

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA ANTIMICROBIANA DE ANTISSEPTICOS BUCAIS

EVALUATION OF ANTIMICROBIAL EFFICACY OF ANTISEPTICAL VESSELS

¹ AUTRETO, K. A. S.; ² GATTI, L. L.

¹ Dissente do curso de Farmácia – Faculdades Integradas de Ourinhos / FIO

² Profº Orientador curso de Farmácia – Faculdades Integradas de Ourinhos / FIO

RESUMO

A higiene bucal tem se tornado uma prática comum hoje em dia, e ainda assim muitos desconhecem a real função de determinados produtos químicos utilizados para tal procedimento. A microbiota natural bucal é composta por uma variedade de microrganismos que em harmonia favorável servem de proteção para mucosa, contudo em situações de desequilíbrio podem causar doenças patológicas bem conhecidas atualmente, portando se faz necessário o uso de métodos mecânicos e químicos para auxiliarem na higiene e saúde bucal, e o principal método químico para tal pratica hoje, é o uso de antissépticos bucais. Contudo, a variedade disponível no mercado e o acesso facilitado dificulta o entendimento tanto do prescritor como do paciente. Sendo assim este trabalho teve como objetivo avaliar 'in vitro' a atividade antimicrobiana de antissépticos bucais comercialmente disponíveis. Conclui-se, pela metodologia adotada, que o único antisséptico que apresentou atividade antimicrobiana frente às bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* foi o Periogard® (clorexidina 0,12%), não sendo os demais efetivos nas concentrações testadas.

Palavras-chave: Antissépticos bucais, eficácia antimicrobiana, avaliação.

ABSTRACT

Oral hygiene has become a common practice nowadays, and yet many are unaware of the actual function of certain chemicals used for such a procedure. The natural oral microbiota is composed of a variety of microorganisms that in favorable harmony serve as protection for mucosa, but in situations of imbalance can cause pathological diseases well known nowadays, requiring the use of mechanical and chemical methods to aid in hygiene and oral health, and the main chemical method for this practice today is the use of oral antiseptics. However, the variety available on the market and facilitated access hinders the understanding of both the prescriber and the patient. Therefore, this work aimed to evaluate 'in vitro' the antimicrobial activity of commercially available oral antiseptics. It was concluded by the methodology adopted that the only antiseptic that presented antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* bacteria was Periogard® (chlorhexidine 0.12%), not being the other effective in the tested concentrations.

Keywords: Oral antiseptics, antimicrobial efficacy, evaluation.

INTRODUÇÃO

Mesmo que a higiene bucal seja uma prática comum, muitos ainda desconhecem a real função de determinados produtos químicos e de sua relevância para a prevenção de infecções (SILVEIRA et al., 2010).

A microbiota natural da cavidade bucal é composta por mais de 300 espécies de bactérias, que em harmonia favorável mantem-se em equilíbrio e podem servir de proteção ao organismo, contudo em situações que possam sofrer interferências de

fatores relacionados aos hospedeiros, como interações físico-químicas, entre enzimas e micro-organismos, redução de saliva e de imunoglobulinas, níveis elevados das enzimas associadas a uma higiene bucal precária e gengivites, podem promover a colonização bucal por bactérias e causar patologias hoje conhecidas, como cárie dentária, gengivite e a doença periodontal (SILVEIRA et al., 2010).

A presença de bactérias do gênero *Staphylococcus* na cavidade bucal humana adquire importância, pois podem atuar como microbiota suplementar e em determinadas situações ocasionar doença bucal ou sistêmica (MARTINS et al., 2013), é um dos principais agentes de infecção, e sua importância também está relacionada com mecanismos de virulência e capacidade de resistir à ação de antimicrobianos e antissépticos, além da rápida disseminação entre pessoas e em diversos ambientes (CRUZ et al., 2011).

Já as bactérias do tipo bastão, gram-negativos, como a *Escherichia coli*, típica do trato intestinal, mas que também é muito comum na cavidade oral, principalmente de indivíduos que vivem em condições precárias de higiene, podem ter além de complicações na boca, transtornos intestinais, como cólicas e diarreias, que podem levar a óbito caso não sejam combatidas a tempo (INST. BARBOSA ODONTOLOGIA, 2017).

