10ml de solução de clorexidina 0,12%, clorexidina 0,2% e água estéril por 60s. Após esse tempo, o biofilme foi raspado e suspensões diluídas foram preparadas e 10µL destas semeadas em Ágar Mitis Salivarius. As placas foram incubadas em estufa a 36° C por 48 horas. Realizou-se a contagem de UFC pelo método visual. Resultados: Por meio da metodologia empregada, foi encontrado, como resultado, que não houve redução significativa do *S. mutans* após a utilização do enxaguatório à base de clorexidina 0,12 e 0,2%, se comparado com o controle (água estéril). Conclusão: A clorexidina não foi eficaz em biofilme formado por *S. mutans in vitro* sendo sugerida a remoção prévia do biofilme antes de sua utilização.

Palavras-chave | Clorexidina; Biofilme; *S. mutans*; Enxaguatório bucal.

¹Cirurgião-dentista graduado pela UFES, Vitória, ES.

²Professora adjunta do Departamento de Clínica Odontológica, UFES, Vitória, ES.

³Professora adjunta do Departamento de Patologia, UFES, Vitória, ES.

INTRODUÇÃO |

A adesão microbiana em superfícies e a consequente formação de biofilmes são questões críticas para muitas aplicações biomédicas e odontológicas. A adesão inicial e a colonização bem-sucedida de bactérias em superfícies sólidas desempenham um papel fundamental na formação de biofilme. As vantagens obtidas pelas bactérias em se organizarem em biofilmes são: conseguir maior proteção no que se refere ao sistema imunológico do hospedeiro, maior proteção contra agentes antimicrobianos, maior concentração de nutrientes perto da superfície e facilidade na troca de material genético¹⁶.

Segundo Carranza e Newman², o processo de formação da placa pode ser dividido em três fases. Na primeira fase, ocorre a formação da película adquirida, e as superfícies da cavidade oral são cobertas por uma película de glicoproteína derivada de componentes salivares e do fluido gengival, bem como de produção de células bacterianas e dos tecidos do hospedeiro. Na segunda fase, observa-se a colonização inicial das superfícies dentárias, predominantemente por microrganismos facultativos gram-positivos, a placa amadurece e ocorre uma transição do ambiente aeróbico para um meio privado de oxigênio, onde prevalecerão as bactérias gram-negativas anaeróbias. Na terceira fase, nota-se a colonização secundária e a maturação da placa, e microrganismos que não iniciaram a colonização das superfícies limpas dos dentes aderem a células de bactérias que já estão na massa da placa, por meio da coagregação¹⁵.

O *Streptococcus mutans* tem sido considerado a principal espécie bacteriana envolvida na formação da placa dental. O único habitat natural conhecido do *S. mutans* é a superfície dentária. Esses microrganismos não são encontrados na cavidade bucal antes da erupção dos dentes. Os glucagons produzidos por essas bactérias facilitam a aderência e o acúmulo de microrganismos, estabelecendo uma matriz extracelular resistente às forças mecânicas normais de remoção presentes no hospedeiro e proporcionando alguma proteção contra o sistema imune e defesas não imunes¹⁰, além de causarem a dissolução do esmalte por ácidos, produtos finais do metabolismo de carboidratos¹⁶.

A utilização de enxagatatórios bucais antimicrobianos tem sido proposta como um meio de reduzir os níveis de bactérias orais, especificamente o *S. mutans*⁸.

A clorexidina, dentro dos antissépticos de uso oral, apresenta propriedades que a colocam em papel de destaque em relação aos outros agentes químicos. É, em geral, utilizada como padrão contra o qual é medida a potência de outros

agentes. Possui uma efetividade no controle da placa e da gengivite, podendo ser usada com segurança em diversas situações clínicas.

A clorexidina possui amplo espectro de ação, agindo sobre bactérias gram-positivas, gram-negativas, fungos, leveduras e vírus lipofílicos. Sua eficácia no controle da placa dental vem sendo analisada desde a década de 50. Pode ser encontrada veiculada em dentifrícios, géis, vernizes ou soluções, entretanto seu uso em dentifrícios pode ser indevido, pois estes, normalmente, apresentam detergentes incompatíveis com a clorexidina, reduzindo sua ação¹⁹. Van Strydonck, Timmerman, Van der Velden, Van der Weijden²⁰ avaliaram o efeito inibitório da placa pela clorexidina e concluíram que este foi reduzido quando a clorexidina foi usada precedida por uma solução contendo lauril éter sulfato, presente em dentifrícios. Na forma de bochecho, as concentrações da clorexidina mais utilizadas comercialmente são 0,2% e 0,12% por serem reconhecidas como “Padrão Internacional” e terem sido estudadas extensivamente²¹. De acordo com Moran, Addy, Wade, Milson, McAndrew, Newcombe¹¹ em teste de cultura em placas, a substantividade da CHX após o bochecho persiste por mais de sete horas, com redução bacteriana $\geq 90\%$. Assim, exerce uma ação bactericida inicial imediatamente após o bochecho, combinada com uma ação bacteriostática prolongada²³, prevenindo a colonização bacteriana e o efeito inibidor residual da formação da placa dental¹⁸.

