

SENSIBILIDADE DOS LACTOBACILLUS A ANTI-SÉPTICOS BUCAIS

LACTOBACILLUS SENSITIVITY AND MOUTHWASHES

João Carlos BACCARELI¹
Mariangela Cagnoni RIBEIRO²

RESUMO

*Este artigo avaliou a sensibilidade **in vitro** de 52 cepas bacterianas de diferentes espécies de *Lactobacillus* isoladas de amostras de saliva de estudantes da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica de Campinas. Foram utilizados cinco diferentes anti-sépticos orais empregando-se os métodos da difusão e da gota com o objetivo de identificar a eficiência dos mesmos como uma segura medida preventiva e promotora da saúde bucal. Demonstrou-se que os anti-sépticos Periogar[®], Malvona[®], Wach[®] e Malvatricin[®] foram eficazes sobre os *Lactobacillus* e menor grau de ação foi encontrado em relação ao Flogoral[®].*

Unitermos: anti-sépticos bucais, *lactobacillus*, higiene bucal.

ABSTRACT

*The present research evaluated the sensibility **in vitro** of fifty-two bacillus from different species of *Lactobacillus*, which were isolated from samples of Pontifícia Universidade Católica de Campinas (University of Odontology) students saliva. Five different mouthwashes were used in the bacillus by diffusion or by the drop method. The aim of this research was to analyze the mouthwashes efficacy as a helper of oral health and a fundamental instrument in the preventive medicine. The result showed that the mouthwashes Periogard[®], Malvona[®], Wach[®] and Malvatricin[®] had a considerable efficacy against the *Lactobacillus* species. Meanwhile, Flogoral[®] was the powerless mouthwash in this experiment.*

Keywords: mouthwashes, *lactobacillus*, oral hygiene.

INTRODUÇÃO

Vários trabalhos de pesquisa vieram provar a eficácia dos anti-sépticos bucais como método de prevenção de cárie, mas não são citadas na literatura as suas ações sobre certas bactérias, como os *Lactobacillus*^{24,25}.

A cárie está na dependência da especificidade microbiana da placa dental, da dieta e higiene bucal do hospedeiro. Esses fatores são interdependentes em

conseqüência da ação deletéria dos ácidos formados pelos microorganismos a partir de uma alimentação rica em hidratos de carbono fermentáveis^{8,19,23,27}.

Logo, a prevenção da cárie e da doença periodontal estão condicionadas ao combate à placa bacteriana^{12,18,25}.

A placa dentária ou placa bacteriana é formada por camadas microbianas, organizadas em microcolônias em uma forma gelatinosa, aderida ao dente ou à superfície

⁽¹⁾ Curso de Odontologia, Faculdade de Odontologia e Curso de Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências Médicas, PUC-Campinas. Av. John Boyd Dunlop, s/n, Bloco A, Jd. Ipaussurama, 13059-900, Campinas, SP, Brasil. Correspondência para/Correspondence to: J.C. BACCARELI.

⁽²⁾ Curso de Odontologia, Faculdade de Odontologia e Instituto de Ciências Biológicas e Química, PUC-Campinas.

de restauração^{5,8}. Entre os microorganismos presentes na placa bacteriana, os estreptococos do grupo *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus* e alguns bacilos filamentosos Gram-positivos exercem um papel preponderante na formação da cárie dentária^{1,7,13,27}.

Lactobacillus são grupos característicos de bactérias orais cujo número varia de acordo com as circunstâncias. Parecem ter relação com a cárie dentária, mas é provável que alguns estejam presentes em todas as cavidades orais do homem, do nascimento até a morte^{7,33}. Segundo Lehner¹⁸, a boca do recém-nascido é estéril, mas a colonização microbiana começa algumas horas após o nascimento do bebê e entre eles há *Streptococcus salivarius*, os *Lactobacillus* e as *Veillonella alcalescens*.

Segundo Burnett *et al.* (1978)⁶, as numerosas investigações sobre cárie e *Lactobacillus* permitem as seguintes conclusões: raramente estão ausentes de bocas de adultos portadores de dentes; aumentam em número nas superfícies de esmaltes e nas placas, antes do aparecimento da cárie; o aumento do número de *Lactobacillus* da saliva precede de 3-6 meses o aparecimento de lesões de cárie; aumentam na saliva, quando há aumento da predisposição à cárie; a ingestão de quantidades maiores de carboidratos refinados aumenta a população de lactobacilos na saliva e a atividade da cárie.