Tendo em vista tais relevâncias, para o controle destas patologias, diversos métodos mecânicos e químicos vêm sendo propostos. O método mecânico é o mais simples e mais prático, sendo este a escovação e o uso do fio dental, porém nem sempre é eficaz devido ao uso inadequado destes por conta do paciente. Sendo assim o método químico, ou seja, a utilização de substâncias diversas vem sendo utilizado de forma auxiliar ao processo mecânico em uma tentativa de reverter o processo e o início de patologias (MOREIRA et al., 2009). Um dos métodos mais utilizados no processo químico é o uso de antissépticos bucais, na tentativa de manter a homeostase entre microbiota natural e patogênica, estas substâncias são incorporadas em soluções para bochechos sendo os enxaguantes bucais os meios mais simples para veiculação destas substâncias antissépticas (TORRES et al., 2000).

Um antisséptico ideal inclui propriedades específicas como: ser letal em baixas concentrações, ausência de toxicidade, poder bactericida e poder de penetração. São variadas as substâncias utilizadas com ação antimicrobiana sob a

forma de enxaguantes bucais dentre elas pode-se citar: timol, clorexidina, cloreto de cetilpiridino, triclosan, e outras (MOREIRA et al., 2009).

A diversidade de soluções hoje disponíveis no mercado dificulta o conhecimento e confunde os profissionais no momento da prescrição. A facilidade de acesso e o uso indiscriminado gera também risco a saúde. Portanto há a necessidade em se conhecer as opções destinadas ao uso bucal de boa procedência, evitando assim que sejam comercializadas apenas para fins meramente comerciais ou como artigo de perfumaria (TAVARES, MARTINEZ, GISSONI, 2008).

Portanto, o objetivo deste estudo é avaliar '*in vitro*' a atividade antimicrobiana de antissépticos bucais comercialmente disponíveis.

MATERIAL E MÉTODOS

Nesta pesquisa realizaram-se ensaios '*in vitro*' da atividade antimicrobiana de antissépticos bucais. O material deste estudo constitui-se de antissépticos bucais comercialmente disponíveis em uma distribuidora de produtos odontológicos da cidade de Ourinhos, São Paulo. Foram selecionados todos antissépticos comercializados pela empresa, sendo que esta fez a seleção levando em consideração os ativos mais prescritos pelos cirurgiões dentistas da cidade. Foram analisados cinco tipos de antissépticos, e sua identificação foi realizada segundo seu princípio ativo e sua marca comercial conforme listados no Quadro 1:

Quadro 1. Antissépticos e Princípio Ativo

Antissépticos – P.A.	Nome Comercial
Digluconato de Clorexidina 0,12%	Periogard®
Fluoreto de Sódio + Cloreto de Cetilpiridino	Oral B®
Timol + Álcool	Listerine®
Timol Keywords Triclosan + Fluoreto de Sódio	Listerine Zero® Plax®

Todos os produtos foram analisados somente quanto a sua atividade antimicrobiana, sem diluição conforme indicação do fabricante, e desconsiderando qualquer outra característica do produto.

Os antissépticos foram analisados com culturas de *Staphylococcus aureus* ATCC – 6538 e *Escherichia coli* ATCC 25922, disponibilizados pelo laboratório de microbiologia das FIO (Faculdades Integrada de Ourinhos).

O procedimento técnico trata-se do teste de sensibilidade aos antimicrobianos, teste por difusão em disco, metodologia de acordo com os critérios estabelecidos no documento do M100-S18 (CLSI, 2008).

A técnica iniciou-se com a padronização da quantidade de amostra e posteriormente a aplicação de todos antissépticos a serem testados.

Padronização da quantidade de amostra

Retirou-se as placas e os frascos com os discos da geladeira cerca de 20-30 minutos antes do início do procedimento, para que chegassem a temperatura ambiente antes da execução da prova.

Com uma alça bacteriológica em platina devidamente flambada e resfriada, tocou-se na colônia de *Staphylococcus aureus*, suspendeu-se as colônias em solução salina estéril (NaCl 0,85%) até que se se obteve uma turvação compatível com o grau 0,5 da escala Mac Farland (1×10^6 UFC/mL). Para este passo foi utilizado um tubo aferido na escala 0,5 de Mac Farland como comparativo, Figura 1. Posteriormente, embebeu-se um swab estéril na suspensão bacteriana, comprimindo-o contra as paredes do tubo para tirar o excesso da suspensão, e semeou-se de forma suave em todas as direções na placa de meio Muller Hinton, procurando abranger toda a superfície. Aguardou-se, por 10 minutos, a superfície do ágar secar.

