

Javana Doth Camerino de Oliveira¹
Joaquim Oliveira Pimentel¹
Sheila Ryan Almeida Macedo¹
Olívia Moraes de Lima Mota²
Márcia Maria Negreiros Pinto Rocha³
Sérgio Luis da Silva Pereira⁴

**Effect of povidone-iodine on
microorganisms of subgingival
biofilm: experimental study
*in vitro***

**| Efeito do iodo-povidine sobre
microorganismos de biofilme
subgingival: estudo experimental
*in vitro***

Abstract | *The purpose of this study was to evaluate the effect of different concentrations of povidone-iodine on oral microorganisms. Microorganisms from subgingival biofilm were immersed in brain heart infusion (BHI) and distributed in plates containing agar-sanguis in contact with various solutions: 0.9% saline, 0.12% chlorhexidine digluconate, 10% povidone-iodine pure, 10% povidone-iodine at 1:1, 10% povidone-iodine at 1:3. The saline solution had no effect on bacterial growth. By comparison, chlorhexidine solution showed the higher inhibition hale ($p < 0.05$) and the test groups 1 and 2 were similar ($p > 0.05$). In another hand, these groups were better than test group 3 ($p < 0.05$), that presented inhibition hale of just 3mm. The pure and 1:1 dilution povidone-iodine inhibited the growth of subgingival microorganisms as similar manner, but lower in comparison to 0.12% chlorhexidine digluconate.*

Keywords | *Chlorhexidine; Dental plaque; Microbiology; Povidone-iodine.*

RESUMO | O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de diversas concentrações de iodo-povidine sobre amostras microbiológicas de biofilme subgingival. Essas amostras foram coletadas de bolsa periodontal, colocadas em meio de cultura líquido BHI pré-reduzido (Brain Heart Infusion) e replicadas em placas de ágar-sangue contendo discos imersos em: solução salina a 0,9%, digluconato de clorexidina a 0,12%, iodo-povidine a 10% puro, iodo-povidine a 10% na proporção de 1:1, iodo-povidine a 10% na proporção de 1:3. A solução controle não apresentou efeito inibitório no crescimento bacteriano. O grupo contendo clorexidina apresentou o maior halo de inibição, evidenciando diferença estatística em relação aos outros grupos ($p < 0,05$). O grupo contendo iodo puro apresentou um halo estatisticamente semelhante ao grupo iodo 1:1 ($p > 0,05$). Estes, porém, apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo iodo 1:3 ($p < 0,05$), que tinha halo de inibição de apenas 3mm. O Iodo a 10% puro apresentou efeito inibitório *in vitro* sobre microorganismos do biofilme subgingival de maneira semelhante ao iodo 1:1, porém inferior ao digluconato de clorexidina a 0,12%.

Palavras-chave | Clorexidina; Placa dentária; Microbiologia; Iodo-povidine.

¹Especialista em Periodontia, Curso de Odontologia, Universidade de Fortaleza/CE, Brasil.

²Mestre em Periodontia, professora assistente, Curso de Odontologia, Universidade de Fortaleza/CE, Brasil.

³Doutora em Microbiologia, professora adjunta, Curso de Odontologia, Universidade de Fortaleza/CE, Brasil.

⁴Doutor em Periodontia, professor titular, Curso de Odontologia, Universidade de Fortaleza/CE, Brasil.

Introdução |

A periodontite crônica é uma doença multifatorial do aparelho de sustentação dental deflagrada pelo biofilme microbiano subgengival, composto por uma variedade de microorganismos que colonizam e se proliferam subgengivalmente em indivíduos suscetíveis. A quantidade e, principalmente, a virulência dos microorganismos e, em contrapartida, a resposta do hospedeiro, são determinantes para o desencadeamento e a progressão da destruição periodontal¹.

Estudos clínicos de longa duração mostraram a importância da remoção do biofilme subgengival para o tratamento bem-sucedido da periodontite em humanos. O debridamento mecânico radicular converte a microbiota patogênica em uma flora compatível com a saúde periodontal. Apesar de remanescentes de placa e cálculo poderem permanecer após raspagem e alisamento radicular meticulosos, essas mudanças na microbiota acarretam melhora em todos os parâmetros clínicos da periodontite¹⁵.

