

# Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de enxaguatórios bucais

*In vitro evaluation of antimicrobial activity of mouthrinses*

**Renato César Sanzer Simões**

**Sabrina Pulzatto Merlini**

Especialistas em Saúde Coletiva pelo Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da USP (HRAC/USP - Bauru)

**Ricardo Pianta Rodrigues da Silva**

Doutorando em Saúde Coletiva pela FO de Bauru da FOB/USP

Professor do Curso de Medicina da Faculdade São Lucas (RO)

**Roosevelt da Silva Bastos**

Professor Doutor do Departamento de Odontopediatria, Ortodontia e Saúde Coletiva da FOB/USP - Bauru

**Sergio Aparecido Torres**

Professor Doutor do Departamento de Ciências Biológicas da FOB/USP - Bauru

**José Roberto de Magalhães Bastos**

Professor Titular do Departamento de Odontopediatria, Ortodontia e Saúde Coletiva da FOB/USP - Bauru

## RESUMO

O potencial antimicrobiano dos seguintes enxaguatórios bucais: Periogard®, Plax®, Oral-B®, Flogoral® e Listerine® foram avaliados *in vitro*, frente às seguintes cepas: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Cândida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Enterococcus faecalis*, por meio do método de difusão em Agar Muller Hinton, o qual foi distribuído em alíquotas de 25 ml, em placas de Pétri estéreis. Cinco discos de papel filtro foram colocados em pontos equidistantes e foram embebidos com 20 µl dos enxaguatórios testados. As leituras dos halos foram realizadas após 48 horas. Os melhores resultados médios foram obtidos pelo Periogard® e pelo Plax®.

**Palavras-chave:** anti-infecciosos bucais; placa dentária.

## ABSTRACT

The potential antimicrobial of different mouthrinses: Periogard®, Plax®, Oral-B®, Flogoral® e Listerine® were evaluated *in vitro*, using the following strains: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Enterococcus faecalis*, by diffusion in Müller Hinton agar, which was distributed in 25 ml aliquots on sterile Petri plates. Five discs of filter paper were placed in points at similar distances and were soaked with 20 µl of each mouthrinses tested. The reading of inhibition halos was performed after 48 hours. The best mean results were Periogard®, Plax®.

**Keywords:** anti-infective agents, local; dental plaque.

## Introdução

Nos últimos 30 anos a placa bacteriana foi apontada como importante fator etiológico da doença periodontal e da cárie dentária. A placa bacteriana ou biofilme pode causar alterações de maior ou menor intensidade, em função da susceptibilidade e informação genética de cada indivíduo (4). Embora a higienização bucal consiga desestruturar a placa bacteriana, geralmente não é suficiente para eliminá-la em lugares inacessíveis à escovação e ao fio dental (10). Em pacientes internados, pós-cirúrgicos, fissurados labiopalatais e pacientes em tratamento ortodôntico, a dificuldade de higienização é notória e a grande necessidade de um efetivo controle da placa bacteriana por um agente químico motivou uma série de estudos nos últimos anos (1, 11).

As características ideais para um antisséptico são: ser um germicida potente e letal em baixas concentrações. Ter ação rápida ou lenta e possuir um espectro bacteriano amplo ou pequeno. Deve ser estável e não ser inativado pelas células do organismo, líquidos orgânicos ou exudatos das infecções. É desejável uma baixa tensão superficial para penetrar quando for aplicado topicamente, porém, não deve ser suficientemente absorvido pelos tecidos a ponto de causar toxicidade sistêmica. Deve possuir também um bom índice terapêutico e não deve induzir a hipersensibilidade quando for repetidamente aplicado (2).

## Agentes Fenólicos

Os agentes fenólicos foram propostos por Joseph Lister, em 1865, para a assepsia da cavidade bucal. Em 1990, KATO, IJIMA, ISHIHARA et al. (6) mostraram em suas pesquisas que o Listerine® exibiu um potente efeito bactericida na saliva e na placa dental. A maioria das bactérias morreu após 30 segundos de exposição. Segundo MENDES, ZENÓBIO, PEREIRA (7), os óleos essenciais devem ser aplicados através de bochechos de 30 segundos, duas vezes ao dia, o que levou a uma diminuição da placa bacteriana de 20 a 34%. Quanto às características indesejáveis, estão: a possibilidade de levar a sensação de queimação, o gosto desagradável e o seu alto teor de álcool, que pode contribuir para injúrias à mucosa bucal. De acordo com MONFRIN & RIBEIRO (8), o Listerine® destrói as principais bactérias patogênicas em 30 segundos e inibe o desenvolvimento da placa bacteriana e da gengivite.

