

# AVALIAÇÃO COMPARATIVA DA AÇÃO ANTIBACTERIANA “IN VITRO” DE ENXAGUANTES BUCAIS DISPONÍVEIS NO MUNICÍPIO DE SÃO LUÍS, MARANHÃO

COMPARATIVE EVALUATION OF THE “IN VITRO” ANTIBACTERIAL ACTION OF MOUTHWASH AVAILABLE IN SÃO LUÍS, MARANHÃO, BRAZIL

Juliana Campos Vieira<sup>1</sup>, José Ferreira Costa<sup>2</sup>, Tarcísio Jorge Leitão<sup>2</sup>

## Resumo

**Introdução:** Os Enxaguantes bucais são adjuvantes na manutenção da higiene bucal, sendo a forma mais simples para veiculação de substâncias antimicrobianas na cavidade bucal. No entanto, interações entre as composições podem potencializar ou comprometer sua efetividade. **Objetivo:** Avaliar e comparar a ação antibacteriana *in vitro* de enxaguantes bucais sobre um biofilme *Streptococcus mutans*. **Métodos:** Foram analisados seis enxaguantes e dois grupos controles: Clorexidina 0,12% (controle positivo) e NaCl 0,9% (controle negativo). O biofilme de *S. mutans* foi crescido em placas de 24 poços contendo meio de Tripton e Extrato de levedura, suplementada com 10% de sacarose por 96 horas. Após o crescimento, foi realizado o tratamento com os enxaguantes por 30 min nas diluições de 4, 40 e 400x, simulando as diluições ocorridas imediatamente após bochecho, após 2 horas e 8 horas, respectivamente. Ao final, o biofilme foi ressuspensão em solução salina e diluições decimais foram realizadas. Os valores foram expressos em unidades formadoras de colônia (UFC/mL). **Resultados:** Na diluição de 4 vezes, o enxaguante T3 (Malvatricin®) apresentou uma diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) em relação aos demais colutórios e controle negativo. Já nas diluições de 40 e 400 vezes não houve diferença entre os enxaguantes ( $p \geq 0,05$ ), mas todos diferiram do controle negativo ( $p < 0,05$ ). **Conclusão:** Todos os enxaguantes apresentaram efeito sobre *S. mutans*, mas o T3 (Malvatricin®), produto sintetizado à base de extrato de *Malva sylvestris*, foi mais efetivo na diminuição da contagem de UFC na diluição de 4 vezes que os demais.

**Palavras-chave:** Streptococcus mutans. Antimicrobiano. Clorexidin.

## Abstract

**Introduction:** Oral mouthwashes are adjuvants in the maintenance of oral hygiene, being a simpler form for the delivery of antiseptic substances. However, interactions between compositions may potentiate or compromise their effectiveness. **Objective:** To evaluate and compare an *in vitro* antibacterial action of commonly used mouthwashes on a *Streptococcus mutans* biofilm. **Methods:** Six mouthwashes and two groups control were analyzed: chlorhexidine 0.12% (positive control) and 0.9% NaCl (negative control). The *S. mutans* biofilm was grown in 24-well plates containing tryptone medium and yeast extract, supplemented with 10% sucrose for 96 hours, and renewed every 24 hours. After growth, the column treatment was performed for 30 min at 4, 40 and 400x dilutions, simulating the dilutions occurring in the mouthwash, after (~2 hours) and after (~8 hours). At the end, the biofilm to be resuspended in saline and decimal dilutions were performed in NaCl. As 10<sup>-1</sup> to 10<sup>-8</sup> dilutions were seeded on agar BHI plates and incubated at 37 °C, 10% CO<sub>2</sub> for 48 h. Values were expressed in colony forming units (CFU). **Results:** At 4-fold dilution, T3 (Malvatricin®) rinse presented a statistically significant difference ( $p \leq 0.05$ ). At the 40 and 400 fold dilutions, there was no difference between the rinses ( $p \geq 0.05$ ), but all differed from the negative control. **Conclusion:** All rinses had an effect on *S. Mutans*, but the T3 (Malvatricin®) product synthesized based on *Malva sylvestris*, had a higher antimicrobial effect on *S. mutans* fold dilution in relation to the others.