Nos desdentados os locais de retenção de placa não existem e a contagem de *Lactobacillus* é extremamente baixa ou zero. Logo após a erupção dos dentes em crianças, ou colocação de próteses em adultos que condicionam locais de retenção de carboidratos, aumenta a sua contagem. Em bocas com cáries dentárias a contagem é alta. Após a remoção das cáries, a prevenção é feita com aplicação tópica de flúor, dieta de carboidratos controlada e rigorosa higiene oral com uso de anti-sépticos^{22,31}.

O único trabalho encontrado na literatura especificamente sobre a ação de anti-sépticos em *Lactobacillus* foi de Juliano *et al.*¹⁶ em 1992, que realizaram um estudo *in vitro* da atividade antibacteriana de anti-sépticos contra lactobacilos vaginais. Demonstraram que os anti-sépticos analisados inibiam o crescimento de lactobacilos mesmo em tempo curto de exposição, e diluições altas e freqüentes podem causar mudanças na microbiota presente na vagina.

Há vários anti-sépticos bucais sendo comercializados no Brasil. Foram selecionados alguns anti-sépticos por serem pouco onerosos para o paciente e de fácil aplicação: Periogard®, Malvona®, Wach®, Malvatricin® e Flogoral®. Desta forma, neste trabalho

propôs-se a isolar e identificar os *Lactobacillus* da cavidade bucal e testar a sensibilidade *in vitro* destas bactérias a agentes anti-sépticos orais.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

A população-alvo estudada foi constituída por 52 alunos da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica de Campinas com idade média de 19 anos, examinados conforme ficha clínica e avaliados em relação a dentes cariados, perdidos e obturados (CPO-D). Todos os participantes não efetuaram higiene oral antes da coleta. Os dados foram identificados e analisados com autorização dos mesmos.

O material empregado foi 5 mL de saliva de cada indivíduo coletada em um tubo de ensaio que continha 10 mL de meio de cultura tioglicolato de sódio. Rotulou-se cada tubo e foram incubados por 24-72 horas a 35-37°C em jarra de microaerofilia. Após este período foi observado crescimento bacteriano caracterizado por turvação e sedimento em cada tubo estudado; então procedeu-se a identificação das cepas bacterianas realizando-se bacterioscopia e inoculação em meio seletivo para bactérias acidogênicas e acidúricas *Tomato Juice*. Foram incubados por 24-72 horas a 35-37°C em jarra de microaerofilia^{2,26}. Em seguida houve a caracterização de colônias típicas de *Lactobacillus* as quais são pequenas, circulares, convexas baixas, bordos uniformes, podendo ter a superfície lisa ou rugosa (dependendo da espécie)^{2,17}. A partir da colônia isolada foi realizada a identificação da cepa, segundo Bergey's², inoculando-as na série bioquímica: fermentação da glicose, sacarose, lactose, arabinose, galactose, maltose, rafinose e manitol, hidrólise da arginina e esculina. Incubadas em microaerofilia por 24-72h a 35-37°.