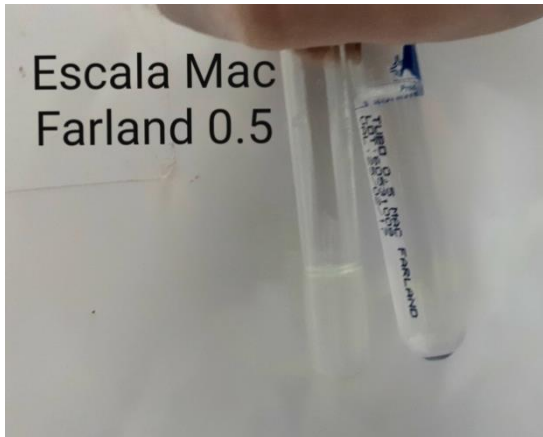
Na câmara de fluxo laminar, em uma placa de vidro, devidamente esterilizada, os discos foram dispostos de forma a não se tocarem, a cada disco foi aplicado uma quantidade escolhida aleatoriamente do antisséptico Periogard® (15uL, 10uL, 5uL e 2uL), esperou-se por cerca de 2 minutos os discos secarem.

Com auxílio de uma pinça flambada e resfriada, colocou-se os discos, sobre a superfície do meio inoculado, exercendo uma leve pressão com a ponta da pinça para uma boa adesão dos discos, Figura 2.

Incubou-se a placa com os discos em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas.

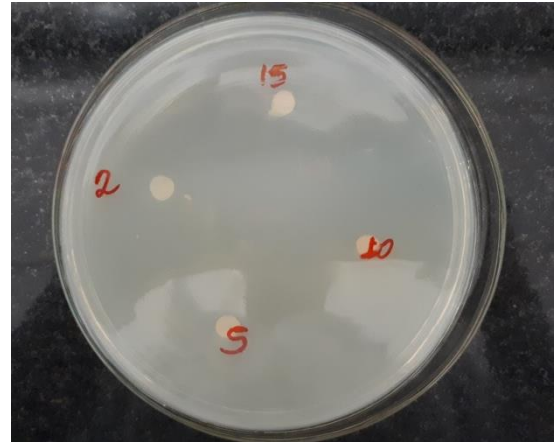
Verificou-se, através da formação de halos, a melhor quantidade para continuidade dos testes.

Figura 1 - Escala de Mac Farland



Fonte: Autora

Figura 2 - Aplicação dos discos em meio inoculado



Fonte: Autora

Aplicação das amostras

Realizou-se o mesmo procedimento anterior, diferenciando-se somente na aplicação final das amostras.

Depois de preparado o inoculo e semeadura nas placas, na câmara de fluxo laminar, em uma placa de vidro, devidamente esterilizada, os discos foram dispostos de forma a não se tocarem, a cada disco foi aplicado 10uL e 15uL respectivamente de cada amostra, aguardou-se por cerca de 2 minutos os discos secarem, Figura 3.

Com auxílio de uma pinça flambada e resfriada, colocou-se os discos, sobre a superfície do meio inoculado, exercendo uma leve pressão com a ponta da pinça para uma boa adesão dos discos, em uma placa foram adicionados todas as amostras com a quantidade de 10uL, e em outra placa todas as amostras com a quantidade de 15uL, Figura 4.

Incubou-se a placa com os discos em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas.

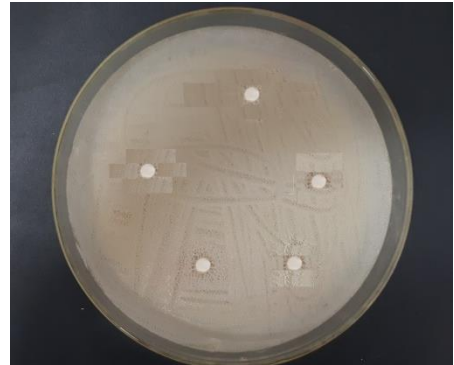
O procedimento foi realizado do mesmo modo para as duas colônias de cepas a serem utilizadas no procedimento, *Staphylococcus aureus* ATCC – 6538 e *Escherichia coli* ATCC - 25922.