**Keywords:** Streptococcus mutans. Antimicrobial. Chlorhexidine.

## Introdução

Biofilme é uma comunidade cooperativa, bem organizada, de células microbianas aderidas a uma superfície úmida e aglomerada por matriz de polissacarídeos, podendo haver formação a partir de uma ou múltiplas espécies<sup>1,2</sup>, apresentando-se como agente determinante da cárie dentária e periodontopatias, as quais se caracterizam como problema no âmbito de odontologia sanitária<sup>3,4</sup>.

Para o combate eficaz do biofilme dental, utilizam-se os procedimentos de natureza mecânica (escova e fio dental)<sup>5,6</sup>. No entanto, Frente às diversas limitações dos controles mecânicos impostas aos indivíduos, tais como: politraumatismos, impossibilidade temporária de realizar a remoção mecânica do biofilme dentário, pessoas com necessidades especiais, usuários de aparelhos ortodônticos e indivíduos com alto risco à

cáries<sup>7</sup>, a utilização de agentes de controle químico está indicada como estratégia complementar à escovação dentária. Considera-se, portanto, que os enxaguantes bucais com ação antimicrobiana são adjuvantes na manutenção da higiene oral, contribuindo para a redução do número de microrganismos patogênicos<sup>8</sup>.

A forma mais simples para veiculação de substâncias antissépticas é através de enxaguantes, sendo uma mistura de componente ativo (antimicrobiano), água, álcool, surfactantes, umectantes e flavorizantes. Várias substâncias antimicrobianas são utilizadas sob a forma de enxaguatórios: fluoreto de sódio, cloreto de cetilpiridínio, triclosan, timol, clorexidina, tirotricina, dentre outras<sup>9</sup>.

Os agentes antimicrobianos podem ter um espectro de ação que vão desde a redução da adesividade bacteriana à superfície dentária até a inibição do crescimento e proliferação dos microrganismos, inibi-

<sup>1</sup> Graduado em Odontologia. Universidade Federal do Maranhão - UFMA.

<sup>2</sup> Docente do curso de Odontologia. Professor Colaborador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia - UFMA. Contato: Tarcísio Jorge Leitão de Oliveira. E-mail: tarcisiojorge@hotmail.com

ção da formação da matriz intercelular da placa, além de modificar a bioquímica bacteriana na intenção da redução da formação de produtos citotóxicos por parte destas e de transformar o ecossistema do biofilme para que se desenvolva uma flora menos patogênica<sup>10</sup>.

Com isso, devido as suas propriedades antimicrobianas os enxaguatórios bucais nos últimos anos cresceram de forma incontestável e, além da grande quantidade de produtos que vem sendo oferecidos, estes mudam constantemente sua formulação<sup>10</sup>. Tais modificações podem alterar as interações entre as composições podendo potencializar ou comprometer sua efetividade.

Assim, o objetivo da pesquisa foi avaliar a atividade antimicrobiana de enxaguantes bucais disponível no município de São Luís (MA), em um modelo *in vitro* que simule o processo formação do biofilme dental.

**Métodos**

Estudo experimental, *in vitro* e cego, realizado no Laboratório de Cariologia e Microbiologia da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), biofilmes de *Streptococcus mutans* (UA 159) foram crescidos em placas de 24 poços contendo 1 ml do meio de Triptona e Extrato de levedura (TYB, Bacto Difco, USA), suplementada com 10% de sacarose por 96 horas.

Foram utilizados somente 18 poços e o meio de cultura foram renovados a cada 24 horas. A cada renovação foi aferido o potencial hidrogeniônico (pH) do meio, pelo medidor de pH de bancada, como indicativo de crescimento do biofilme bacteriano.

