

**EFETIVIDADE ANTIMICROBIANA DA
CLOREXIDINA A 0,12% ADQUIRIDA EM
DIFERENTES FARMÁCIAS DE MANIPULAÇÃO DA
REGIÃO DE CUIABÁ-MT. ESTUDO *IN VITRO***

*Tereza Aparecida Delle Vedove Semenoff*¹
*Paula Cristina Araújo*²
*Denise Leda Pedrini*³
*Alex Semenoff Segundo*⁴
*Fábio Luis Miranda Pedro*⁵
*Iussif Mamede Neto*⁶
*Álvaro Henrique Borges*⁷

RESUMO

Avaliaram-se a efetividade antimicrobiana das soluções de clorexidina a 0,12% adquiridas em diferentes farmácias de manipulação sobre o microrganismo Enterococcus faecalis. Inicialmente, solicitou-se a manipulação da solução de clorexidina a 0,12% em cinco diferentes farmácias da região metropolitana de Cuiabá-MT. O Periogard® (Colgate-Palmolive Indústria Brasileira, São Bernardo do Campo, São Paulo, Brasil), clorexidina a 0,12%, foi utilizado como padrão de

- 1 Doutoranda do Programa de Pós Graduação da Universidade Estadual Paulista - UNESP. Endodontista do Centro de Especialidades Odontológicas para Pacientes Especiais CEOPE-MT. Rua Professora Azélia Mamoré de Melo, 318. Apartamento 63. Bairro Araés. Cuiabá - MT. CEP 78005-700. Telefone: 06533228390. e-mail: t.semenoff@uol.com.br.
- 2 Cirurgiã Dentista pelo Centro Universitário de Várzea Grande-MT. e-mail: paulabebezinha@hotmail.com.
- 3 Especialista em Periodontia. Professora de Clínica Integrada do Centro Universitário de Várzea Grande - UNIVAG. e-mail: denisepedrini@hotmail.com.
- 4 Doutor em Periodontia. Professor de Odontologia em Âmbito Hospitalar da Universidade de Cuiabá - UNIC. e-mail: semenoff@uol.com.br.
- 5 Doutor em Endodontia. Professor de Endodontia da Universidade de Cuiabá - UNIC. e-mail: fapedro@terra.com.br.
- 6 Mestre em Ciências Biológicas - I.C.B./UFG. Coordenador da Disciplina de Endodontia da UNIP/DF. e-mail: sulaimen@uol.com.br.
- 7 Doutor em Endodontia. Professor de Endodontia da Universidade de Cuiabá - UNIC. e-mail: ahhborges@brturbo.com.br.

comparação. Selecionaram-se 20 placas Petri, contendo meio de cultura ágar sangue, sendo que 4 destas foram destinadas ao controle negativo. Inocularam-se os microrganismos em 16 placas, separando-se aleatoriamente, 4 placas como controle positivo. Nas 12 placas restantes foram inseridos 5 discos de papel absorvente embebidos nas substâncias testes de forma equidistantes e codificadas com os números de 1 a 5. Um disco foi embebido com a substância controle codificada com o número 6. Após o término desta etapa as placas foram mantidas em estufa com temperatura constante de 36°C. A análise dos halos de inibição foi realizada após 72 horas, por meio de lupa estereoscópica e paquímetro digital. Os dados foram submetidos à análise estatística (ANOVA, Bonferroni, $p < 0,05$). As substâncias 1, 4 e 5 apresentaram os menores halos de inibição. As substâncias 6 e 3 não tiveram diferenças entre si, porém apresentaram halos de inibição maiores que as substâncias 1, 4 e 5. A substância 2 apresentou maior halo de inibição, demonstrando diferenças estatísticas em relação a todas as substâncias testadas. Todas as soluções de clorexidina adquiridas em farmácias de manipulação da região metropolitana de Cuiabá foram efetivas contra o microrganismo *Enterococcus faecalis*.