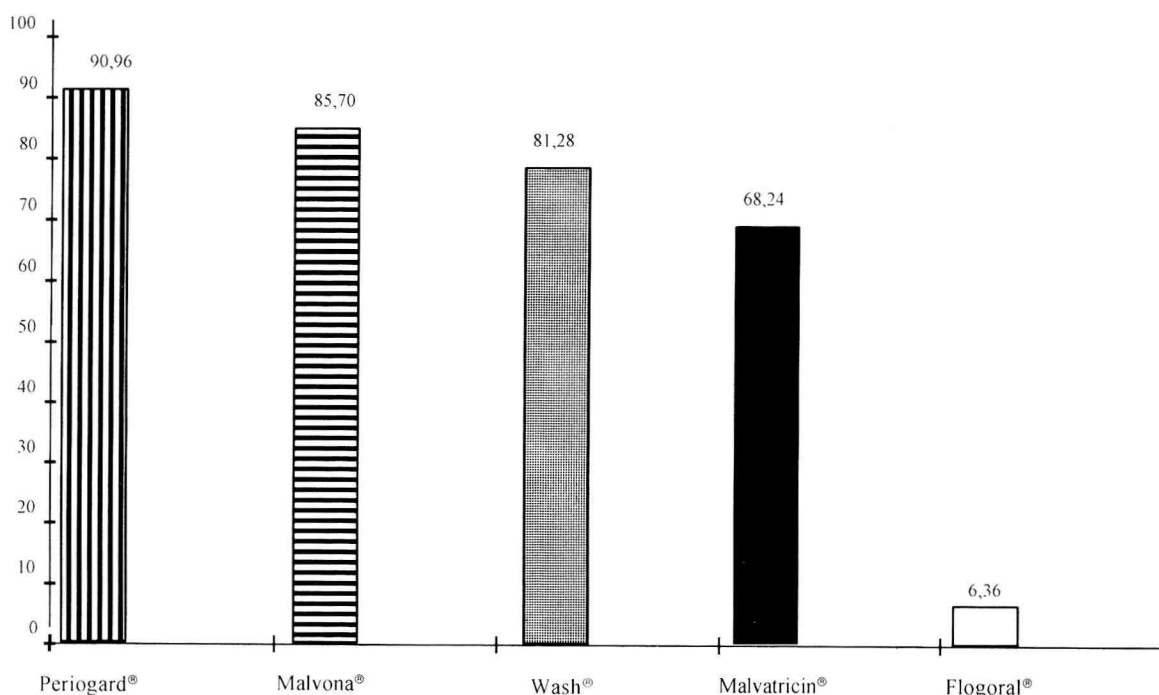
As cepas identificadas foram então inoculadas em 5 mL de tioglicolato de sódio, incubadas a 35-37°C em microaerofilia até padronizar o número de células, tendo uma densidade e turbidez (padrão de Kirby & Bawer) equivalente a obtida pela adição de 0,5 mL de solução de cloreto de bário em 99,5 mL de ácido sulfúrico, o que significa o padrão 5 na escala de MacFaland, isto é, 1.500.000 bactérias/mL^{34,35}. Em seguida foi realizado o método de difusão segundo Kirby Bawer³⁴ e o método da gota conforme Ribeiro Soares³², para verificar a inibição ou não de crescimento bacteriano frente a cada tipo de anti-séptico utilizado no presente trabalho.

RESULTADOS

Na detição permanente o índice de dentes cariados, perdidos e obturados (CPO-D) médio encontrado nos 52 pacientes, com idade em torno de

Tabela 1. Relação das cepas identificadas e a sua sensibilidade aos anti-sépticos, empregando o método da Difusão (D) e da Gota (G).

| Cepas Identificadas | Cepas Identificadas n | Periogrd® | | Malvona® | | Wash® | | Malvatricin® | | Flogoral® | |
|----------------------|--------------------------|-----------|----|----------|----|-------|----|--------------|----|-----------|---|
| | | D | G | D | G | D | G | D | G | D | G |
| <i>L.plantarium</i> | 26 | 22 | 21 | 21 | 22 | 20 | 18 | 18 | 15 | 2 | 3 |
| <i>L.salivarius</i> | 18 | 16 | 16 | 12 | 15 | 12 | 15 | 13 | 9 | 1 | 1 |
| <i>L.brevis</i> | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 4 | 2 | 4 | 4 | 0 | 0 |
| <i>L.acidophilus</i> | 3 | 2 | 3 | 2 | 3 | 2 | 3 | 2 | 2 | 0 | 1 |
| <i>L.casei</i> | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 |

**Figura 1.** Sensibilidade das diferentes espécies de *Lactobacillus* aos anti-sépticos utilizados.

19 anos foi 5,77. Foram identificadas 52 cepas do gênero *Lactobacillus*, sendo 26 *L. plantarium*, 18 *L. salivarius*, 4 *L. brevis*, 3 *L. acidophilus* e 1 *L. casei* (Tabela 1), relacionando com atividade anti-microbiana dos anti-sépticos quanto a diferentes espécies do gênero *Lactobacillus* (Figura 1).