## Compostos Quaternários de Amônia

O cloreto de cetilperidíneo é um detergente catiônico cujo modo de ação sobre a placa bacteriana é similar ao da clorexidina (5, 8). Segundo GRANJERO, CARVALHO, BASTOS et al. (5), o cloreto de cetilperidíneo reduz significativamente o índice da placa bacteriana, porém não atua na gengivite estabelecida. As desvantagens do cloreto de cetilperidíneo são a rápida liberação dos sítios de ligação, neutralização por anions e proporcionar aumento no conteúdo de cálcio e fósforo da placa bacteriana. O uso prolongado destes enxaguatórios causa sensação de queimação, descoloração dos dentes e língua, ulceração recorrente da mucosa e aumento na formação de tártaro (7).

## Sais Metálicos, Antibióticos e Outros Agentes

O Flogoral® é um medicamento à base de benzidamina, que é um derivado do indazol e segundo o fabricante apresenta ação anestésica e histoprotetora, possuindo propriedades contra a inflamação e dor, estimulando a cicatrização e acelerando a recuperação dos tecidos lesados localizados na boca e garganta (8).

MARTINDALE (1977) *apud* MONFRIN & RIBEIRO (8) diz que o Flogoral® pode ser usado topicamente na pele, em bochechos ou em spray diretamente na cavidade bucal, sendo indicado nos casos de aftas, glossites, estomatites e gengivites de diferentes etiologias, assim como auxiliar nos tratamentos extrativos e também de hipersensibilidade da dentina.

### Triclosan

O triclosan é um derivado fenol (2,4,4-tricloro-2-hidro-xifenil) que tem sido adicionado em soluções para bochechos e cremes dentais (4).

É um antisséptico sintético, não iônico de baixa toxicidade com largo espectro e ação anti-inflamatória (4, 7, 13). Um estudo de CHUJFI, SILVA, SABA *et al.* (4) descreve as seguintes propriedades do triclosan: possui amplo espectro sendo eficaz sobre micro-organismos gram positivos e gram negativos, além de ser efetivo contra *Mycobacterium* e principalmente bactérias anaeróbias, atuando também em esporos e leveduras da espécie *Cândida*. Sua toxicidade é baixa, sendo tolerada 200mg/kg/dia. O triclosan atua sobre a membrana citoplasmática dos micro-organismos, promovendo sua lise. De acordo com MENDES, ZENÓBIO, PEREIRA *et al.* (7), duas estratégias têm sido desenvolvidas para melhorar a eficácia clínica do triclosan: a combinação com citrato de zinco para potencializar suas propriedades e a incorporação de um copolímero Gantrez para aumentar seu tempo de retenção. A incorporação do copolímero Gantrez à fórmula do triclosan permitiu um aumento da substância, possibilitando que o triclosan permaneça por mais tempo na cavidade bucal (4, 9, 12, 13).

### Clorexidina

É uma bisguanidina catiônica disponível na forma de sais de glucanato, diglucanato e acetato, sendo o diglucanato o mais indicado por possuir a maior solubilidade em água e em pH fisiológico dissocia-se liberando o agente catiônico. Apresenta alta substantividade, podendo ficar retida na cavidade bucal por, aproximadamente, 12 horas. Possui amplo espectro de ação, sendo também fungicida (1, 7, 8). Leva à diminuição significativa da placa bacteriana, por alterar a aderência microbiana, aumentando a permeabilidade celular e o consequente rompimento da bactéria ou coagulação e precipitação dos componentes citoplasmáticos (7). A utilização de produtos que contenham clorexidina a 0,12% são os mais indicados, pois esta concentração diminui os efeitos adversos das soluções mais concentradas e mantém a eficácia contra os micro-organismos (7, 8).