Cabe salientar que algumas substâncias químicas, como o cálcio, detergentes aniônicos e flúor, podem influenciar as ligações da CHX, reduzindo sua retenção e sua atividade antibacteriana¹. O pH bucal parece também exercer uma importante influência sobre a retenção da droga, sendo alcançado o melhor efeito quando o pH apresenta uma variação entre 6,4 e 9,0²³.

A forma mais usualmente utilizada da CHX era por meio de bochechos, realizados duas vezes ao dia, utilizando 10ml de uma solução de 0,2%. Estudos posteriores mostraram que, diminuindo a concentração do produto e aumentando o volume da solução, a quantidade de droga usada era praticamente a mesma, e a efetividade antiplaca manteve-se semelhante, com redução dos efeitos colaterais⁷. Assim, a concentração a 0,12% com bochechos de 15ml passou a ser empregada em larga escala. O tempo de duração do bochecho recomendado é de um minuto nessas concentrações²³. Sendo assim, a dose segura estabelecida foi de 20mg de CHX duas vezes ao dia, em que há equilíbrio entre eficácia e efeitos colaterais⁷.

A CHX é utilizada como adjuvante da higiene bucal

mecânica, durante o tratamento periodontal, antes de procedimentos orais cirúrgicos, após exodontias, para a redução do número de bactérias da saliva em pacientes física ou mentalmente incapacitados, nas candidoses bucais, em pacientes sob uso de aparelhos ortodônticos ou em pacientes com alto risco de cárie, sendo considerada como substância “padrão-ouro” no controle do biofilme dental¹².

Keijser, Verkade, Timmerman, Van der Weidjen⁷, em seu estudo desenvolvido com voluntários que não realizaram remoção mecânica de placa, apenas bochecho com as soluções de CHX duas vezes ao dia, por três dias, encontraram, como resultado, que a eficácia do bochecho por 30s a 0,12% foi a mesma do bochecho por 60s a 0,2%.

Ribeiro, Hashizume, Maltz¹⁷ realizaram análise comparativa *in vivo* da eficácia de bochecho de CHX a 0,12% e 0,2% com volumes de 15ml e 10ml, respectivamente. Constataram que houve eficácia no controle de placa e sangramento gengival sem diferenças significativas.

A clorexidina, até o momento, apresentou baixa evidência de toxicidade sistêmica em seres humanos, além de não produzir qualquer resistência apreciável dos microrganismos da boca e também não tem sido associada a quaisquer alterações teratogênicas². Lindhe⁹ relata que, durante um estudo com 150 estudantes de Medicina, que usaram uma solução de digluconato de clorexidina a 0,2 % durante dois anos, diversos exames, como hemograma, exame de urina e velocidade de sedimentação, foram realizados em intervalos regulares e não foram observadas diferenças significativas entre os grupos controle e experimental para qualquer um dos parâmetros avaliados. Baseado nesses achados, o autor afirma que a clorexidina pode ser usada com segurança por períodos prolongados.

Porém, alguns efeitos colaterais são atribuídos ao uso oral prolongado, por mais de 14 dias, da CHX em enxaguatórios, como: manchas acastanhadas nos dentes, em restaurações ou no dorso da língua, descamação e perda da sensibilidade oral, gosto amargo e a interferência na sensação gustativa. Embora existam, no mercado consumidor, enxaguatórios com concentração de 0,2%, a utilização de produtos com CHX a 0,12% é mais indicada, pois, nessa concentração, são diminuídos os efeitos adversos das soluções mais concentradas, mantendo-se a eficácia contra os microrganismos¹⁴. Dessa forma, a CHX, assim como qualquer outro antimicrobiano, deverá ser administrada sob supervisão profissional.

Objetivo

O objetivo deste trabalho é comparar a eficácia do enxaguatório de clorexidina a 0,12 e 0,2% sobre o biofilme formado por *S. mutans in vitro*.