DISCUSSÃO

Esta pesquisa demonstra que o índice de dentes cariados, perdidos e obturados médio (CPO-D) encontrado nos 52 pacientes com idade em torno de 19 anos foi de 5,77 o que está pouco abaixo dos dados levantados pelo Ministério da Saúde em 1996⁴ (5,83%) estando mais de duas vezes abaixo em relação ao índice na época. Segundo levantamento efetuado dez anos

depois, houve uma redução média no Brasil de 53,98% no índice de CPO-D 12 anos⁴.

O Periogard® (concentração comercial de 0,12%) mostrou ser um eficiente agente antimicrobiano em 90,96% das cepas de diferentes espécies de *Lactobacillus* identificados (Figura 1). Quando comparado com outros autores^{10,11,13,15} que pesquisaram a ação do Periogard® sobre a microbiota bucal, estes dados são coerentes, pois também destaca-se sua ação microbicida, por ter como princípio ativo a Clorexidina (que consiste de duas cadeias simétricas de 4-cloro fenil e dois grupos de biguanidas conectados pelo hexametileno). Relatos de outros pesquisadores confirmam que este anti-séptico possui atividade bacteriostática, bactericida e fungicida dependendo de

sua concentração, em soluções relativamente fracas⁶. Como detergente de atividade catiônica, tem ação tensoativa provocando o rompimento da membrana celular causando a saída de enzimas e metabólitos essenciais⁶. Segundo Trabulsi *et al.* (1999)³⁵, os detergentes mais eficazes contra os microorganismos são os catiônicos, isto é, aqueles que possuem carga positiva quando em solução. São geralmente compostos quaternários de amônio onde o átomo de nitrogênio está ligado a quatro radicais, geralmente orgânicos, sendo pelo menos um deles um composto de cadeia longa. São bacteriostáticos e bastante estáveis. São usados como desinfetantes e anti-sépticos.

O borato de sódio presente apenas na solução de Malvona[®] é um anti-séptico fraco mas eficiente no tratamento de estomatites aftosas e lesões provocadas pela *Candida albicans* e atua como agente tensoativo alterando a permeabilidade da membrana celular³⁵. Neste trabalho demonstrou ter uma eficiência em 85,70% das cepas identificadas de *Lactobacillus* quase semelhante ao Wash[®] que demonstra ser microbicida em 81,28% das cepas estudadas (Figura 1) o qual é um anti-séptico que tem o cloreto de cetilpiridínico com princípio ativo, é um composto monovalente catiônico o qual está dentro do grupo dos compostos quaternários de amônio¹⁹. Atua diminuindo a tensão superficial da água, tratando-se de um detergente catiônico cujo modo de ação sobre as bactérias da placa é similar ao da clorexidina¹⁴.

Este resultado foi análogo ao de alguns autores^{14,19,24,29,30} que estudaram estes anti-sépticos sobre a microbiota bucal e preconizam o uso de anti-sépticos a base de cloreto de cetilpiridínio várias vezes ao dia para que resultados de eficácia sejam comprovados.

Em relação a Malvatricin[®], observa-se na sua composição tirotricina, malva e quinosol. A tirotricina é o princípio ativo, o qual é um antibiótico oriundo do *Bacillus brevis*, composto pela gramicidina (em torno de 20 a 25%) e aproximadamente de 60% pela tirocidina, usualmente presente como hidrocloreto. É insolúvel em água, mas solúvel em álcool e propilenoglicol³. Possui ação bacteriostática ou bactericida dependendo da concentração. Atua sobre bactérias Gram-positivas, sendo largamente utilizada em uso local devido à suas características de ação tópica duradoura²⁰.

Quanto a sua atuação, 68,24% das cepas foram sensíveis a uma concentração 0,25%. Esta porcentagem reduzida frente à ação do Periogard[®] está em concordância com a seletividade da tirotricina, pois ela tem atuação melhor em bactérias Gram-negativas¹⁰, e os lactobacilos são bactérias Gram-positivas. Matula *et al.* (1988)²¹, demonstraram redução de 54,50% na

contagem de microorganismos anaeróbios na saliva após utilização de tirotricina.