Figura 3 - Aplicação de todas as amostras, nas concentrações de 10uL e 15 uL.



Fonte: Autora

Figura 4 - Disposição dos discos embebidos das amostras



Fonte: Autora

Leitura das Placas

Após período de incubação das placas, a leitura foi feita com auxílio de uma régua, anotando e observando a formação de halos de inibição do crescimento bacteriano, que quando presentes indicarão a atividade bacteriostática e bactericida dos antissépticos.

Os resultados foram demonstrados através da média do diâmetro dos halos de inibição de crescimento formados em volta do disco.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos na padronização da quantidade de amostra estão demonstrados na Figura 5. São visualizados os aspectos de crescimento bacteriano e os halos de inibição referentes ao Periogard® (clorexidina 0,12%) nas concentrações de 15uL, 10uL, 5uL e 2uL contra *S. aureus*. Em todas as concentrações testadas, os halos de inibição variaram de maneira semelhante nas concentrações propostas, sendo a medida destes 1,6cm, 1,4cm, 1,5cm e 1,5cm respectivamente. Portanto de forma aleatória, padronizou-se a quantidade de 10uL e 15uL para prosseguimento das análises.

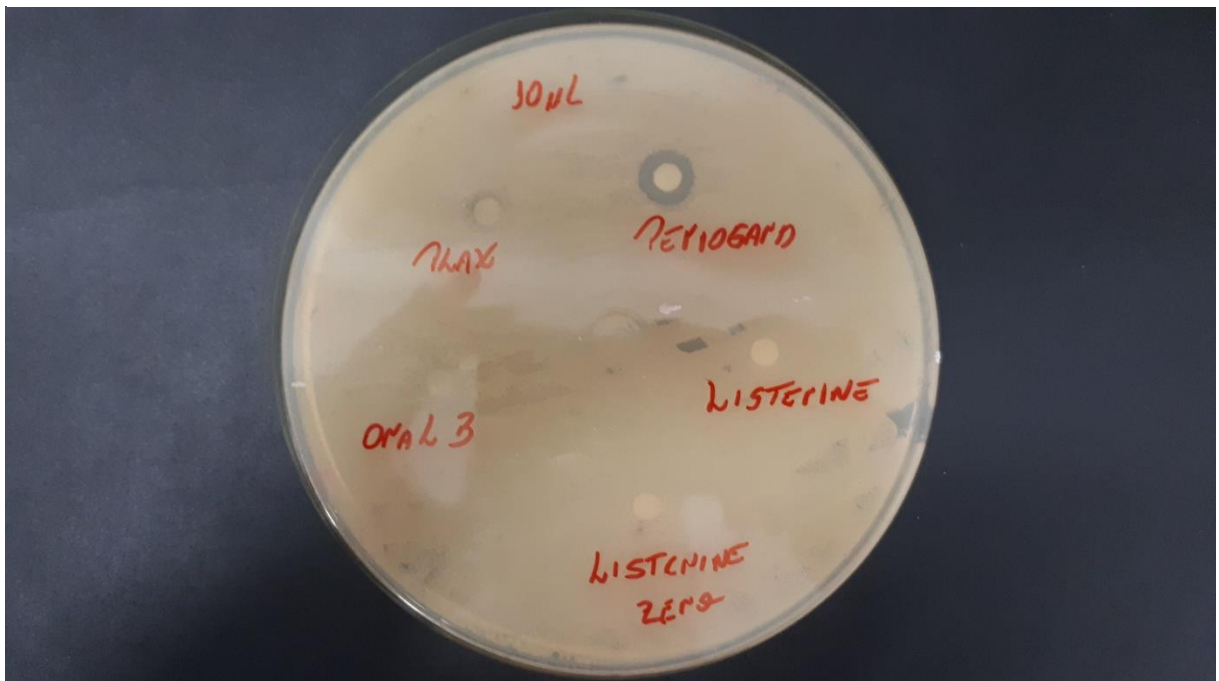
Figura 5 - Inibição bacteriana para padronização