Após o crescimento das 96 horas, foi realizado o tratamento com os seis enxaguantes bucais com variáveis composições e recomendados para o controle de biofilme dental adquiridos no município de São Luís (MA) (Quadro 1), nas diluições de 4, 40 e 400 vezes por um tempo enxaguantes de 30 minutos. O controle positivo foi constituído pela Cloredixina 0,12% que também sofreu tais diluições e o controle negativo composto por Cloreto de Sódio (NaCl) 0,9% estéril. Essas dissoluções simulam respectivamente: a diluição inicial de bochecho, após um curto período de tempo (~2 horas) e após um longo período de tempo (~8 horas)<sup>4</sup>.

Tratamentos	Agentes Ativos
T1	NaCl 0,9%
T2	Anapyon®
T3	Malvatricin®
T4	Cepacol tradicional®
T5	Colgate plax fresh mint®
T6	Oral B pró-saúde®
T7	Listerine essencial ice®
T8	Clorexidina 0,12%

**Quadro 1** - Tratamentos utilizados.

Após o tempo estipulado os enxaguantes foram retirados de cada poço e o biofilme formado, lavado duas vezes com solução salina a 0,9% estéril e ressuspenso em NaCl (0,9%). Após homogeneização realizada pelo agitador de tubos tipo vortex, a suspensão foi diluída (10<sup>-1</sup> a 10<sup>-8</sup>) em NaCl 0,9%. Aliquotas de 100 µl de cada diluição foram inoculadas em placas de Brain Heart Infusion Ágar (BHI Agar, Difco Bacto, USA). As placas foram incubadas em presença de CO<sub>2</sub>, a 37°,

por 48 horas. Ao final foi determinado o número de unidades formadoras de colônia (UFC/mL).

Os dados foram avaliados quanto à normalidade de distribuição dos erros e homocedasticidade, transformados em Log<sub>10</sub> e comparados por ANOVA, seguido do teste de Tukey por meio do programa estatístico SPSS 23.0 (IBM, Armonk, NY, EUA), considerando significativos valores de p ≤ 0,05.

**Resultados**

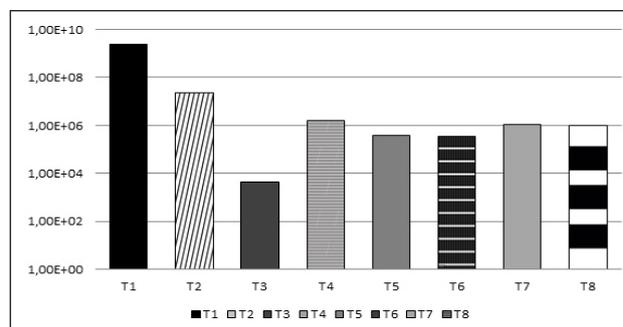
Observou-se que em todas as replicatas, durante a formação *in vitro* do biofilme, o decréscimo do valor do pH do meio comparando o primeiro dia e o quinto dia do experimento (Tabela 1).

**Tabela 1** - Valores de pH do meio de cultura em função do dia de crescimento bacteriano.

Dia	1ª Replicata	2ª Replicata	3ª Replicata
1ª	7,00	7,00	7,00
2ª	6,38	6,13	6,71
3ª	4,48	5,37	6,64
4ª	4,65	4,19	4,65
5ª	4,24	4,56	4,16

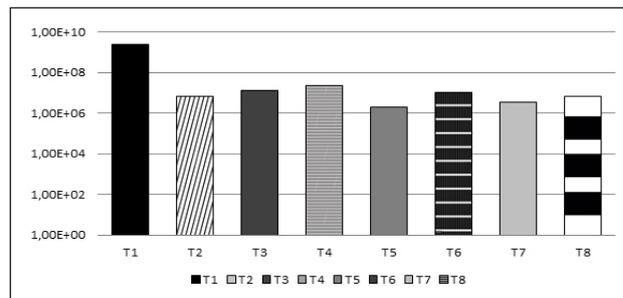
Fonte: CAMPOS, 2017.