PALAVRAS-CHAVE

atividade antimicrobiana, clorexidina, Enterococcus faecalis

ABSTRACT

*The aim of this study was to evaluate the antimicrobial effectiveness of 0.12% chlorhexidine acquired at different manipulations pharmacies in the metropolitan region of Cuiabá-MT on the *Enterococcus faecalis*. At first, it was requested the handling of the 0.12% chlorhexidine solution in 5 different manipulation pharmacies and Periogard® (Colgate-Palmolive Indústria e Comércio Ltda- São Bernardo dos Campos-SP- Brasil) was used as standard of comparison. 20 petri plates with blood agar culture medium were selected, 4 of these were intended to negative control. The microorganisms were inoculated on 16 plates with Swabs and 4 plates were randomly separated as positive control. In the 12 plates remaining were inserted 5 discs of paper towels soaked in substances tests arranged uniformly in the plates numbered 1 to 5. The disk soaked with the substance control was codified with the number 6. Upon this stage, the petri plates were kept in the laboratory drying oven with constant temperature of 36 °C. The halos of inhibition were analyzed after 72*

hours, through digitalis calibrator and stereoscopic magnifying glass. The data were subjected to statistical analysis (ANOVA, Bonferroni, $p < 0.05$). The substances 1, 4 and 5 presented the smallest halos of inhibition. The substances 6 and 3 had no differences between them, but had halos of inhibition larger than substances 1, 4 and 5. The substance 2 showed the largest halos of inhibition demonstrating statistical differences regarding all substances tested. Despite the statistical differences of inhibition zones, all solutions of chlorhexidine purchased in pharmacies in metropolitan area of Cuiabá-MT were effective against *Enterococcus faecalis*.

KEYWORDS

antimicrobial effects, chlorhexidine, Enterococcus faecalis

Introdução

O gluconato de clorexidina é um composto catiônico, de atuação na membrana citoplasmática dos microrganismos, causando perda do controle osmótico e conseqüente quebra do material intracelular¹. Ela também se liga a hidroxiapatita e aos tecidos moles, mudando a carga elétrica, para competir com os microrganismos². Seu grande espectro microbiano^{3,4}, substantividade^{5,6} e baixa toxicidade⁷, associados à estabilidade do agente em diversas condições, têm auxiliado na utilização desta substância em diversas áreas da saúde, como por exemplo, em unidades de terapia intensiva de alta complexidade^{8,9,10,11}. Seu uso na Odontologia intensificou-se por volta da década de 70, sendo atualmente utilizada devido a sua ação sobre os microrganismos presentes na cavidade bucal^{12,13,14}.

Considerável quantidade de espécies de bactérias tem sido identificada na cavidade oral¹⁵. Especificamente, na Endodontia, em algumas situações, altas quantidades de *E. faecalis* são frequentemente encontradas nos sistemas de canais radiculares¹⁶. Estudos *in vivo* e *in vitro* têm comprovado a eficiência da clorexidina na redução ou eliminação do *E. faecalis* do canal radicular e túbulos dentinarios¹⁷. Na Periodontia, essa substância tem sido amplamente usada como agente anti-séptico, para controle da placa dental¹⁸.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) regulamenta a comercialização destes produtos, determinando critérios de controle de qualidade, aquisição, armazenamento, conservação e dispersão. Os comerciantes são obrigados a cumprir suas determinações, a fim de evitar prejuízo aos usuários¹⁹. As diferentes condições de armazenamento e de transporte podem interferir na composição dos fármacos. Em recente publicação, Semenoff *et al.*²⁰ (2008) demonstraram a estabilidade da clorexidina 0,12% e clorexidina 2%, mesmo em condições desfavoráveis de temperatura e armazenamento. Foi objetivo desse trabalho avaliar a efetividade antimicrobiana das soluções de clorexidina a 0,12% adquiridas em diferentes farmácias de manipulação, na região de Cuiabá, sobre o microrganismo *Enterococcus faecalis*.

Metodologia

Inicialmente foi solicitado que cinco diferentes farmácias de manipulação da região metropolitana de Cuiabá-MT produzissem solução de clorexidina a 0,12% (Figura 1), de forma a constituir as substâncias testes desse estudo. Utilizou-se o Periogard® (Colgate- Palmolive Indústria e Comércio Ltda- São Bernardo dos Campos -SP - Brasil), clorexidina a 0,12%, como padrão ouro de comparação.



Figura 1 – Soluções de clorexidina a 0,12% produzidas em cinco diferentes farmácias de manipulação da região metropolitana de Cuiabá-MT

Foram separadas 20 placas Petri contendo meio de cultura ágar sangue (Newprov, produtos médicos e hospitalares, Pinhais, Paraná, Brasil). Destas, foram separadas quatro placas sem qualquer procedimento realizado que serviram de controle negativo.

