

Anna Rafaela de Alcântara Rocha¹
Carla Lopes Soares¹
Sérgio Luís da Silva Pereira²
Márcia Maria Negreiros Pinto Rocha³

**Effect of different chemical agents
on microorganisms of biofilm
supragingival: experimental
study in vitro**

Efeito de diferentes agentes químicos sobre microrganismos de biofilme supragengival: estudo experimental in vitro

Abstract | The aim of this study was to evaluate the effect of various chemical agents on oral microorganisms. Microorganisms from supragingival biofilm was immersed in brain heart infusion (BHI) and distributed in plates containing agar-sanguis in contact with different solutions: 0.9% saline (control group), 0.053% Cetylpyridinium chloride (Oral-B - CPC group), 0.12% Chlorhexidine digluconate (Periogard - CPC / CLX group) and Cetylpyridinium + Chlorhexidine digluconate (Noplak Max® - CPC/CLX group). The saline solution had no effect on bacterial growth. By comparison, the inhibition hales presented by CPC/CLX and other groups were similar. Thus, the combination of Cetylpyridinium chloride + Chlorhexidine digluconate inhibited the growth of microorganisms similar to these substances individually.

Keywords | Chlorhexidine. Cetylpyridinium. Mouthwashes. Dental plaque. Microbiology.

RESUMO | O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de diferentes agentes químicos sobre microrganismos orais, comparando-os entre si. Esses agentes foram obtidos de um biofilme supragengival com uma semana de colonização, colocados em meio de cultura BHI (Brain Heart Infusion) e replicados em placas de ágar-sangue contendo discos imersos em: solução salina a 0,9% (grupo controle), cloreto de cetilpiridínio a 0,053% (Oral-B® - grupo CPC), digluconato de clorexidina a 0,12% (Periogard® - grupo CLX) e cloreto de cetilpiridínio + digluconato de clorexidina (Noplak Max® - grupo CPC/CLX). As soluções de cloreto de cetilpiridínio + digluconato de clorexidina demonstraram halo de inibição semelhante à clorexidina e ao cloreto de cetilpiridínio, enquanto a solução de soro fisiológico não apresentou efeito inibitório no crescimento bacteriano. Portanto, a associação de cloreto de cetilpiridínio + digluconato de clorexidina exerceu efeito inibitório “*in vitro*” sobre microrganismos de forma similar a essas soluções separadamente.

Palavras-chave | Clorexidina. Cetilpiridínio. Anti-sépticos bucais. Placa dentária. Microbiologia.

¹Graduando em Odontologia, Universidade de Fortaleza

²Doutor em Periodontia, professor titular, Universidade de Fortaleza

³Doutora em Microbiologia, professora adjunta, Universidade de Fortaleza

Introdução |

Após 10 a 21 dias de acúmulo de placa bacteriana, sinais clínicos de inflamação gengival se estabelecem na maioria das pessoas, embora haja variações individuais. Algumas delas são intrinsecamente resistentes e outras são mais propensas à gengivite clínica, caracterizada por vermelhidão, tumefação gengival e uma tendência aumentada ao sangramento marginal após sondagem delicada¹⁵.

A prevenção da gengivite é necessária para se evitar a propagação da inflamação para os tecidos de suporte dos dentes; no entanto essa prevenção é possível desde que haja controle diário da placa bacteriana supragengival com a escovação dentária e o uso do fio dental seja efetivamente realizado⁴. Esse controle mecânico ainda é feito de maneira esporádica e ineficiente pela maioria das pessoas, significando que, mesmo após a escovação, ainda permanecem nichos organizados de biofilme sobre a superfície dental. Em virtude disso, o uso de produtos químicos na forma de colutórios foi formulado, objetivando um efeito adicional no controle da placa e gengivite¹⁷.

O controle químico de placa bacteriana vem sendo utilizado como uma complementação dos meios mecânicos de higiene bucal ou como seu substituto em situações clínicas nas quais o controle normal não pode ser efetuado. A clorexidina, um diguano-hexano com acentuadas propriedades anti-sépticas, é considerada o quimioterápico-padrão, apresentando resultados positivos no controle do biofilme e da gengivite, por meio da inibição ou retardo da proliferação bacteriana^{9,15}. Entretanto, em decorrência de efeitos indesejáveis após seu uso prolongado, como pigmentação e diminuição transitória do paladar⁵, outros produtos, como o cloreto de cetilpiridínio, vêm sendo utilizados.

O cloreto de cetilpiridínio é uma amônia quaternária, composta por um anel alifático e é classificado como agente ativo de superfície catiônica, aprovada pela Associação Dentária Americana (ADA) como agente antiplaca efetivo e seguro¹⁷. O cloreto de cetilpiridínio tem uma atividade prolongada na cavidade oral por se ligar às glicoproteínas cobrindo o dente e a mucosa oral² e sua atividade antimicrobiana é de largo espectro, causando a interrupção do metabolismo, crescimento celular e morte celular¹⁷.