METODOLOGIA |

Para este estudo, foi utilizada amostra de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175). Após a semeadura, a bactéria foi incubada em meio Ágar Mitis Salivarius a 36°C por 48 horas. Foram coletadas de três a cinco Unidades Formadoras de Colônia (UFC) com alças bacteriológicas e colocadas em *ependorf* contendo Caldo Triptona de Soja (TSB), enriquecido com 10g de sacarose e lamínula de vidro (2x 32mm). Os tubos foram incubados por 36 horas a 36°C, para haver formação e crescimento de biofilme na lamínula. Com o biofilme formado, foi retirada a lamínula do *ependorf* com pinça estéril e mergulhada em placa petri contendo 10ml de solução testada por 60 segundos. Após os 60s, a lamínula foi retirada e colocada em outra placa petri contendo 10 ml de salina estéril, e com uma espátula estéril foi raspado o biofilme da lamínula. Para verificar se ainda havia bactérias viáveis, após o tratamento com a clorexidina, a suspensão foi homogeneizada e 10µL foram semeadas em placa contendo Ágar Mitis Salivarius. A partir dessa suspensão, foram realizadas duas diluições de 1/10 e 1/100, com posterior semeadura em Agar Mitis Salivarius. As placas foram incubadas em estufa a 36° C por 48 horas. O procedimento foi efetivado para as concentrações de clorexidina de 0,2 e 0,12% e em salina estéril como controle. Realizou-se a contagem de UFC pelo método visual. O experimento foi feito em triplicata.

RESULTADOS |

Para a leitura e análise de resultados, foram utilizadas apenas as placas da diluição de 1/100, uma vez que as outras placas não possibilitaram a contagem de UFC.

Os resultados encontrados na pesquisa estão representados na Tabela 1.

Tabela 1 – Média dos resultados encontrados

	Clorexidina 0,12%	Clorexidina 0,2%	Controle
Média de UFC/mL	2,6x10 ⁵	1,4x10 ⁵	1,46x10 ⁶

De acordo com os resultados encontrados, não houve redução significativa do *S. mutans* após a utilização do enxaguatório à base de clorexidina 0,12 e 0,2% se comparado com o controle (água estéril), uma vez que uma redução de apenas 1 log₁₀ não é estatisticamente significativa.

DISCUSSÃO |

São poucos os artigos *in vitro* que testam a eficácia antimicrobiana do enxaguatório oral à base de CHX no biofilme já formado pelo *S. mutans*. Sendo assim, a discussão será realizada por meio de metodologias que empregam a utilização de *S. mutans* na saliva *in vitro*, assim como estudos *in vivo*.

Alguns estudos nos quais foi avaliada a eficácia da clorexidina após a formação do biofilme relatam que essa substância não foi capaz de reduzir o biofilme formado, tendo apenas um efeito superficial sobre ele^{3,22}.

De acordo com a literatura, a CHX é indicada para o controle da formação da placa bacteriana em pacientes considerados de alto risco à cárie ou para pacientes que já possuem processos inflamatórios gengivais devido à presença da placa bacteriana. Essas indicações baseiam-se nas propriedades que a clorexidina tem de inibir a formação de placa dental⁶.

Keijser, Verkade, Timmerman, Van der Weijden⁷, em estudo realizado com voluntários que não fizeram remoção mecânica de placa, apenas bochecho com as soluções de CHX duas vezes ao dia, por três dias, encontraram como resultado que as clorexidinas 0,12 e 0,2% foram eficazes no controle bacteriano da cavidade oral, o que contradiz o presente estudo *in vitro*, uma vez que não foi encontrada eficácia da CHX no biofilme formado por *S. mutans*.

Moreira, Santos, Carneiro e Porto¹⁴ realizaram um estudo para avaliação da eficácia da CHX 0,12% sobre o crescimento e produção de placa *in vitro* do grupo *S. mutans* e microrganismos da saliva. Como resultado, obtiveram que, quando presente, a CHX inibiu a produção de placa (75%), o que vai de encontro aos resultados obtidos pelo presente estudo que demonstrou que não houve diminuição significativa de UFC após a formação da placa.

Ccahuana-Vásquez, Cury³, em estudo *in vitro* para validar um modelo de formação de biofilme por *S. mutans*, simulando a exposição à sacarose que ocorre na cavidade oral, mostraram que o tratamento duas vezes ao dia, por um minuto, com CHX 0,12% apresentou efeito bactericida matando grande parte das bactérias viáveis do

biofilme, diminuindo a capacidade da produção de ácidos do biofilme, evitando o aumento de massa do biofilme e, conseqüentemente, a desmineralização do esmalte foi interrompida, o que contradiz o resultado do presente estudo, que não detectou redução do número de bactérias viáveis do biofilme.