Entre os agentes antissépticos, o digluconato de clorexidina é o mais utilizado. Sua atuação supragengival está bem documentada, contudo não obtém o mesmo sucesso quando empregada subgengivalmente devido à presença de proteínas séricas na bolsa que reduzem o seu potencial antimicrobiano^{1,15}.

O iodo-povidine é um agente antimicrobiano utilizado na Odontologia para prevenção de bacteremias e no tratamento da gengivite e periodontite¹³. O iodo foi descoberto em 1811 por Bernard Courtois, entretanto seu efeito bactericida foi descrito por Davaine somente em 1880². Iodo-povidine ou iodo-polivinilpirrolidina (PVP-I) é um iodóforo, um composto formado pelo iodo molecular (I₂), que está intercalado fisicamente na hélice da macromolécula de polivinilpirrolidina (povidine) por meio de pontes de hidrogênio. Em solução, o iodo “ligado” está em equilíbrio com o iodo “livre” e é liberado do complexo PVP quando o iodo “livre” é utilizado¹⁴.

Esse composto contém aproximadamente 10% de iodo ligado. Assim, o iodo disponível equivalente pode ser calculado dividindo-se a concentração de PVPI por 10. Por exemplo, PVP-I (10%) contém na realidade 1% de iodo. A combinação de iodo com polivinilpirrolidina aumenta sua habilidade de se dissolver em água e álcool, além de diminuir sua irritabilidade e a capacidade de manchamento⁴.

O PVP-I é um microbicida de amplo espectro para bactérias gram-positivas e gram-negativas, fungos, micobactérias, clamídias, vírus e protozoários. Sua atividade é resultante dos fortes efeitos oxidantes sobre os grupos amino (NH), tiol (SH-) e hidroxifenólico (OH-) em aminoácidos e nucleotídeos. O PVP-I também reage fortemente com as duplas ligações em ácidos graxos insaturados na parede celular e nas membranas das organelas¹⁴.

Observações bioquímicas e de microscopia eletrônica sedimentam o argumento de que o PVP-I interage com a parede celular dos microorganismos, causando provavelmente a formação de um poro transiente ou permanente. Especula-se que, em razão da oxidação das duplas ligações na fração fosfolipídica da parede celular, interfaces sólido-líquidas em nível da membrana lipídica podem ser geradas, levando à perda de material citoplasmático, além da desnaturação de enzimas pelo contato direto com o iodo. Também foi observado que o PVP-I causa coagulação do material nuclear sem romper as paredes celulares¹⁴.

A irrigação subgengival com PVP-I pode reduzir a incidência de bacteremia, se empregada como um irrigante pré-procedimento, além de ser um antisséptico seguro que não prejudica a cicatrização dos tecidos ou induz resistência bacteriana^{5,8}. Na literatura atual, ainda não se observa uma concordância acerca da concentração mais efetiva do PVP-I sobre os patógenos periodontais. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade de diversas concentrações de iodo povidine na inibição do crescimento de bactérias do biofilme subgengival, comparando-o com o digluconato de clorexidina.

Material e Método |

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Fortaleza (Parecer n°. 022/2008, em 13-3-2008).

Avaliação antibacteriana

A avaliação antibacteriana foi realizada no laboratório de Microbiologia do Curso de Odontologia da Universidade de Fortaleza. Os microorganismos testados pertenciam a um biofilme subgengival de uma bolsa periodontal de 6mm do dente 11, obtido de um voluntário, normossistêmico, portador de periodontite

crônica não tratada. A placa subgingival foi colhida com um cone de papel absorvente estéril e imediatamente colocada em tubo de ensaio, contendo meio de cultura líquido BHI pré-reduzido (Brain Heart Infusion) incubado a 37°C em condições atmosféricas por 48h. Após crescimento em meio de cultura líquido, três a quatro gotas do crescimento bacteriano foram transferidas para tubos de ensaio contendo solução salina a 0,9%. O ajuste da concentração bacteriana aconteceu por comparação visual até atingir a concentração equivalente a 0,5 da escala McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/ml).