## Material e Método

Para avaliar a atividade antimicrobiana dos enxaguatórios bucais, foi empregada a técnica de difusão em agar Müller Hinton (OXOID - Basingstoke Hampshire, England), o qual foi distribuído em alíquotas de 25 mL, em placas de Petri estéreis de 20 x 100 mm. Após a geleificação, as placas foram levadas à estufa a 37° C, por 24 horas, para o teste de esterilidade. Cinco discos de papel de filtro de 6 mm de diâmetro foram colocados em pontos equidistantes, e as substâncias a serem testadas foram padronizadas em um volume de 20 µL, sendo feito em quadruplicatas.

Inicialmente, foi feita a reativação do micro-organismo para a verificação das morfologias celular e colonial que confirmaram a pureza das amostras bacterianas. As bactérias foram reativadas por três transferências em caldo Müller Hinton (DIFCO - Basingstoke Hampshire, England), seguido de incubação a temperatura de 37° C, por 24 horas. Para o inóculo, a cultura em caldo MH, incubada a 37° C por um período de 15h a 18h em média, foi utilizada para padronizar a concentração final de 150 milhões/mL (escala 0,5 de MacFarland), através do espectrofotômetro (Pharmacia biotech, Brasil).

O experimento foi realizado contra as seguintes cepas padrão: *Enterococcus faecalis* ATCC 2921; *Candida albicans* ATCC 10231; *Escherichia coli* ATCC 25922; *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Foi avaliada a atividade antimicrobiana dos seguintes enxaguatórios: Periogard® (Colgate Palmolive); Flogoral® (Aché); Listerine® (Johnson & Johnson); Oral-B® (Gilete do Brasil) e Plax® (Colgate Palmolive).

A seguir as placas foram incubadas a temperatura de 37°C por 24 a 48 horas. Após as 24 horas iniciais, foram medidos os halos de difusão e inibição ao redor dos discos de papel de filtro. Essas retornaram à estufa e, após 48 horas, novas mensurações foram feitas. Alíquotas de 10,0 mL de gel de Trifeniltetrazólico clorado-TTC (SIGMA- Saint Louis MO, USA), preparado com 1% de ágar e 0,05% de TTC, foram distribuídas nas placas com inóculo bacteriano. Após a geleificação foram novamente incubados a temperatura de 37° C, por 30 minutos para otimização na leitura dos halos de inibição.

## Resultados

Os resultados apresentados referem-se aqueles considerados na leitura de 48 horas. As médias das medidas dos diâmetros dos halos de inibição referem-se aos enxaguatórios frente aos diferentes micro-organismos apresentados na Tabela I.



**Tabela I. Média das medidas em milímetros dos halos de inibição**

Enxaguatórios	Micro-organismos					
	Pa	Ec	Ca	Sa	Se	Ef
Periogard	10,4	18,4	28,5	22,0	32,0	12,5
Flogoral	-	-	-	-	-	-
Listerine	-	-	-	-	-	-
Oral-B	9,0	-	22,0	10,5	17,0	11,0
Plax	9,0	29,0	17,5	46,0	35,0	8,0

**Legenda:** Pa-*Pseudomonas aeruginosa*; Ec-*Escherichia coli*; Ca-*Candida albicans*; Sa-*Staphylococcus aureus*; Se-*Staphylococcus epidermidis*; Ef- *Enterococcus faecalis*.

O Plax® e o Periogard® apresentaram atividade antimicrobiana frente a todas as cepas testadas, fato confirmado pelos halos de inibição. O Oral-B® somente não foi capaz de inibir o crescimento da cepa da *Escherichia coli*. O Flogoral® e o Listerine® não apresentaram atividade antimicrobiana frente a nenhuma das cepas testadas.