Em relação ao número de unidades formadoras de colônia (UFC/mL), o enxaguante bucal T3 mostrou uma redução estatisticamente significativa (p ≤ 0,05) na diluição de 4 vezes em relação aos demais tratamentos e controle positivo (Figura 1).



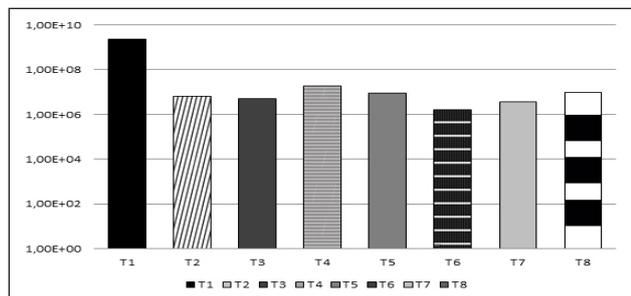
**Figura 1** - Número de unidades formadoras de colônia (UFC/mL) depois do tratamento diluído em 4 vezes.

Na diluição de 40 vezes, não houve diferença na contagem de UFC entre os enxaguantes (p > 0,05). No entanto, todos reduziram o número de colônias de *S. mutans* quando comparado ao grupo T1 controle negativo (p < 0,05) (Figura 2).



**Figura 2** - Número de unidades formadoras de colônia (UFC/mL) depois do tratamento diluído em 40 vezes.

O mesmo foi observado na diluição de 400 vezes onde os grupos experimentais não diferiram entre si ( $p > 0,05$ ), mas apresentaram menores valores de UFC quando comparado ao T1 (NaCl 0,9% - controle negativo) (Figura 3).



**Figura 3** - Número de unidades formadoras de colônia (UFC/mL) depois do tratamento diluído em 400 vezes.

## Discussão

Nesse estudo, observou-se que na diluição de 4 vezes que simula a diluição inicial dos enxaguantes na cavidade bucal, o enxaguante T3 a base de *Malva sylvestris*, apresentou diferença estatisticamente significantes, possibilitando um menor crescimento de biofilme de *S. Mutans*. Esses resultados corroboram com os achados nos estudos de Drumond *et al.*,<sup>11</sup> e de Moreira *et al.*,<sup>12</sup> que também encontraram efeito de compostos a base deste extrato natural em bactérias cariogênicas crescidas planctonicamente.

O enxaguante T3 tem como princípios ativos além da *Malva sylvestris* a tirotricina e o quinosol. A

tirotricina é um antibiótico natural tendo efeito bacteriostático ou bactericida dependendo da concentração; e o quinosol possui ação antisséptica, antibacteriana, antifúngica e propriedades desodorantes<sup>13</sup>. O mix destes compostos em alta concentração no colutório pode justificar sua eficácia no presente estudo.

Nas diluições de 40 vezes e 400 vezes, não houve diferença entre os enxaguantes sugerindo propriedades de substantividade e eficácia de todos os produtos testados. O que pode ser justificado devido aos compostos ativos presentes nos enxaguantes, que são os: Cloreto de Cetilpiridínico, cuja ação se baseia na interação com a membrana celular bacteriana, resultando na perda de componentes celulares, perturbação do metabolismo e inibição do crescimento celular e consequente morte celular<sup>14</sup>; Óleos essenciais, de que a ação baseia-se no poder de alterar a higidez da parede celular agindo, particularmente, sobre as bactérias gram-positivas e as leveduras<sup>15</sup>; e Triclosan, que age na desorganização da membrana plasmática através do aumento de sua permeabilidade e inibição da atividade das enzimas do tipo tripsina. Esse último composto apresenta baixa substantividade quando incorporado aos enxaguatórios bucais, assim, no intuito de sanar esta deficiência podem ser comumente associados a este agente antimicrobiano, os copolímeros Gantrez<sup>15</sup>.