Para a realização dos testes com as diferentes soluções, em cada grupo foi utilizada uma Placa de Petri contendo o meio de cultura Mueller-Hinton (Difco) suplementado com 5% de sangue de carneiro. Em cada placa, cinco discos de papel estéreis foram impregnados, em volume de 0,5ml, com cada uma das seguintes soluções: solução salina a 0,9% (grupo controle), digluconato de clorexidina a 0,12% (grupo CLX), iodo-povidine a 10% puro (grupo iodo puro), iodo-povidine a 10% na proporção de 1:1 (uma parte de iodo para cada parte de soro fisiológico, grupo iodo 1:1); iodo-povidine a 10% na proporção de 1:3 (uma parte de iodo para cada três partes de soro fisiológico, grupo iodo 1:3).

Um *swab* estéril foi utilizado para a distribuição da suspensão bacteriana no ágar. O excesso foi retirado com leve pressão na parede do tubo e, em seguida, o *swab* foi inoculado na superfície da placa suavemente com movimentos em três sentidos diferentes. Para

cada placa, foi usado um novo swab. Após o preparo e semeadura das placas, elas foram incubadas em uma estufa em uma jarra de anaerobiose por 48 a 72 h a 37°C, em atmosfera ambiente.

A atividade microbiana foi avaliada pelo método clássico de difusão radial em ágar e os resultados foram evidenciados pela presença e pelo tamanho visual do halo de inibição do crescimento microbiano em torno dos discos de papel. Foram realizadas cinco medidas, uma para cada disco em cada grupo, por meio de régua milimetrada, obtendo-se a mediana do halo de inibição por grupo. As medidas foram realizadas por um único examinador.

Análise estatística

As medianas dos halos de inibição dos diversos grupos foram obtidas e comparadas entre si, utilizando-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, em nível de significância de 5%, pelo programa BioEstat 2.0.

Resultados |

O grupo contendo solução salina não demonstrou halo de inibição. O grupo CLX apresentou o maior halo de inibição, evidenciando diferença estatística em relação aos outros grupos ($p < 0,05$). O grupo contendo iodo puro apresentou um halo de 9mm, estatisticamente semelhante ao grupo iodo 1:1 ($p > 0,05$). Estes, porém, apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo iodo 1:3, que teve halo de inibição de apenas 3mm (Tabela1).

Tabela 1. Mediana dos halos de inibição (em mm) das soluções contendo clorexidina e as diferentes concentrações de iodo-povidine

| Grupos | CLX | Iodo puro | Iodo 1:1 | Iodo 1:3 |
|-------------------|-----|-----------|----------|----------|
| Halos de inibição | 13 | 9* | 7* | 3 |

*Não significativa ($p > 0,05$).

Discussão |

Os procedimentos terapêuticos periodontais têm como principal objetivo eliminar a presença dos patógenos associados ou ao menos desorganizar a comunidade bacteriana no interior das bolsas periodontais. Raspagem dental e aplainamento radicular têm demonstrado controlar a infecção periodontal em diferentes indivíduos, todavia esses procedimentos

podem não ser efetivos quando patógenos periodontais invadem os tecidos periodontais ou túbulos dentinários ou, ainda, quando estão presentes em locais inacessíveis para a instrumentação periodontal^{1,10}.

Uma grande variedade de agentes químicos tem sido objeto de estudos e sua descrição encontra-se na literatura científica. Diversos agentes, antimicrobianos, como clorexidina, fluoreto estanhoso, peróxido de hi-

drogênio, metronidazol, tetraciclina e iodo-povidine foram estudados como irrigantes das bolsas periodontais^{1,12,16}. Substâncias antibacterianas ideais devem ser efetivas contra o maior número de microorganismos com ação rápida, manutenção de atividade em baixas concentrações e, ainda, não apresentar efeitos colaterais e não causar desconforto durante o uso¹.

No presente estudo, o digluconato de clorexidina a 0,12% promoveu a maior inibição do crescimento bacteriano *in vitro*, concordando com os achados de Rocha et al¹¹. Porém, outro estudo concluiu que o PVP-I foi mais potente que o peróxido de hidrogênio, compostos fenólicos e clorexidina na inibição do crescimento de patógenos periodontais *in vitro*⁸.