## Discussão

O presente estudo laboratorial foi realizado adotando-se o método de difusão para verificar atividade antimicrobiana de alguns enxaguatórios bucais. Foram utilizados filtros de papel filtro embebidos em 20 µL das soluções testadas frente às seguintes cepas: *Candida albicans* (Ca), *Pseudomonas aeruginosa* (Pa), *Staphylococcus epidermidis* (Se), *Staphylococcus aureus* (Sa), *Escherichia coli* (Ec) e *Enterococcus faecalis* (Ef). Mesmo que algumas dessas cepas utilizadas não sejam típicas da cavidade bucal, foram utilizados por ser padrão em testes de atividade antimicrobiana. O método utilizado permitiu avaliar a atividade antimicrobiana das soluções utilizadas que possuem composições químicas diferentes. Observando-se a Tabela I, vê-se que apenas três dos cinco produtos testados apresentaram inibição do crescimento bacteriano. A diferença nos halos de inibição provavelmente está relacionada à diferente composição química dos enxaguatórios testados.

Em 2000, MONFRIN e RIBEIRO (8) realizaram um estudo *in vitro* para avaliar a eficácia de vários antissépticos bucais na redução da microbiota da saliva. Os antissépticos avaliados foram: Kolynos®, Oral-B®, Cepacol®, Periogard®, Flogoral®, Malvatricim®, Fluordent®, Wash®, Plax® e Listerine®. Os resultados mostraram que o Periogard® se apresentou eficaz na redução da microbiota da saliva e que os antissépticos Listerine® e Flogoral® mostraram ser ineficaz com relação à atividade antimicrobiana. Fato semelhante ao encontrado neste estudo.

Em 2004, SILVA, CARLINI, KUSMA (11) avaliaram *in vivo* a ação da clorexidina e do triclosan como auxiliares no controle da microbiota bucal em pacientes ortodônticos, cirúrgicos e fissurados lábio palatais. Os autores constataram

uma redução significativa da microbiota frente à clorexidina quando comparada ao triclosan. Em nosso estudo a clorexidina (Periogard®), mostrou-se tão eficaz quanto o Plax®, que possui em sua composição o triclosan, porém o nosso estudo foi *in vitro*.

O principal componente do Periogard® é o diglucanato de clorexidina a 0,12% que se mostrou capaz de inibir o crescimento bacteriano em todos os inóculos testados. O Periogard® no estudo referido não provocou halo de inibição frente ao *Pseudomonas aeruginosa*, mas em nosso estudo houve atividade antimicrobiana frente a essa cepa como apontado na Tabela I, porém, foram os menores halos obtidos por esse enxaguatório. Presume-se que este resultado tenha sido obtido devido à diferença metodológica dos estudos, onde CASTRO, MARDEGAN, BANDEIRA *et al.* (3) utilizaram 10 µL da solução e em nosso estudo utilizamos 20 µL.

O Plax® apresenta como seu principal componente o triclosan-gantrez. Pelo estudo realizado, o Plax® também inibiu o crescimento bacteriano em todos os inóculos testados obtendo resultados muito semelhantes ao do Periogard®.

O enxaguatório da Oral-B® apresenta em sua composição o cloreto de cetil peridíneo. Pelos testes realizados o enxaguatório da Oral-B® só não inibiu o crescimento bacteriano frente à cepa *Escherichia coli*, conseguindo inibir o crescimento bacteriano no restante dos inóculos testados. Esse resultado vai de encontro com o estudo de CASTRO, MARDEGAN, BANDEIRA *et al.* (3), onde testando um produto também à base de cloreto de cetil peridíneo, este só não inibiu o crescimento da cepa *Escherichia coli*.

Os principais componentes do Listerine® são o timol, eucaliptol e o mentol. Os resultados obtidos pelo Listerine® neste estudo mostraram que esse enxaguatório não conseguiu inibir o crescimento bacteriano em nenhum inóculo testado, assim como no estudo feito por CASTRO, MARDEGAN, BANDEIRA *et al.* (3), o Listerine® também não apresentou halos de inibição. Os autores relacionam a falta de inibição ao fato do Listerine® possuir óleos essenciais em sua composição o que dificultaria a sua difusão no agar, o que não significa que esse enxaguatório não apresente atividade antimicrobiana quando utilizado *in vivo*.

O principal componente do Flogoral® é o cloreto de ben-zidamida, que é um derivado do indazol (7). Nos testes realizados nesse estudo, o Flogoral® não conseguiu inibir o crescimento bacteriano em nenhum inóculo testado.

