

# 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*

Effectivity of the chlorhexidine gluconate 0,12% and chlorhexidine digluconate 2% acquired in different hospital shops and drugstores in Cuiaba city, on *Candida albicans*

Alex Semenoff Segundo<sup>1</sup>, Álvaro Francisco Bosco<sup>2</sup>, Tereza Aparecida Delle Vedove Semenoff<sup>3</sup>, Grace Emanuelle Guerreiro Dias Rocatto<sup>4</sup>, Dhayane Macagnan Cirilo<sup>5</sup>, Samyra Lopes Buzelle<sup>5</sup>, Suzana de Oliveira Nunes<sup>6</sup>

## RESUMO

Avaliou-se a atividade antimicrobiana do digluconato de clorexidina (CI) a 2% e do gluconato de clorexidina a 0,12%, adquiridos em diferentes dentais e farmácias na cidade de Cuiabá (MT), sobre *Candida albicans*. Utilizaram-se 72 placas Petri, contendo meio de cultura ágar-Saboraud. Separaram-se a princípio seis placas e seis discos de papel embebidos em solução fisiológica a 0,9% (SF), depositados no centro das placas respectivas (controle negativo). Em 66 outras placas, semearam-se os microrganismos, colocando, no centro de seis placas, um disco de papel também embebido em solução fisiológica (controle positivo). Seguiu-se a colocação dos seis discos de papel nas 60 placas restantes, previamente impregnados com as substâncias testes (CL) e controle (SF), sendo depositado um em cada sextante. Os grupos foram analisados em três tempos experimentais de 8, 16 e 24 dias. Para a verificação dos resultados, usaram-se os halos de inibição de crescimento fúngico, medidos com paquímetro digital, com o auxílio de lupa estereoscópica. Percebeu-se aos 8, 16 e 24 dias uma ausência de diferença estatística entre o digluconato de clorexidina a 2% e o gluconato de clorexidina a 0,12%. Concluindo, o gluconato de clorexidina a 0,12% e o digluconato de clorexidina a 2% adquiridos em diferentes dentais e farmácias de Cuiabá-MT exerceram ação antimicrobiana sobre *Candida albicans*.

**UNITERMOS:** clorexidina, armazenagem, *Candida albicans*. R Periodontia 2006; 17:00-00.

<sup>1</sup> Doutorando em periodontia - Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba - UNESP e professor do curso de odontologia do Centro Universitário de Várzea Grande - MT - UNIVAG

<sup>2</sup> Professor adjunto disciplina de periodontia, Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba - UNESP

<sup>3</sup> Doutorando em Estomatologia da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba - UNESP e Professora do Curso de Odontologia do Centro Universitário de Várzea Grande - MT - Univag

<sup>4</sup> Fisioterapeuta- Centro Universitário de Várzea Grande - MT - Univag

<sup>5</sup> Graduando de farmácia - Centro Universitário de Várzea Grande-UNIVAG

<sup>6</sup> Graduando de biologia - Centro Universitário de Várzea Grande-UNIVAG

## INTRODUÇÃO

DAVIES (1973) classificou a clorexidina como um detergente aniônico do grupo bisguanida, praticamente insolúvel em água e que, por isso, é preparado na forma de um sal, o digluconato de clorexidina, fato que aumenta sua solubilidade. É uma substância antimicrobiana de largo espectro, pois possui efetividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, além de possuir ação fungicida. Sua substantividade mantém-se mesmo na presença de sangue e demais fluidos corporais (RÖLLA *et al*, 1970, Silva, 1999, ROSENTHAL *et al*, 2004), fato relevante nos procedimentos realizados pelo profissional da odontologia.

Desde o estudo clássico de LÖE & SCHIOTT, (1970), a clorexidina tornou-se o padrão ouro, em relação à capacidade de evitar a formação do biofilme microbiano. Além de enxaguatório, esse fármaco também é utilizado na desinfecção de pele, como sabonetes, em hospitais, e em muitas outras funções (BOSCO *et al*, 2004, FILGUEIRAS *et al*, 2004, JORGE *et al*, 2005), o que torna importante os estudos geradores de conhecimento da sua forma de uso.

A cidade de Cuiabá localiza-se na região Centro-Oeste, é conhecida por ter elevadas temperaturas durante todo o ano. Considerando a necessidade de garantir controle de qualidade na aquisição,

armazenamento, conservação e dispensação de produtos dessa natureza, os comerciantes de fármacos são obrigados a se adaptar, dispondo seus materiais de forma adequada para uso (ANVISA, 2006). Entretanto, existem variações de forma de armazenamento.