Vários autores reconhecem as excelentes propriedades antibacterianas da clorexidina, contudo muitas observações existem sobre o mesmo efeito *in vitro*. Apesar de estudos *in vitro* terem demonstrado que a maioria das bactérias subgingivais é inibida pela clorexidina, seu efeito *in vivo* é limitado. A razão para isso é o curto tempo de contato da substância durante a irrigação subgingival e a aparente falta de substância da clorexidina às superfícies radiculares, o que pode ser resultado de sua ligação com proteínas séricas, quando há inflamação e sangramento^{1,16}.

O soro fisiológico, por ser uma substância sem ação antimicrobiana, não apresentou halo de inibição no crescimento bacteriano. Seu uso, além de controle negativo, justificou-se por ser utilizado como irrigante subgingival, principalmente para remoção de partículas de cálculo ou de bactérias após o tratamento mecânico. Analisando o nível de infiltrado inflamatório no tecido conjuntivo de ratos, Magro Filho et al.⁷ concluíram que o soro fisiológico foi o menos irritante quando comparado com a clorexidina e ao PVP-I.

O PVP-I foi o principal objeto do presente estudo em virtude de possuir amplo espectro de atividade bactericida, pouca resistência bacteriana e custo inferior aos outros antissépticos⁹. O halo de inibição do crescimento bacteriano decresceu com o aumento da diluição do PVP-I. Tais resultados concordam com os de outros estudos, como o de Nakagawa et al⁹, em que a solução não diluída obteve uma redução significativa nas unidades formadoras de colônia, o mesmo não ocorrendo com as diluições em 20% e 10%. No entanto, contradiz alguns estudos, nos quais um aumento no efeito bactericida do PVP-I é observado se for diluído, o que gera a hipótese de que o PVP-I diluído

enfraquece a ligação do iodo com o complexo PVP, resultando no aumento de iodo livre^{1,4}.

Higashitsutsumi et al.⁵ relataram que PVP-I a 0,25% demonstrou atividade bactericida contra *A.A.*, *P. gingivalis*, *F. nucleatum* e *P. intermedia*. Um estudo anterior adicionou às anteriores *P.gingivalis* TDC286 e *S.anginosus* que é frequentemente detectado em lesões de câncer oral. Uma concentração de 0,47% e 0,23% de PVP-I demonstrou atividade bactericida contra todas as bactérias testadas, sugerindo que o PVP-I é efetivo contra as mais patogênicas variedades bacterianas⁹.

O presente estudo demonstrou que o PVP-I a 10% puro promoveu uma considerável inibição bacteriana *in vitro*, porém inferior à clorexidina. Entretanto, dados *in vitro* não devem ser relacionados com resultados *in vivo*, pois achados intraorais podem ser afetados pela diluição salivar, desativação proteica e pela inabilidade das drogas de penetrar nos biofilmes bacterianos, o que ocorre com a clorexidina devido à sua baixa substância e pouca penetrabilidade^{1,4}.

Os testes antimicrobianos *in vitro* indicam primeiramente apenas a atividade, ou a falta dessa, e são pouco preditores da ação *in vivo*. Isso porque, até agora, os métodos não apresentam informações particularmente confiáveis sobre a permanência do agente antimicrobiano. Todavia esses testes são válidos para avaliar a disponibilidade dos ingredientes ativos e se os agentes apresentarão atividade *in vitro* com potencial ação *in vivo*¹¹.

Uma grande vantagem do PVP-I é sua quase nula promoção de resistência bacteriana em usos curtos ou prolongados, em virtude dos efeitos do iodo sobre a parede celular bacteriana, que resulta na rápida morte celular. Já os antibióticos usualmente interferem nos processos bioquímicos, dando aos microorganismos a oportunidade de compensar essas interações⁴.

Existe a possibilidade de o PVP-I provocar dermatite ou mucosite, em caso de reação alérgica e, por isso, durante a anamnese, é importante incluir no questionamento a história pregressa de alergia ao iodo e, se necessário, lançar mão de testes de contato previamente à assepsia ou escolher outra solução para tal procedimento⁷. PVP-I também é contraindicado em mulheres grávidas e que estejam amamentando. Em geral, o uso por curto período de PVP-I não tem causado disfunções de tireoide. Contudo, usos prolongados podem induzir disfunção de tireoide pela excessiva incorporação de iodo⁴.