## Conclusão

Pelo presente estudo podemos concluir que:

Os enxaguatórios testados apresentam diferentes potenciais antimicrobianos nos testes *in vitro*.

Os enxaguatórios Periogard® e Plax® apresentaram maior potencial de inibição do crescimento bacteriano.

O enxaguatório da Oral-B® apresentou atividade antibacteriana intermediária.

Os enxaguatórios Listerine® e Flogoral® não apresentaram nenhuma inibição nos micro-organismos testados pelo método de difusão em agar, necessitando outros estudos para comprovar sua eficácia *in vitro*.

## Referências Bibliográficas

1. BARALDI, V. *et al.* O uso da clorexidina no pré e pós-operatório em cirurgia buco-maxilo-facial. *Rev. Inst. Ciênc. Saúde.* 1998; 16 (2): 123-7.
2. BURNET, G. W., SCHERP, H. W., SCHUSTER, G. S. *Microbiologia oral & doenças infecciosas.* 4. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1978.
3. CASTRO, S. L., MARDEGAN, M. A. S., BANDEIRA, M. E. C. L. *et al.* Avaliação *in vitro* da sensibilidade de microorganismos a anti-sépticos bucais. *J. Bras. Endo/Perio.* 2000; 1 (2): 65-71.
4. CHUJFI, E. S., SILVA, E. C. Q., SABA, M. E. C. *et al.* A eficácia da formulação contendo o anti-séptico triclosan associado ao copolímero gantrez e ao flúor, utilizada através de bochechos para controle da placa bacteriana dentária. *Rev. ABO Nac.* 1998; 6 (3): 164-72.
5. GRANJERO, J. M., CARVALHO, L. E. P., BASTOS, J. R. M. *et al.* O cloreto de cetilperidínio e a placa bacteriana: uma revisão. *Rev. APCD.* 1993; 47 (2): 1019-22.
6. KATO, T., IJIMA, H., ISHIHARA, K. *et al.* Antibacterial effects of Listerine on oral bacteria. *Bull. Tokyo Dent. Coll.* 1990; 31 (4): 301-7.
7. MENDES, M. M. S. G., ZENÓBIO, E. G., PEREIRA, O. L. Agentes químicos para controle de placa bacteriana. *Periodontia.* 1995; 5 (2): 253-6.
8. MONFRIN, R. C. P., RIBEIRO, M. C. Avaliação *in vitro* de anti-sépticos bucais sobre a microbiota da saliva. *Rev. APCD.* 2000; 54 (5): 400-7.
9. PALOMO, F., WANTLAND, L., SANCHEZ, A. *et al.* The effect of a dentifrice containing triclosan and a copolymer on plaque formation and gingivitis: a 14-week clinical study. *Am. J. Den.* 1989; 2 (special number): 231-7.
10. SILVA, F. I. P., ALVES, R. A. A eficácia de três enxaguatórios bucais sobre a placa bacteriana: estudo comparativo. *Rev. ABO Nac.* 2002; 8 (2): 307-11.
11. SILVA, A. A., CARLINI, J. L., KUSMA, S. Z. Controle químico da microflora oral em pacientes fissurados labiopalatais durante o tratamento ortodôntico-cirúrgico: estudo piloto. *Rev. Dent. Press Ortodon. Ortopedi. Facial.* 2004; 9 (3): 116-21.
12. SINGH, S. M., RUSTOGI, K. N., VOLPE, A. R. *et al.* The effect of a dentifrice containing triclosan and a copolymer on plaque formation: a 6 week clinical study. *Am. J. Dent.* 1989; 2 (special number): 225-30.
13. VICTORINO, F. R., SALAZAR, M., ARAÚJO, M. G. Efeito do uso de Ah! kolynos na redução da placa bacteriana. *Rev. Odonto Ciênc.* 2004; 19 (43): 85-9.

Recebido em: 20/02/2009 / Aprovado em: 01/04/2011

Ricardo Pianta Rodrigues da Silva

Rua Alexandre Guimarães, 1927

Porto Velho/RO, Brasil – CEP: 76804-373

E-mail: [pianta@saolucas.edu.br](mailto:pianta@saolucas.edu.br)