Fonte: Autora

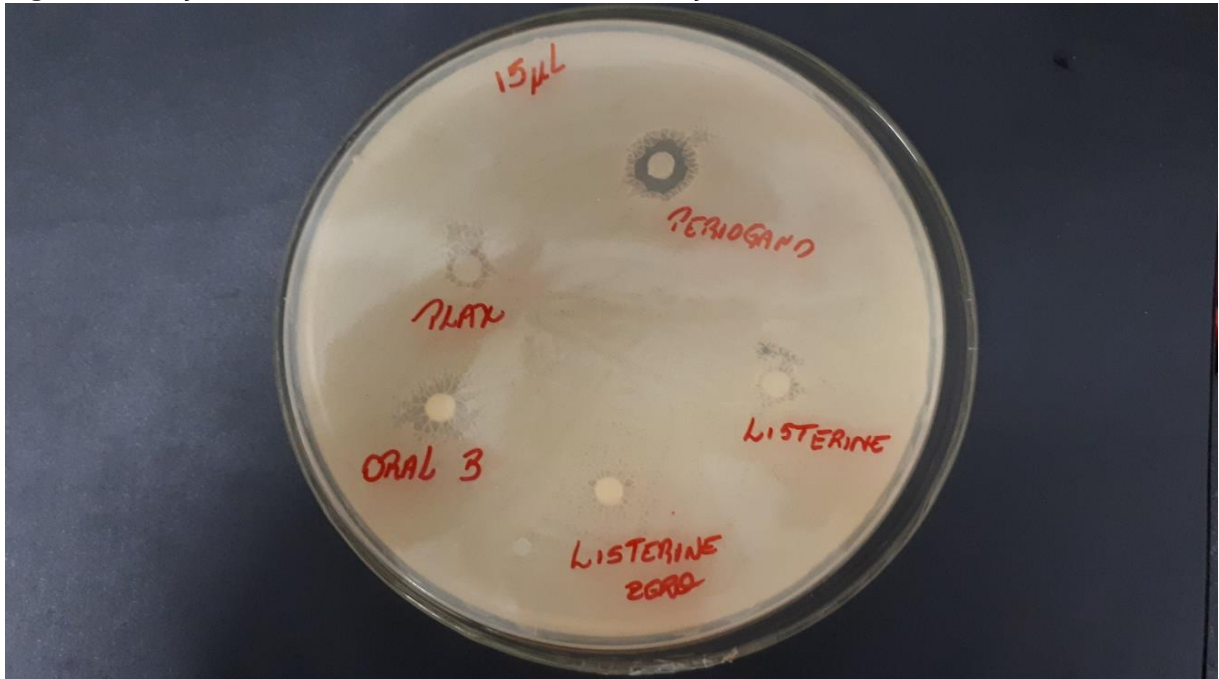
Avaliando-se a atividade dos princípios ativos componentes dos enxaguatórios sobre *S. aureus*, exibiram atividade de ação inibitória somente o Periogard® (clorexidina 0,12%) nas duas concentrações testadas (10uL e 15uL) conforme mostra a Figura 6 e 7.

Figura 6- Inibição bacteriana de *S. aureus*, em concentração de 10uL.