Estudos que viabilizem informações sobre a capacidade antimicrobiana da clorexidina em ambientes expostos a diferentes temperaturas e umidades parecem ser uma forma útil de obter dados capazes de melhorar o olhar para essa questão.

De forma que o objetivo deste trabalho foi verificar se existem diferenças nas condições de armazenamento do digluconato de clorexidina a 2% e do gluconato de clorexidina a 0,12%, entre as diversas dentais e farmácias da cidade de Cuiabá (MT), avaliando-se a atividade antimicrobiana das amostras obtidas sobre *Candida albicans*.

## METODOLOGIA

Usaram-se no estudo o gluconato de clorexidina a 0,12% (Periogard – Colgate-Palmolive Indústria Brasileira. São Bernardo do Campo – SP) e o digluconato de clorexidina a 2% (F.G.M do Brasil. Joinville - SC). Esses agentes foram adquiridos em diversos pontos da cidade de Cuiabá-MT, sendo em número de cinco os recipientes para o gluconato de clorexidina a 0,12% obtido em farmácias, e outros cinco, os recipientes para o digluconato de clorexidina a 2%, conseguidos em dentais. Mensuraram-se a temperatura e a umidade relativa do ar nos locais de exposição dos agentes (quadro 1). Esse procedimento foi realizado por volta do meio-dia. O instrumento de aferição foi um aparelho termômetro-higrômetro digital (TFA 30.5000 – Brasil). Antes do ensaio, o aparelho foi testado, comparado com outros dois termômetro-higrômetros e um termômetro convencional, obtendo-se o mesmo índice na umidade do ar e diferença na temperatura de 0,1°C.

Para a realização desse estudo foi utilizada uma cepa de *Candida albicans*, com registro ATCC 10231. Os microrganismos foram levados à estufa em temperatura constante de 37°C, por 24 horas para replicação em BHI.

Usaram-se no total 72 placas Petri com meio de cultura ágar-Saboraud. Desse total, 66 placas foram usadas na reativação da cepa, sendo 60 no teste das substâncias e seis na avaliação do crescimento dos microorganismos (controle positivo). No restante das seis placas, não se realizou a semeadura dos microorganismos: teve-se por objetivo avaliar a ausência de contaminação (controle negativo). A substância escolhida como controle foi a solução fisiológica a 0,9%, e as substâncias testes foram o gluconato de clorexidina a 0,12% e o digluconato de clorexidina a 2%. Os microorganismos estavam na concentração de  $3 \times 10^8$ , utilizando-se quantidade padronizada com uma pipeta em 0,1 ml de caldo, o qual foi distribuído com o auxílio de

uma alça de Drigalsky.

O passo seguinte foi constituído da inserção dos discos de papel absorvente com 5 mm de diâmetro, obtido de filtro de papel para café (Melitta ® nº 103. Santo Amaro - SP), através do uso de um perfurador de papel: os mesmos foram esterilizados e embebidos em solução fisiológica a 0,9% nas placas controle positivo e controle negativo. Nas placas em que se testaram as substâncias adquiridas nas farmácias e dentais, inseriram-se os discos de papel esterilizado em dois grupos, divididos em 30 placas com digluconato de clorexidina a 2% e 30 placas com gluconato de clorexidina a 0,12%, deste modo: amostra 1, amostra 2, amostra 3, amostra 4, amostra 5 e um disco, contendo solução fisiológica a 0,9% como controle. A inserção dos discos de papel seguiu o exemplo de um mostrador de relógio, no qual poder-se-ia observar às 12 h a amostra 1, às 14 h a amostra 2, às 16 h a amostra 3, às 18h a amostra 4, às 20 h a amostra 5, e às 22 h a solução fisiológica a 0,9%. Após o término dessa etapa, as placas foram colocadas na estufa a 37°C e mantidas nessa condição até a coleta dos dados, escolhendo-se escolhendo-se 10 placas aleatoriamente de cada substância teste, nos tempos experimentais de 8, 16 e 24 dias, respectivamente.

Para a mensuração dos halos de inibição, uma única examinadora cega e treinada utilizou uma lupa estereoscópica (Estek – São Paulo) e um paquímetro digital (Mitutoyo – Suzano, SP). Verificou-se o treinamento intra-examinador de modo que, a cada cinco placas mensuradas o auxiliar de laboratório entregava aleatoriamente à examinadora uma das placas anteriores para verificar se os dados fornecidos coincidiam com os da mensuração fornecida anteriormente, sendo observados 95% de acerto.

Após a coleta dos dados nos devidos tempos experimentais, realizaram-se as médias, que foram comparadas entre si e submetidas ao teste estatístico ANOVA (análise de variância), com teste corretivo de Bonferroni, para um nível de significância de 5%.