O Flogoral[®], tem como o princípio ativo cloridrato de benzidamida, um derivado do indazol, que foi sintetizado em 1964 por Palazzo & Strani (1964)²⁸ e atua através da redução da permeabilidade capilar, bem como da ação da histamina, serotonina e bradicidina. Sua fórmula química é C₁₉H₂₃N₃O₂HCL, tendo sido introduzida no mercado da Alemanha em 1966 com o nome de Tantum[®]. Atua como analgésico e anti-inflamatório, estimula a cicatrização e acelera a recuperação dos tecidos lesados localizados na boca e garganta⁹.

É usado topicamente na pele, numa concentração de 3 a 5%, para bochechos ou sob a forma de *spray* na cavidade bucal numa concentração de 0,15% e em concentrações de 0,1% para irrigação vaginal²⁰. Obtivemos 6,63% das cepas sensíveis a uma concentração de 0,15%. Este resultado está intimamente relacionado a concentração e o modo de ação deste anti-séptico.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos são semelhantes quando compara-se a metodologia de difusão classicamente utilizada por Kirby Bawer^{17,34} com a metodologia da gota de Ribeiro & Soares (1998)³² a qual apresenta uma técnica mais fácil e mais rápida, portanto mais acessível aos laboratoristas. Em relação ao índice CPO-D encontrado neste trabalho, quando comparado ao levantamento de cárie dental do Ministério da Saúde de 1996⁴, está dentro do parâmetro médio.

A sensibilidade aos anti-sépticos revelou-se maior ao Periogard[®], Malvona[®], Wash[®] e Malvatricin[®] em grau decrescente em relação ao Flogoral[®] que mostrou não ser eficaz na redução dos *Lactobacillus* da saliva. Neste sentido verificou-se que os agentes tensoativos do Periogard[®], Malvona[®], Wash[®] demonstraram ser redutores de um dos grupos de microorganismos cariogênicos, portanto, agentes eficientes na redução da atividade de cárie, com melhor atuação que o Malvatricin[®]. Sendo que a Malvona[®] e Wash[®] apresentaram resultados aproximados por conterem o mesmo princípio ativo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABBOT Laboratórios do Brasil LTDA. *Monografia saúde oral: Wash*. [s.l.], 1989. (Mimeografado).