Os resultados encontrados em alguns estudos^{8,10} demonstraram que soluções para bochecho contendo 0,05% de cloreto de cetilpiridínio reduzem significativamente o acúmulo de placa supragengival, apesar de outros relatos apontarem um resultado menos efetivo na redução de placa bacteriana^{9,14}.

Recentemente, estudos avaliando uma nova formulação de solução para bochecho contendo uma associação de clorexidina e cloreto de cetilpiridínio, demonstraram efeitos clínicos satisfatórios no controle da placa bacteriana^{9,16}. Entretanto, como há uma escassez de trabalhos na literatura

avaliando o efeito desse composto na inibição do biofilme dental *in vitro*, este estudo se propõe a avaliar esse efeito.

Material e método |

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Fortaleza parecer 300/2007, em 26-11-2007.

Avaliação antibacteriana

A avaliação antibacteriana foi realizada no laboratório de Microbiologia do Curso de Odontologia da Universidade de Fortaleza. Os microrganismos testados pertenciam a um biofilme supragengival com acúmulo de sete dias e visível a olho nu. Esse biofilme foi obtido de um voluntário, normosistêmico e com saúde periodontal, que interrompeu a escovação dentária durante uma semana na região do dente canino inferior direito¹¹. Uma porção do biofilme foi colhida com o auxílio de curetas periodontais estéreis e colocada em tubos de ensaio, contendo meio de cultura líquido BHI (Brain Heart Infusion), incubado por 18-24 h a 37°C em condições atmosféricas. 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 foi feito pela 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, quatro discos de papel estéreis foram impregnados, em volume de 50µl, com cada uma das seguintes soluções: solução salina a 0,9% (grupo controle), cloreto de cetilpiridínio a 0,053% (Oral-B® - grupo CCP), digluconato de clorexidina a 0,12% (Periogard® - grupo CLX) e cloreto de cetilpiridínio + digluconato de clorexidina (Noplak Max® - grupo CCP/CLX).

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 bacteriológica a 37°C durante 24h, em atmosfera ambiente.

A atividade antimicrobiana foi avaliada pelo método clássico de difusão radial em ágar e os resultados foram evidenciados com a presença e tamanho visual do halo de inibição do crescimento microbiano em torno dos discos de papel. Foram realizadas quatro medidas, sendo uma para cada dis-

co em cada grupo, por meio de uma régua milimetrada, obtendo-se a média do halo de inibição por grupo. As medidas foram realizadas por um único examinador.

Análise estatística

As médias e desvio-padrão dos halos de inibição dos diversos grupos foram obtidos e comparados entre si, utilizando-se o teste de Student Newman-Keuls, 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 (10,5mm), evidenciando diferença estatística em relação ao grupo CCP ($p < 0,05$). O composto CCP/CLX apresentou halo de inibição em média de 9,75mm, porém foi estatisticamente semelhante aos grupos CLX e CCP ($p > 0,05$) (Tabela 1).

Tabela 1. Números absolutos, média e desvio-padrão (em mm) dos halos de inibição das soluções de CCP, CLX e CCP/CLX

Grupos Amostra	CCP	CLX	CCP/CLX
1	8	10	9
2	8	11	10
3	9	10	10

*Médias seguidas por letras iguais não apresentam diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$)

Discussão

A participação microbiana na doença periodontal tem sido considerada em diversos estudos, havendo atualmente um consenso de que não existe doença periodontal de natureza inflamatória sem a presença de microrganismos. A principal fonte de agressão às estruturas periodontais é a complexa microbiota da cavidade oral, principalmente a do sulco gengival. O mecanismo de formação do biofilme supragengival sobre a película adquirida tem sido motivo de muitas pesquisas^{12,13}.

Atualmente, o agente inibidor do biofilme supragengival que mostra melhores resultados é a clorexidina. Estudos indicam que dois bochechos diários com 10ml de uma solução aquosa de digluconato de clorexidina a 0,12% inibem quase completamente o desenvolvimento do biofilme, cálculo e gengivite em humanos³. Esses resultados confirmam sua ação sobre as bactérias do biofilme supragengival, como demonstrado na presente pesquisa e em outros estudos^{6,7,11}.

Recentemente, algumas investigações foram desenvolvidas para avaliar se compostos combinando clorexidina e cloreto de cetilpiridínio são mais efetivos do que esses elementos isoladamente. Herrera et al.² observaram que soluções contendo essas duas substâncias foram mais eficientes do que a clorexidina em testes de inibição de crescimento bacteriano "*in vitro*", discordando dos resultados encontrados no presente estudo. Entretanto, em estudos clínicos, essa solução combinada demonstrou efeito antiplaca semelhante à clorexidina^{9,16}.