Apesar dessas limitações, estudos mostraram a eficácia do PVP-I como adjuvante no tratamento de periodontite crônica^{1,3,12}. Rosling et al.¹² observaram que esse agente químico foi efetivo no tratamento periodontal em dentes unirradiculares, quando utilizado como irrigante em dispositivos ultrassônicos. Hoang et al.⁶ também observaram que o PVP-I causou uma grande redução na contagem bacteriana de bolsas periodontais em dentes não molares. Porém, em dentes com envolvimento de furca, a associação do PVP-I como coadjuvante ao tratamento periodontal não cirúrgico não proporcionou benefícios adicionais¹⁰. Então, novos estudos clínicos utilizando diferentes concentrações do iodo-povidine em dentes multirradiculares devem ser realizados para constatar os resultados *in vitro* obtidos no presente estudo.

Conclusões |

Dentro dos limites deste estudo, o iodo a 10% puro apresentou efeito inibitório *in vitro* sobre microorganismos do biofilme subgingival de maneira semelhante ao iodo 1:1, porém inferior ao digluconato de clorexidina a 0,12%.

Referências |

- American Academy of Periodontology. Position paper: the role of supra and subgingival irrigation in the treatment of periodontal diseases. *J Periodontol* 2005;76(11):2015-27.
- Fleischer W, Reimer K. Povidone iodine antiseptics: state of the art. *Dermatology* 1997; 195(2): 3-9.
- Forabosco A et al. A comparative study of a surgical method and scaling and root planning using the Odontoson. *J Clin Periodontol* 1996; 23(7): 611-4.
- Greenstein G. Povidone-iodine's effects and role in the management of periodontal diseases: a review. *J Periodontol* 1999; 70(11):1397-405.
- Higashitsutsumi M et al. Bactericidal effects of povidone-iodine solution to oral pathogenic bacteria in vitro. *Postgrad Med J* 1993; 69(3):10-4.
- Hoang T et al. Povidone-iodine as a periodontal pocket disinfectant. *J Periodontol Res* 2003; 38(3): 311-
- Magro Filho O et al. Biocompatibilidade das soluções de iodo polivinilpirrolidona (PVP-I) e de clorexidina: estudo histológico em ratos. *BCI* 1998; 5(3):9-16.
- Maruniak J et al. The effect of 3 mouthrinses on plaque and gingivitis development. *J Clin Periodontol* 1992; 19(1):19-23.
- Nakagawa, T. et al. Bactericidal effects on subgingival bacteria of irrigation with a povidone-iodine solution (Neojodin). *Bull Tokyo Dent Coll* 1990; 31(3): 199-203.
- Ribeiro EDP et al. Povidone-Iodine used as an adjunct to non-surgical treatment of furcation involvements. *J Periodontol* 2006; 77(2):211-7.
- Rocha ARA et al. Efeito de diferentes agentes químicos sobre microorganismos de biofilme supra-gingival: estudo experimental *in vitro*. *UFES Rev Odontol* 2008; 10(2):27-30.
- Rosling BG et al. The use of PVP-iodine as an adjunct to non-surgical treatment of chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2001; 28(11): 1023-31.
- Santos MA et al. O uso de iodo-povidine em periodontite. *Rev Odontol Araçatuba* 2003; 24(2):9-16.
- Schreier H et al. Molecular effects of povidone-iodine on relevant microorganisms: an electron-microscopic and biochemical study. *Dermatology* 1997; 195(2):111-6.
- Shiloah J, Hovious L A. The role of subgingival irrigations in the treatment of periodontitis. *J Periodontol* 1993; 64(9):835-43.
- Stabholz A et al. Retention of antimicrobial activity by human root surface after *in situ* subgingival irrigation with tetracycline HCL or chlorhexidine. *J Periodontol* 1993; 64(2): 137-41.

Correspondência para/Reprint request to:

Sergio Luís da Silva Pereira

An. Enge. Leal Lima Verde, 2086

Alagadiço Novo - Fortaleza/CE - CEP 60833-520

Tel.: (85) 34773200

luis@unifor.br