Pratten, Barnett, Wilson¹⁴, em um trabalho *in vitro*, avaliaram a eficácia da CHX sobre a vitalidade de bactérias agrupadas em biofilmes. Após a confecção de biofilmes compostos por bactérias coletadas na placa bacteriana dental, os autores expuseram esses biofilmes formados a soluções de 0,2% de CHX por 1 minuto, 5 minutos e 60 minutos. Os resultados mostraram que os biofilmes expostos a 1 e 5 minutos do antimicrobiano não apresentaram efeito significativo na vitalidade bacteriana. No entanto, houve uma redução estatisticamente significativa na contagem de células bacterianas vitais após 60 minutos de exposição ao produto. Dessa forma, fica claro que a ação da CHX sobre o biofilme oral depende do tempo de exposição ao antimicrobiano e que o tempo usado rotineiramente na Odontologia, isto é, um minuto, se mostrou ineficaz, o que pode justificar a ausência da redução do número de colônias do presente trabalho, já que foram expostas a CHX pelo tempo de um minuto.

Na pesquisa de Zanatta, Antoniazzi, e Rösing²², em que os autores avaliaram a eficácia *in vivo* do bochecho de CHX 0,12%, em um estudo de boca dividida, com superfícies cobertas por placa e nas previamente sem placa, obtiveram como resultado que a solução testada apresenta pouco efeito na superfície coberta com placa dental, enquanto, na superfície previamente sem placa, a CHX inibiu a formação de biofilme. Mesmo sendo um trabalho *in vivo*, o achado está de acordo com o resultado encontrado no presente trabalho. A hipótese para a ineficácia da CHX, sobre superfícies cobertas de placas pode ser devido ao efeito superficial da CHX em que a vitalidade bacteriana permanece na parte interna do biofilme. Sendo assim, indica a necessidade da remoção prévia do biofilme para o uso da CHX.

Uma limitação adicional dos procedimentos de controle mecânico da placa bacteriana é que eles se concentram unicamente nas superfícies duras da cavidade oral, embora estas representem de 21 a 23% da área total. Sendo assim, os tecidos moles, que também são sítios colonizadores de biofilme, não são higienizados, tornando-se focos bacterianos. Agentes químicos presentes em bochechos podem alcançar as superfícies de tecidos moles melhorando o controle do crescimento do biofilme sobre

essas superfícies e retardando a acumulação microbiana em dentes. Esses achados sugerem que o uso diário de enxaguatórios bucais que afetem o biofilme formado sobre tecidos moles retarda o acúmulo de placa bacteriana na superfície dental¹⁷.

Evidências recentes sugerem que os fenótipos bacterianos podem ser modificados quando os organismos mudam a partir de um estado planctônico para um estado sésil, como nos biofilmes. Essas mudanças podem resultar em uma susceptibilidade alterada para agentes antimicrobianos²².

De acordo com Fine, Furgang, Barnett⁵ e Davies⁴, bactérias, quando organizadas em biofilme, podem ser 10-1000 vezes mais resistentes aos antimicrobianos do que bactérias planctônicas. Sendo assim, para uma avaliação mais eficaz dos enxaguatórios bucais, devem ser usadas metodologias envolvendo biofilmes¹³.

CONCLUSÃO |

Dessa forma, no presente trabalho, as duas concentrações de CHX não foram eficazes no controle do biofilme, o que reforça a ideia da necessidade da sua remoção mecânica antes do início do bochecho com essa solução, para que a clorexidina tenha eficácia no controle da placa dental.

REFERÊNCIAS |

- 1 - Bonesvoll P. Influence of ionic strength, calcium, sodium dodecyl sulphate and urea on the retention of chlorhexidine in the human mouth after mouth rinses. *Arch Oral Biol* 1977;22(4):273-9.
- 2 - Carranza FA, Newman MG. *Periodontia clínica*. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.
- 3 - Ccahuana-Vásquez RA, Cury JA. *S. mutans* biofilm model to evaluate antimicrobial substances and enamel demineralization. *Braz Oral Res* 2010.;24(2):135-41.
- 4 - Davies D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nature Reviews Drug Discovery* 2003;2:114-22.
- 5 - Fine DH, Furgang D, Barnett M. Comparative antimicrobial activities of antiseptic mouthrinses against isogenic planktonic and biofilm forms of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Journal of Clinical Periodontology* 2001; 28:697-700.
- 6 - Herrera BS, Mendes GIAC, Porto RM, Rigato HM, Moreira LD, Muscará MN, Magalhães JCA, Mendes GD.