O preparo da cepa do microrganismo *Enterococcus faecalis* com registro ATCC 10231 foi realizado inoculando-a em 7ml de BHI (Brain Heart Infusion - Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA) e levada à estufa em temperatura constante de 37° C, por 24 horas para replicação. Em seguida, a mesma foi suspensa em solução salina, atingindo a concentração próxima de 3×10^8 cels/ml, com turvamento similar ao tubo #1 da escala McFarland.

Seguiu-se, então, a inoculação uniforme e padronizada dos microrganismos nas 16 placas restantes por meio de Swabs (Rayswab indústria Brasileira – Diadema- SP – Brasil). Separaram-se aleatoriamente quatro placas para que servissem de controle positivo.

Nas 12 placas restantes, além da semeadura dos microrganismos foram inseridos seis discos de filtro de papel (Melita, Guaíba - RS - Brasil) perfurados com 5mm de diâmetro e devidamente esterilizados (Figura 2). Doze discos foram embebidos em cada uma das cinco soluções manipuladas de clorexidina a 0,12% e no Periogard®.



Figura 2- Seqüência da semeadura dos microrganismos inseridos nos discos de filtro de papel perfurados, de acordo com a substância testada.

Após o término desta etapa, todas as placas foram mantidas em estufa com temperatura constante de 36°C por 24 horas. A análise dos halos de inibição (Figura 3) foi realizada por uma examinadora calibrada e cega às substâncias por meio de paquímetro digital (Mitutoyo Sul Americana Ltda modelo 500144B. Suzano. SP. Brasil) (Figura 4) e lupa esterioscópica (Estek – São Paulo. SP. Brasil).

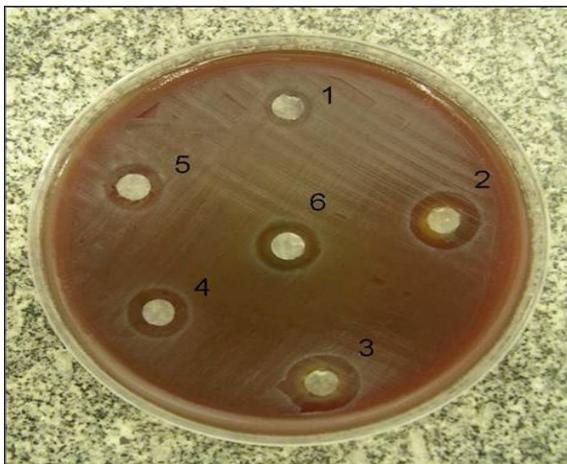


Figura 3- Halos de inibição referente a substância testada.

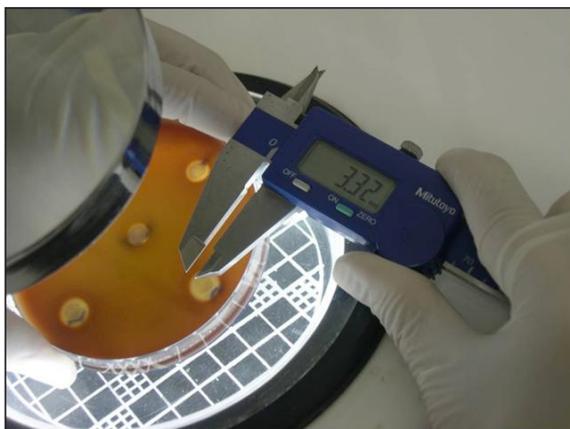


Figura 4- Medição, em milímetros, dos halos de inibição por meio de paquímetro digital

Os halos foram medidos, em milímetros e, então realizadas as médias dos grupos, constituídos pelas diferentes substâncias, no tempo experimental de 24 horas. As médias foram submetidas ao teste estatístico ANOVA (análise de variância), com teste corretivo de Bonferroni, para nível de significância de 5%.

Resultados

A tabela 1 demonstra as médias e desvios padrões dos halos de inibição provocados pelas substâncias testadas, sendo possível observar que as substâncias 1, 4 e 5 têm ausência de diferenças estatísticas entre si e apresentam halos de inibição estatisticamente menores em relação às soluções 2, 3 e 6. A substância 2 apresenta maior halo de inibição que a substância 6 ($p < 0,05$) e a substância 3 assemelha-se estatisticamente a elas.

Tabela 1 – Médias e desvios padrões dos halos de inibição formados (em milímetros) pelas substâncias testadas.