Fonte: Autora

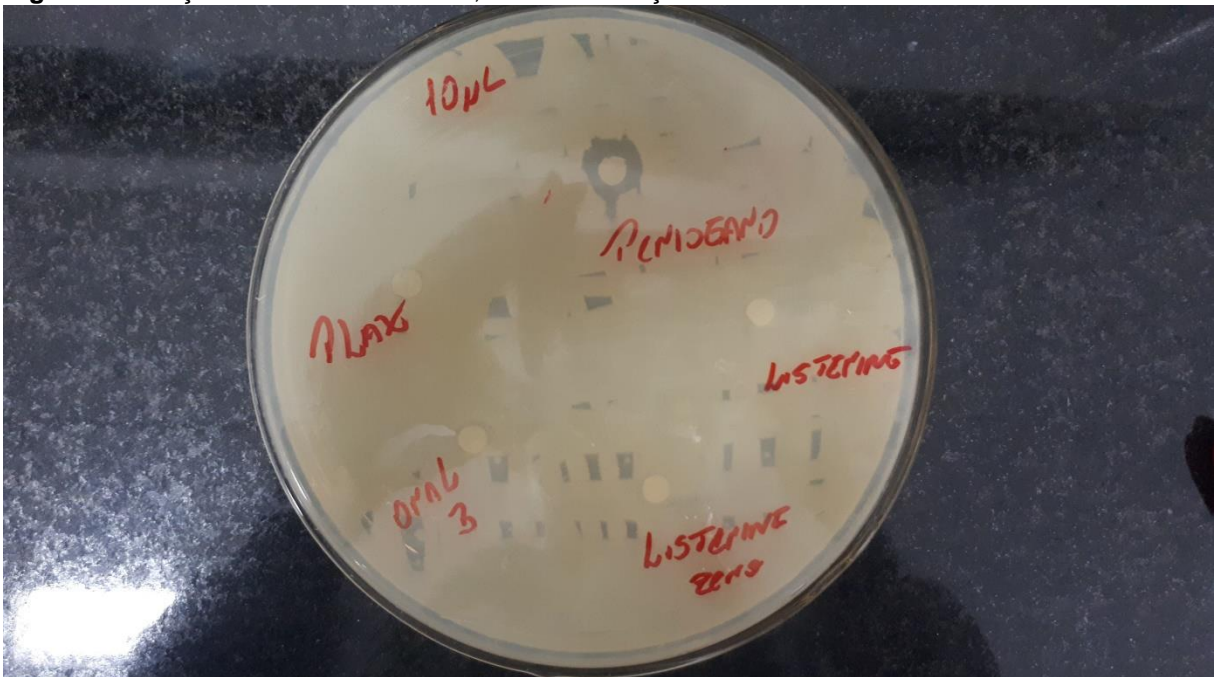
Figura 7 - Inibição bacteriana de *S. aureus*, em concentração de 15µL.



Fonte: Autora

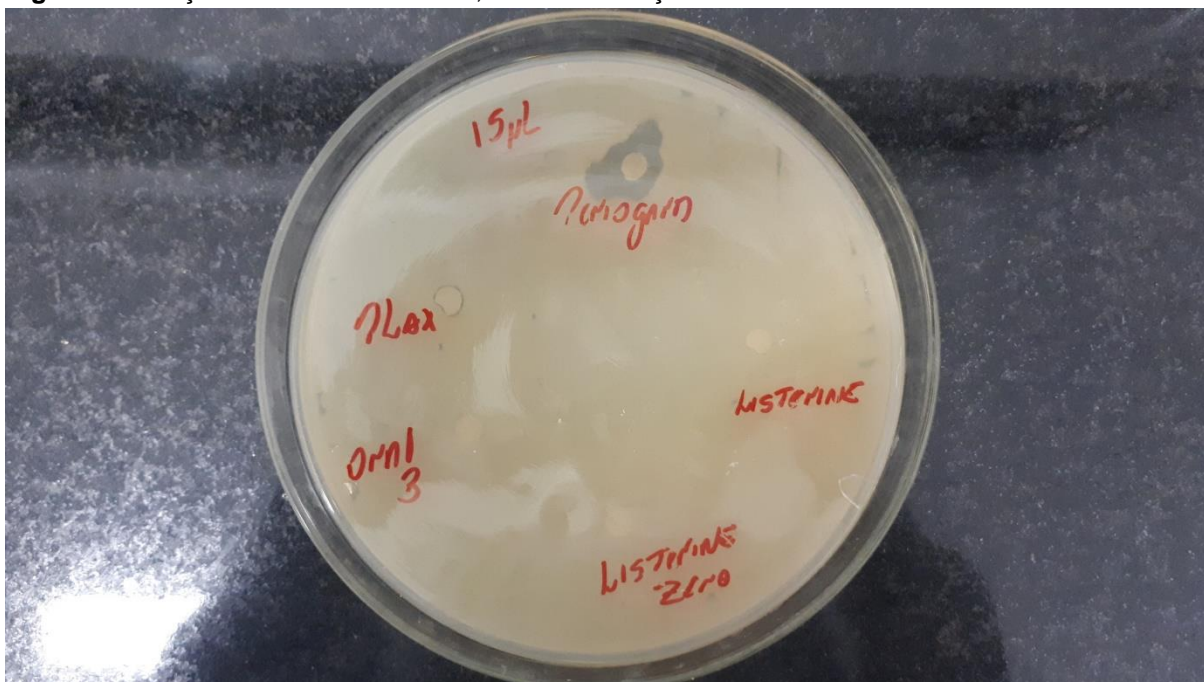
Sobre a bactéria *Escherichia coli*, os resultados obtidos foram equivalentes, apresentando atividade de ação inibitória somente o enxaguante Periogard® (clorexidina 0,12%) nas mesmas concentrações apresentadas anteriormente conforme Figura 8 e 9.