O papel da clorexidina no tratamento de pacientes com gengivite no distrito de São Carlos do Jamari – RO. *R Periodontia* 2007; 17(04): 60-4.

7 - Keijser JAM; Verkade H; Timmerman MF; Van der Weidjen FA. Comparison of 2 commercially available chlorhexidine mouthrinses. *J Periodontol* 2003; 74 (2):214-18.

8 - Kocak MM, Ozcan S, Kocak S, Topuz O, Erten H. Comparison of the efficacy of three different mouthrinse solutions in decreasing the level of *Streptococcus mutans* in saliva. *European Journal of Dentistry* 2009; 3: 57-61.

9 - LINDHE, J. *Tratado de periodontologia clínica*. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992.

10 - Marinho BVS, Araújo ACS. O uso dos enxaguatórios bucais sobre a gengivite e o biofilme dental. *International Journal of Dentistry* 2007; 6(4): 124-31.

11 - Moran J, Addy M, Wade W, Milson S, McAndrew R, Newcombe RG. The effect of oxidising mouthrinses compared with chlorhexidine on salivary bacterial counts and plaque regrowth. *J Clin Periodontol* 1995; 22: 750-55.

12 - Moreira ACA, Santos TAM, Carneiro MCC, Porto MR. Atividade de um enxaguatório bucal com clorexidina a 0,12% sobre a microbiota sacarolítica da saliva. *R. Ci. méd. biol.* 2008; 7 (3): 266-72.

13 - Pan PC, Harper S, Ricci-Nittel D, Lux R, Shi W. *In-vitro* evidence for efficacy of antimicrobial mouthrinses. *J Dent* 2010; 38(1): 16-20.

14 - Pratten J, Barnett P, Wilson M. Composition and susceptibility to chlorhexidine of multispecies biofilms of oral bacteria. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64(9):3515-9.

15 - Ribeiro LGM, Hashizume LN, Maltz M. The effect of different formulations of chlorhexidine in reducing levels of mutans streptococci in the oral cavity: a systematic review of the literature. *Journal of Dentistry* 2007; 35: 359-70.

16 - Shemesh M, Avshalom T, Aharoni R, Steinberg D. Genetic adaptation of *Streptococcus mutans* during biofilm formation on different types of surfaces. *BMC Microbiology* 2010; 10:51.

17 - Teles RP, Teles FRF. Antimicrobial agents used in the control of periodontal biofilms: effective adjuncts to mechanical plaque control?. *Braz Oral Res* 2009; 23: 39-48.

18 - Tomás I, García-Caballero L, Cousido MC, Limeres J, lvarez MA, Diz P. Evaluation of chlorhexidine substantivity on salivary flora by epifluorescence microscopy. *Oral Diseases* 2009; 15: 428-33.

- 19 - Torres CRG, Kubo CH, Anido AA, Rodrigues JR. Agentes antimicrobianos e seu potencial uso na odontologia. Pós-Grad Rev Fac Odontol, 2000; 3(2):43-52.
- 20 - Van Strydonck DAC, Timmerman MF, Van der Velden U, Van der Weijden GA. Chlorhexidine mouthrinse in combination with an SLS-containing dentifrice and a dentifrice slurry. J Clin Periodontol 2006; 33: 340-44.
- 21 - Von Blücher AG. Dispositivos para liberação lenta de clorexidina para prevenção de periimplantite. [Dissertação de Mestrado]. Rio de Janeiro: Instituto Militar de Engenharia, 2007.
- 22 - Zanatta FB, Antoniazzi RP, K. Rosing C. The effect of 0.12% chlorhexidine gluconate rinsing on previously plaque-free and plaque-covered surfaces: a randomized, controlled clinical trial. J Periodontol 2007; 78(11): 2127-34.
- 23 - Zanatta FB, Rösing CK. Clorexidina: mecanismo de ação e evidências atuais de sua eficácia no contexto do biofilme supragengival. Scientific-A 2007; 1(2): 35-43.

Correspondência para/Reprint request to:

Rafaela Fiorotti Fardin

Rua dos Evangelicos, nº 385

Centro - Santa Maria de Jetibá - ES

e-mail: rafaelafiorotti@gmail.com