Logo, de acordo com a metodologia utilizada neste estudo, pode-se concluir que todos os enxaguantes bucais apresentaram efeito sobre *Streptococcus Mutans* perante todas as diluições, mas o enxaguante T3, produto natural a base de Malva, demonstrou maior efetividade na atividade antimicrobiana na diluição de 4 vezes em relação aos demais.

## Referências

- Spratt DA, Pratten J. Biofilms and the Oral Cavity. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 2003; 2(2): 109-120.
- Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol*, 2010; 8(9): 623-633.
- Levine RS. *Bases científicas da educação para saúde dental*. In: Lindhe J. *Tratado de periodontia clínica*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1992. p. 252-259.
- Oppermann RV. *Diagnóstico e tratamento das doenças cárie e periodontal*. In: Mezzomo E, *et al*. *Reabilitação oral para o clínico*. 2. ed. São Paulo: Santos; 1994. p. 40-42.
- Saba-Chujfi E, Silva ECQ, Sarian R. Avaliação dos métodos de motivação/educação em higiene bucal. *Rev Gaúch de Odontol*, 1992; 40: 87-90.
- Turssi CP, Marcantônio RAC, Boeck EM, Rocha AL. Influência do reforço da motivação no controle da placa bacteriana em escolares da zona rural. *Rev ABOPREV*, 1998; 1: 16-21.
- Dias BLM, Araújo DB, Araujo MTB. Análise dos enxaguatórios e dentifrícios comercializados na Cidade do Salvador. *Rev Ciênc Méd Biol*, 2013; 12(3): 344-349.
- Ramos IA, Leite RB, Menezes KM, Jovito VC, Cavalcanti YW, Almeida LFD, *et al*. Efeito inibitório de enxaguatórios bucais sobre o crescimento de *Lactobacillus casei*. *Rev Bras Odontol*, 2012; 69(1): 107-110.
- Moreira MJS, Ferreira MBC, Hashizume LN. Avaliação *In Vitro* da Atividade Antimicrobiana dos Componentes de um Enxaguatório Bucal contendo Malva. *Pesq Bras Odontoped Clin Integr*, 2012, 12(4): 505-509.
- Barbosa FTS, Dias LF, Gomes DKS, Saito SK, Carlos MX, Lima DLF. Princípios ativos de enxaguatórios bucais comercializados em Fortaleza, seus tipos e suas informações. *Braz J Periodontol*, 2017; 27(3): 7-15.
- Drumond MRS, Castro RDA, Almeida RVD, Pereira MSV, Padilha WVN. Estudo comparativo *in vitro* da atividade antibacteriana de produtos fitoterápicos sobre bactérias cariogênicas. *Pesq Bras Odontoped Clin Integr*, 2004; 4(1): 33-38.
- Moreira MJS, Ferreira MBC, Hashizume LN. Avaliação *In Vitro* da Atividade Antimicrobiana dos Componentes de um Enxaguatório Bucal contendo Malva. *Pesq Bras Odontoped Clin Integr*, 2012, 12(4): 505-509.
- Moreira MJS. *Avaliação In Vitro da Atividade Antimicrobiana de um Enxaguatório Bucal contendo Malva e de seus componentes*. [Monografia]. Porto Alegre (RS): Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2011. 34 p.
- Alves D, Costa AL, Almeida RF, Carvalho JFC, Felino A. Cloreto de Cetilpiridínio - revisão da literatura. *Rev Port Estomatol Med Dent Cir Maxilofac*, 2012; 53(3): 181-189.
- Araújo DB, Gonçalves EMB, Martins GB, Lima MJP, Araújo MTB. Saúde bucal: a importância dos enxaguatórios com antissépticos. *Rev Ciênc Méd Biol*, 2015; 14(1): 88-93.