Figura 8 - Inibição bacteriana de *E. coli*, em concentração de 10µL.



Fonte: Autora

Figura 9 - Inibição bacteriana de *E. coli*, em concentração de 15uL.



Fonte: Autora

De acordo com Moreira et al. (2009), os estudos sobre a eficácia de antissépticos bucais são poucos divulgados, dificultando a visão dos profissionais que acabam levando em consideração apenas as informações veiculadas pelos fabricantes, por tal razão é de suma importância à realização de testes *'in vitro'* para confirmar a sua efetividade, possibilitando a melhor escolha do produto a ser prescrito.

Para padronização da quantidade de amostra a ser utilizada por este estudo, o antisséptico escolhido foi o Periogard® como referencia, levando em conta que de acordo com os estudos realizados e como descritos por MOREIRA et al. (2009), a clorexidina é utilizada como controle positivo na maioria dos estudos sobre substâncias antimicrobianas bucais, por ser considerado um agente químico substitutivo e não apenas como coadjuvante ao controle mecânico do biofilme dental.

Já quanto ação antimicrobiana dos antissépticos propostos por este estudo frente às bactérias *S. aureus* e *E. coli*, apenas o Periogard® (clorexidina 0,12%) apresentou eficácia antimicrobiana, sendo que todos demais, Listerine® (timol), Listerine Zero® (timol), Oral B® (Fluoreto de sódio + Cloreto de Cetilperidino) e Plax® (Fluoreto de sódio + Triclosan) não apresentaram qualquer atividade antimicrobiana em nenhuma das concentrações analisadas. Resultados que

condizem com o estudo feito por MOREIRA et al. (2009), onde a clorexidina demonstrou as maiores zonas de inibição frente a todos os microrganismos testados. Este resultado também concorda com outros estudos que avaliaram o efeito antimicrobiano de antissépticos.

Ainda segundo Bonan e colaboradores (2011) o digluconato de clorexidina, presente no Periogard® é uma bisguanida catiônica, que tem sido amplamente utilizada em periodontia, como enxaguatório bucal, na prevenção de cáries e como agente terapêutico para infecções orais em geral, devido sua atividade antimicrobiana, além disso, apresenta amplo espectro de ação, possuindo forte atuação contra grande número de microrganismos gram positivas e gram negativas, leveduras, anaeróbios facultativos e aeróbios.

Contudo, segundo Torres et al. (2000) embora esta substância seja um excelente antimicrobiano, devido a seus efeitos colaterais, não é recomendado o seu uso prolongado. Daí a necessidade de serem desenvolvidas substâncias tão efetivas quanto, mas sem os seus efeitos colaterais. Dentre os efeitos adversos relatados com o uso prolongado da clorexidina podemos citar a descoloração dos dentes, descamação reversível da mucosa, alterações do paladar e aumento dos depósitos calcificados supra gengivais.

Os óleos essenciais, como timol, constituem os princípios ativos do Listerine®. São compostos fenólicos que agem contra as bactérias rompendo a parede celular ou inibindo a ação enzimática. Os resultados avaliados neste estudo indicam concordância com os feitos por MOREIRA et al. (2009), que também não obtiveram atividade antibacteriana em nenhum dos microrganismos testados. Justificando-se tal ausência de eficácia, pela técnica de difusão em Ágar, e tal fenômeno depende das propriedades físico-químicas do produto e do meio de cultura, estando à ausência da formação de halos de inibição ligada ao grau de difusão do antisséptico Listerine® em ágar, e não estando obrigatoriamente relacionada à ausência de atividade antimicrobiana.

Para Tavares e colaboradores (2008) o cloreto de cetilpiridínio, ativo encontrado no antisséptico Oral B® é um composto monovalente catiônico pertencente ao grupo quaternário da amônia, sua afinidade pelos fosfatos de carga negativa presentes nas paredes celulares de bactérias permite rompê-las. Demonstra ser eficaz contra microrganismos gram positivos, mas é relativamente ineficaz contra gram negativos e microrganismos anaeróbio, no entanto, seu caráter

bacteriostático, bactericida e/ou fungicida dependerá da concentração empregada, sendo assim, a concentração aplicada a este estudo, não foi efetivamente a concentração necessária para que haja inibição do crescimento bacteriano, não afirmando que o mesmo não possua ação antimicrobiana.