Além das diferenças metodológicas, outra razão para explicar a semelhança dos resultados entre os grupos pode estar na formulação do grupo CCP/CLX. Esse composto, além de possuir os dois principais agentes químicos aqui estudados, também comporta produtos naturais, como extrato de própolis, extrato de equinácea e extrato de hamamelis. Esses componentes, apesar de não serem considerados agentes antiplaca efetivos¹⁷, apresentam potencial ação antibacteriana¹.

Dessa forma, seria talvez previsível que a combinação de vários agentes resultasse em uma ação sinérgica e, assim, mais efetiva da ação antiplaca, quando comparados com as diferentes substâncias isoladamente. Entretanto, o antagonismo de diversas substâncias com efeitos similares, contidas em um mesmo produto, foi ressaltado por Wu e Savitt¹⁷ e deve ser considerado na avaliação dos resultados observados no presente estudo. Futuras pesquisas microbiológicas em linhagens de microrganismos específicos e em culturas de biofilmes, bem como estudos clínicos em longo prazo devem ser realizados para confirmar esses achados.

Conclusões

Dentro dos limites deste estudo piloto, a associação do digluconato de clorexidina e cloreto de cetilpiridínio apresentou efeito inibitório *in vitro* sobre microrganismos de biofilme supragengival de forma semelhante a essas soluções isoladamente.

Referências

- 1 Duarte CS, Kfourf LS. Ação da própolis sob forma de bochechos. *RGO* 1999; 47(2): 82-4.
- 2 Herrera D et al. Efficacy of a 0.15% benzylamine hydrochloride and 0,05% cetylpyridinium chloride mouthrinse on 4-day of new plaque formation. *J Clin Periodontol* 2005; 32(6): 595-603.
- 3 Lang NP et al. Effects of supervised chlorhexidine mouthrinses in children. A longitudinal clinical trial. *J Period Res* 1982; 17(1): 101-11.

- 4 Løe H, Silness J. Periodontal disease in pregnancy. Prevalence and severity. *Acta Odontol Scand* 1965; 21(2):533-51.
- 5 Løe H. Does chlorhexidine have a place in the prophylaxis of dental disease? *J Period Res* 1973; 8(12): 93-9.
- 6 Mikkelsen L et al. Classification and prevalences of plaque Streptococci after two years oral use of chlorhexidine. *J Period Res* 1981; 16(6): 646-58.
- 7 Mikkelsen L, Jensen SB, Løe H. Susceptibility to chlorhexidine of plaque streptococci after two years oral chlorhexidine hygiene. *J Period Res* 1982; 17(4): 366-73.
- 8 Moran J, Addy M. The effects of a cetylpyridinium chloride prebrushing rinse as an adjunct to oral hygiene and gingival health. *J Periodontol* 1991; 62(9): 562-4.
- 9 Quirynen M et al. A 0.05% cetylpyridinium chloride/0.05% chlorhexidine mouth rinse during maintenance phase after initial periodontal therapy. *J Clin Periodontol* 2005; 32(4): 390-400.
- 10 Renton-Harper P et al. A comparison of clorexidine, cetilpiridinium chloride, triclosan and C31G mouthrinse products for plaque inhibition. *Periodontol* 1996; 61(5): 486-9.
- 11 Rodrigues IS. et al. Efeito de diferentes concentrações do extrato hidroalcolico de alecrim-pimenta sobre amostras microbiológicas de biofilme supragengival: estudo experimental "in vitro". *Rev Periodontia* 2007; 17(1): 82-6.
- 12 Socransky SS et al. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998; 25(2): 134-44.
- 13 Thylstrup A, Fejerskov O. Formação, composição e ultra-estrutura dos depósitos microbianos nas superfícies dos dentes. In: *Tratado de cariologia*. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 1988. p. 43-60.
- 14 Torres CRG et al. Agentes antimicrobianos e seu potencial de uso na Odontologia. *Rev Fac Odontol São José dos Campos* 2000; 32(2):43-51.
- 15 Van Der Weijden GA et al. Effect of pre-experimental maintenance care duration on the development of gingivitis in a partial mouth experimental gingivitis model. *J Period Res* 1994; 29(3):168-173.
- 16 Van Strydonk DAC et al. Plaque inhibition of two commercially available clorexidine mouthrinses. *J Clin Periodontol* 2005; 32(2):305-9.
- 17 Wu CD, Savitt ED. Evaluation of the safety and efficacy of over-the-counter oral hygiene products for the reduction and control of plaque and gingivitis. *Periodontol* 2000; 28(1):91-105.

Correspondência para/ Reprint request to:
Sérgio Luis da Silva Pereira
Av. Engenheiro Leal Lima Verde, 2086.
Alagadiço Novo
60833-520 Fortaleza, CE.
Tel: (85) 34744108
luis@unifor.br