Substâncias testadas	Média	Desvio Padrão	
1	1,69	0,36	A
2	3,47	0,52	B
3	3,32	0,20	BC
4	2,12	0,34	A
5	1,87	0,36	A
6	2,85	0,62	C

Letras iguais representam médias estatisticamente iguais e letras diferentes representam diferenças estatísticas.

Discussão

Na vida clínica do Cirurgião-Dentista, o uso de agentes manipulados é uma necessidade. O padrão de qualidade é exigido

das farmácias pela ANVISA na manipulação dessas substâncias¹⁹. Neste trabalho optou-se por testar a clorexidina, de indicação ampla na odontologia^{2,3,5,10}, e comumente adquirida pelos consumidores e profissionais nas farmácias de manipulação²⁰. O *Enterococcus faecalis* foi escolhido para esse estudo por ser tratar de microrganismo bem estabelecido na literatura no que se refere à complicação na área da saúde, ligado a problemas na Odontologia^{21,22}. A solução do Periogard[®] (Colgate – Palmolive Indústria e Comércio Ltda – São Bernardo dos Campos-SP – Brasil) foi selecionada como padrão-ouro, por manter-se estável mesmo em condições de armazenamento inadequadas, fato comprovado anteriormente por metodologias semelhantes^{11,20}.

Os resultados deste estudo demonstram as diferenças de ação antimicrobiana, por meio da medição do halo de inibição, da clorexidina adquirida em diferentes farmácias de manipulação na região metropolitana de Cuiabá-MT. Comparativamente, o diâmetro do halo de inibição é diretamente proporcional à quantidade de agente antimicrobiano presente no disco, à solubilidade do agente e à eficácia global do agente antimicrobiano¹¹. Sendo possível notar menores halos de inibição para as substâncias 1, 4 e 5 e maiores halos para as substâncias 2, 3 e 6 (Periogard[®]-Colgate –Palmolive Indústria e Comércio Ltda– São Bernardo dos Campos-SP – Brasil). Aliás, a substância 3 apresentou-se estatisticamente semelhante ao do Periogard[®] (Colgate – Palmolive Indústria e Comércio Ltda – São Bernardo dos Campos-SP -Brasil) ($p \geq 0,05$) e a substância 2 demonstrou halos estatisticamente maiores que estes ($p \leq 0,05$).

Embora as substâncias 1, 4 e 5 não tenham mostrado o mesmo padrão de efetividade do Periogard[®] (Colgate – Palmolive Indústria e Comércio Ltda– São Bernardo dos Campos-SP-Brasil), todas as soluções apresentaram halos de inibição para o microrganismo utilizado. Estas variações geram dúvidas da forma de manipulação dos agentes, ou seja, alguns têm halos de inibição menores e outros maiores. É provável que diferenças nas concentrações da clorexidina possam ter ocorrido durante a manipulação dos fármacos. Todavia, este estudo não teve por

finalidade a avaliação do controle de qualidade das farmácias envolvidas, apesar de suscitar a necessidade de maiores estudos para este tipo de análise.

A despeito de suas limitações, os estudos *in vitro* ainda têm seu espaço garantido. Mesmo com técnicas de diagnóstico microbiológicas mais modernas, as descobertas de novos microrganismos ainda dependem desta metodologia²³. O mecanismo de organização do biofilme dental e principalmente a difusão entre as comunidades assemelha-se em parte ao método da cultura, assim a metodologia empregada parece ser uma opção adequada para a análise proposta²⁴.

Além disso, as análises *in vitro* são interessantes por abordarem questões clínicas que suscitam dúvidas como as que foram abordadas neste trabalho, entretanto os resultados deste trabalho, que se utilizou de apenas um microrganismo, devem ser considerados com cautela^{11,12}.

Conclusão

Apesar das diferenças estatísticas dos halos de inibição, todas as soluções de clorexidina adquiridas em farmácias de manipulação da região metropolitana de Cuiabá foram efetivas contra o microrganismo *Enterococcus faecalis*.

Referências Bibliográficas

1. HEILING I; CHANDLER N.P. Antimicrobial effect of irrigant combinations with in dentinal tubules. *Int Endod J*, v. 31: 8-14, 1998.
2. LEONARDO M.R. et al. In vivo antimicrobial activity of 2% chlorhexidine used as a root canal irrigating solution. *J of Endod*, v. 25: 167-71, 1999.
3. SENA N.T. et al. In vitro antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine against selected single-species biofilms. *Int Endod J*, v. 39: 878-85, 2006.