2. BERGEY'S, D.H. *Manual of determinative bacteriology*. 9.ed. Baltimore : Willians & Wilkens, 1994. p.566-568.
3. BONFIL, J.J. *et al.* The effect of formaldehyde: Tyrothricin combination placed in peridontal pockets in association with scaling and root planing. *J Parodontol*, v.10, n.3, p.305-314, 1991.
4. BRASIL. Ministério da Saúde. *Levantamento epidemiológico em saúde bucal: zona urbana*, Brasília, 1986. 137p. (Série C: estudos e projetos, 4).
5. BRAUNER, M.T. Controle químico da placa. Estudo comparativo entre a clorexidina e a alexina. *Rev APCD*, São Paulo, v.36, n.6, p.594-595, 1982.
6. BURNETT, G.W, SCHERP, H.W.S, SCHUSTER, G.S. *Microbiologia orale doenças infecciosas*. 4.ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 1978. p.101-102.
7. CAMARGO, M.D.M. *Textos de microbiologia oral*. 2.ed. Belo Horizonte : Universidade Católica de Minas Gerais, 1979. p.23-25.
8. CARDOSO, J. *Microbiologia bucal*. 2.ed. São Paulo: Livraria Editora Santos. 1998. p.31-49.
9. CUSSINO, R. Prime esperienze con un nuevo analgésico antiflogístico nel tratamiento del dolore post-operatorio. *Clin Europ*, n.6, p.509-516, 1965.
10. DENARDI, B.B. O uso da clorexidina na prática odontológica. *Rev APCD*, São Paulo, v.48, n.2, p.1279-1287, 1994.
11. FEIST, I.S., MICHELLI, G., SARIAN, R. Clorexidina, prós e contras. *Rev APCD*, São Paulo, v.43, n.1, p.20-23, 1989.
12. GIORGI, S.M., MICHELI, G. Agentes químicos no controle da placa bacteriana. Resumo das conclusões do Congresso da American Academy of Periodontology - 1989. *Rev APCD*, São Paulo, v.46, n.5, p.857-859, 1992.
13. GRANATH, I. *et al.* Salivary lactobacilli explain dental caries better than salivary streptococci in 4-5 year old children. *Scand J Dental Res*, Copenhagen, v.102, n.6, p.319-323, 1994.
14. GRANJEIRO, J.M. *et al.* O cloreto de cetilpiridínico e a placa bacteriana: uma revisão. *Rev APCD*, São Paulo, v.47, n.2, p.1019-1022, 1993.
15. GREENSTEIN, G., BERMAN, C.R., JAFFIN, R. Chlorexidina: an adjunct to Periodontal Therapy. *J Periodont*, Chicago, v.57, n.6, p.370-377, 1986.
16. JULIANO, C. *et al.* In vitro antibacterial activity of antiseptics against vaginal lactobacilli. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, Wiesbaden, v.11, n.12, p.1166-1169, 1992.
17. KONEMAN, E. DOWELL JR, S. *Diagnóstico microbiológico*. 2.ed. São Paulo : Panamericana, 1989. p.358-359.
18. LEHNER, T. *Imunologia das doenças da boca*. 3.ed. São Paulo : Editora Livraria Santos, 1996. p.29-47.
19. MACHADO, I.P. *et al.* Considerações gerais sobre a prevenção de cárie na primeira infância. *Rev Odontopediatr*, São Paulo, v.3, n.1, p.1-9, 1994.
20. MARTINDALE, W. *The extra pharmacopoeia*. 27.ed. London : The Pharmaceutical Press London, 1977. p.189.
21. MATULA, C., HILDEBRANT, M., NAHLER, G. Decontamination of the oral cavity. Effect of six local anti-microbial preparations in comparison to water and parafilm as controls. *J Intern Med Res*; v.16, p.98-106, 1988.
22. MENDES, M.M.S.G., PEREIRA, O.L. Agentes químicos para controle de placa bacteriana. *Rev Periodontia*, v.5, n.5, p.253-256, 1995.
23. MIRANDA, C.V. *Microbiologia oral*. Araraquara, 1989. p.58-59. Apostila da Disciplina de Microbiologia, promovida pela Universidade de Odontologia de Araraquara.
24. MOREIRA, E.J.G., NARESSI, W.G., VANTINE, A.S. Bochechos fluoretados. *Rev APCD*, São Paulo, v.41, n.1, p.18-23, 1987.
25. MOUTON, C., ROBERT, J.C. *Bacteriologia bucodental*. Barcelona : Masson, 1995. p.17-21.
26. MURRAY, P. *et al.* *Microbiologia médica*. 3.ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2000. p.465.
27. NESENGARD & NEWMAN. *Microbiologia oral e imunologia*. 2.ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 1997. p.265-270.
28. PALLAZO, G., STRANI, G. Chemical and biological non-specificity of anti-inflammatory drugs. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON NON STEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY DRUGS, 82., 1964. Milano. *International Congress Series*. Milano, 1964. p.434. (Excerpta Medica Foundation, Amsterdam).
29. PEREIRA, H.C. *Enxaguatórios bucais*. Rio de Janeiro : UFRJ, 1994. p.1-4. (Trabalho de apoio de Odontologia Social).

30. PINHEIRO, C.E. *et al.* Influência de bochechos com Cepacol sobre a placa dentária. Parte I e II. *RGO*, Porto Alegre, v.39, n.6, p.468-470, 1991.
31. RIBEIRO, M.C. *Apostila de Lactobacilos*. 3.ed. Campins, 1990. p.2-4. *Apostila da Disciplina de Microbiologia*, promovido pelo Curso de Odontologia, PUC-Campinas.
32. RIBEIRO, M.C., SOARES, M.M.S.R. *Microbiologia prática: roteiro e manual*. São Paulo : Atheneu, 2000. p. 41-62: Bactérias e fungos.
33. SLOTS, J. TAUBMAN, M.A. *Contemporary oral microbiology and immunology*. St Louis: [s.n.], 1992. p.22-35.
34. SILVA, C.H.M. *Bacteriologia*. Rio de Janeiro : Eventos, 1999. p.395.
35. TRABULSI, L.R., De TOLEDO, M.R, SILVA, N.P. *Microbiologia*. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 1999. p.355.

Recebido para publicação em 14 de setembro de 1999 e
aceito em 10 de novembro de 2000.