O ativo Triclosan, presente no Plax® tem sua ação baseada na desorganização da membrana celular e inibição inespecífica de enzimas da membrana. Ele possui amplo espectro antimicrobiano, com atividade contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos. *In vivo*, a eficácia antiplaca e absorção do triclosan sozinho são limitadas (TORRES et al., 2000), sendo assim condizentes com os resultados relatos por este estudo.

CONCLUSÕES

De acordo com a metodologia aplicada a este estudo, foi possível avaliar '*in vitro*' a atividade antimicrobiana dos antissépticos propostos, sendo que os resultados sugerem que, dentre os componentes analisados, apenas a clorexidina 0,12% presente no Periogard® apresentou eficácia antimicrobiana frente às bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Os demais ativos presentes em marcas de referência no mercado não esboçaram qualquer ação antibacteriana nas concentrações utilizadas frente a estas bactérias, contudo sugere-se a realização de novos ensaios utilizando-se metodologias diferentes a deste estudo para reavaliar tais ações.

Levando em consideração todo levantamento de dados desta pesquisa, pode-se concluir que os antissépticos bucais podem ser utilizados como método auxiliar ao método mecânico, quando necessários, adicionalmente auxiliando na higiene e saúde bucal, contudo seu uso indiscriminado pode causar desequilíbrio na flora bucal estimulando a multiplicação de microrganismos naturais ou colonização de outros patogênicos, portanto se faz necessário o conhecimento dos ativos por parte dos cirurgiões dentistas para a prescrição correta e a racionalidade no uso por parte do paciente.

REFERÊNCIAS

BONAN, R. F., BATISTA, A. U. D., HUSSNE, R. P. Comparação do uso de hipoclorito de sódio e da Clorexidina como solução irrigadora no tratamento endodôntico – Revisão da Literatura. **Rev. Brasileira de Ciências da Saúde**. v.15, n.2, p. 237-244, 2011.

CLSI. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Padronização dos testes de sensibilidade a antimicrobianos por disco-difusão: norma aprovada, 2008. Disponível em URL:

<http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/clsi/clsi_opasm2-a8.pdf>. Acesso em 25 ago. 2018.

CRUZ, E. D. A. et al. Detecção de *Staphylococcus aureus* na boca de trabalhadores da limpeza hospitalar. **Rev. Latino-Am Enfermagem**. v.19, n.10, p. 10-16, 2011.

INSTITUTO BARBOSA ODONTOLOGIA. Quais os tipos de bactérias bucais existentes e como eliminar as que fazem mal para saúde? São Paulo, 2017. Disponível em URL: <institutobarbosa.com.br/quais-os-tipos-de-bacterias-bucais-existentis-e-como-eliminar-as-que-fazem-mal-para-a-saude/>. Acesso em 25 ago 2018.

MARTINS, J. R. et al. Presença de *Staphylococcus aureus* em diferentes superfícies do ambiente clínico odontológico. **Rev. Fasem Ciências**. v.3, n.1, p.92-99, 2013.

MOREIRA, A. C. A. et. al. Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de antissépticos bucais. **Rev. Ci. Med. Bio**. v.8, n.2, p.153-161, 2009.

SANTANNA, R. S.; CERQUEIRA, A. M. F. **Bacteriologia e Nutrição**. Universidade Federal de Fluminense, 2007. (Apostila)

SILVEIRA, I. R. et. al. Higiene bucal: prática relevante na prevenção de pneumonia hospitalar em pacientes em estado crítico. **Rev. Acta Paul Enferm**. v.23, n.5, p.697-700, 2009.

TAVARES, E.; MARTINEZ, H.; GISSONI, M. Soluções químicas para uso tópico bucal – classificação e advertências. **Rev. Bras. Odontol**. v.65, n.1, jan./jun. p.36-41, 2008.

TORRES, C. R. G. et. al. Agentes antimicrobianos e seu potencial de uso na Odontologia. **Pós-grad. Fac. Odontol. São José dos Campos**. v.3, n.2, p.43-52, 2000.