4. GOMES, B.P.F. et al. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of calcium hydroxide combined with chlorhexidine gel used as intracanal medicament. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Radiol Endod*, v. 102: 544-50, 2006.
5. ROSENTHAL S.; SPANGBERG L.; SAFAVI, K. Chlorhexidine substantivity in root canal dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, v. 98: 488-92, 2004.
6. DAMETTO, F.R et al. In vitro assessment of the immediate and prolonged antimicrobial action of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant against *Enterococcus faecalis*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, v. 99: 768-72, 2005.
7. EL-KARIM I.; KENNEDY, J.; HUSSEY, D. The antimicrobial effects of root canal irrigation and medication. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, v. 103: 560-9, 2007.
8. DAVIES, A. The mode of action of chlorhexidine. *J Periodontal Res*, v. 8, Supp. 12: 68-75, 1973.
9. FILGUEIRAS, J.L.; CANÇADO R.P.; SILVA, C.H.P.M.; SALIM, M.A.A. Avaliação do efeito imediato e residual do sabão anti-séptico, do PVP-I degermante, do PVP-I tópico e da clorexidina na degermação das mãos. *Rev Bras Odont*, v. 34: 195-8, 2004.
10. SEGERS, P. et al. Prevention of Nosocomial Infection in Cardiac Surgery by Decontamination of the Nasopharynx and Oropharynx With Chlorhexidine Gluconate. *JAMA*, v. 296: 2460-6, 2006.
11. SEMENOFF-SEGUNDO, A. et al. Efetividade do gluconato de clorexidina a 0,12% e do digluconato de clorexidina a 2% adquiridos em diferentes dentais e farmácias na cidade de Cuiabá, sobre *Candida Albicans*. *Periodontia*, v. 17: 41-5, 2007.
12. LÖE H.; SHIOTT, C.R. The effect of mouthrinses and topical application chlorhexidine on development of dental plaque and gingivitis in man. *J Periodontal Res*, v. 5: 79-83, 1970.
13. CHARLES C.H.; MOSTLER K.M.; BARTELS L.L.; MANKODI, S.M. Comparative antiplaque and antigingivitis effectiveness of a chlorhexidine and an essential oil mouthrinse: 6-month clinical trial. *J Clin Periodontol*, v. 31: 878-84, 2004.

14. Chlorhexidine Gluconate Attenuates the Ability of Lipoteichoic Acid from *Enterococcus faecalis* to Stimulate Toll-like Receptor 2. *J. Endod.*, v. 35: 212-5, 2009.
15. SELTZER S.; FARBER P.A. Microbiologic factors in endodontology. *Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology*, v. 78: 634-45, 1994.
16. STUART C.H.; SCHWARTZ S.A.; BEESON T.J.; OWATZ, C.B. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod.*, v. 32: 93-8, 2006.
17. SIQUEIRA J.F. JR.; PAVIA S.S.M.; RÔÇAS, I.N. Reduction in the cultivable bacterial populations in infected root canals by a chlorhexidine-based antimicrobial protocol. *J Endod.*, v. 33: 541-7, 2007.
18. BARBIN, L.E. et al. Determination of para-Chloroaniline and Reactive Oxygen Species in Chlorhexidine and Chlorhexidine Associated with Calcium Hydroxide. *J Endod.*, v. 34: 1508-14, 2008.
19. ANVISA, Ministério da Saúde, Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/res/328_99.htm>. Acesso em: 22/05/2008.
20. SEMENOFF, T.A.D.V., et al. Efetividade da clorexidina a 0,12% e a 2% armazenadas em diferentes temperaturas sobre alguns microrganismos - estudo *in-vitro*. *Periodontia*, v. 18: 20-25, 2008.
21. SUNDQVIST, G.; FIGDOR, D.; PERSSON, S.; SJOGREN, U.L.F. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative retreatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.*, v. 85: 5-7, 1998.
22. SENO, Y. et al. Clinical implications of biofilm formation by *Enterococcus faecalis* in the urinary tract. *Acta Med Okayama*, v. 58: 79-87, 2005.
23. LAU, L. et al. Quantitative real-time polymerase chain reaction versus culture: a comparison between two methods for the detection and quantification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in subgingival plaque samples. *J Clin Periodontol.*, v. 31: 1061-9, 2004.
24. SOCRANSKY, S.S.; HAFFAJEE A.D. Periodontal microbial ecology. *Periodontol 2000*, v. 38: 135-187, 2005.