## RESULTADOS

Os resultados do presente estudo demonstram os parâmetros relacionados às diferentes médias e desvios padrões em milímetros (mm) dos halos de inibição encontrados nos tempos experimentais de 8, 16 e 24 dias para clorexidina a 2% e 0,12% e estão apresentados em forma de tabela.

No tempo experimental de oito dias, as amostras da clorexidina a 0,12% não demonstraram diferenças estatísticas entre si, bem como as amostras da clorexidina a 2%, os agentes somente demonstraram diferenças estatísticas comparadas ao grupo controle, como mostra a **tabela 1**.

Pôde-se verificar o mesmo padrão de resultados nos tempos experimentais de dezesseis e vinte e quatro dias também explíci-

**Tabela 1**

DESCRIÇÃO DAS MÉDIAS E DESVIOS PADRÕES DOS HALOS DE INIBIÇÃO NOS TEMPOS EXPERIMENTAIS DE 8, 16 E 24 DIAS												
	Amostra 1		Amostra 2		Amostra 3		Amostra 4		Amostra 5		Controle	
	m.	±.	m.	±.	m.	±.	m.	±.	m.	±.	m.	±.
<b>Oito dias</b>												
Clor.2%	4,8a	0,5	4,8a	0,5	4,8a	0,8	4,9a	0,7	4,8a	0,5	1,8b	0,5
Clor. 0,12%	3,5a	0,6	3,2a	0,4	3,3a	0,5	3,5a	0,4	3,2a	0,2	0,5b	0,3
<b>Dezesseis dias</b>												
Clor. 2%	4,9a	0,4	4,8a	0,6	4,8a	0,6	5,5a	0,1	4,8a	0,6	1,8b	0,5
Clor. 0,12%	3,3a	0,4	3,3a	0,2	3,4a	0,4	3,5a	0,2	3,3a	0,3	1,4b	0,3
<b>Vinte e quatro dias</b>												
Clor. 2%	4,9a	0,5	4,8a	0,2	4,6a	1,1	4,7a	1,4	4,5a	1,0	1,3b	0,8
Clor 0,12%	3,0a	1,2	3,1a	0,7	3,0a	1,2	3,1a	1,0	3,1a	1,0	1,3b	0,9

Letras diferentes nas linhas representam diferença estatística, para um nível de significância de 5%. As siglas (clor, m e ±) representam clorexidina, as médias e os desvios padrões em milímetros respectivamente.

**Quadro 1**

DEMONSTRATIVO DAS TEMPERATURAS E UMIDADES DAS RESPECTIVAS DENTAIS E FARMÁCIAS.										
	Amostra 1		Amostra 2		Amostra 3		Amostra 4		Amostra 5	
	Temp.	Umid.	Temp.	Umid.	Temp.	Umid.	Temp.	Umid.	Temp.	Umid.
Dentais	36,8°C	23%	34,4°C	31%	35,70°C	21%	37,0°C	27%	37,1°C	27%
Farmácias	37,7°C	34%	32,5°C	28%	33,2°C	26%	37,1°C	28%	42,0°C	26%

tos na **tabela 1**.

As placas de controle negativo apresentaram-se livres de qualquer crescimento fúngico ou microbiano, e as de controle positivo demonstraram crescimento uniforme das leveduras por toda a extensão do meio de cultura.

**DISCUSSÃO**

Estudos para a avaliação da eficiência antimicrobiana da clorexidina *in vitro* são bem utilizados (CURY *et al*, 2000, ESTRELA *et al*, 2003, CARSON *et al*, 2005). A metodologia de avaliação antimicrobiana escolhida nesse trabalho foi a da mensuração dos halos de inibição que, embora apresente limitações, constitui-se uma forma economicamente viável e tranqüilamente reproduzível, bem como amplamente utilizada na literatura (CARSON *et al*, 2005, CURY *et al*, 2000, ALMAS *et al*, 2005, PEREIRA *et al*, 2005).

Alguns autores têm observado diferenças nos resultados, principalmente em função da metodologia de avaliação, provavelmente por características físico-químicas das substâncias testadas e da difusão da clorexidina no agar (ESTRELA *et al*, 2001, ESTRELA *et al*, 2003).

Escolheram-se dez placas por tempo experimental, por se-

rem uma amostra, próxima a utilizada em muitos trabalhos *in-vitro*. Apesar da falta do cálculo da amostra observam-se princípios de pesquisa como cegamento, treinamento e escolha aleatória das placas, auxiliando na confiabilidade dos resultados (ALTMAN, 1991, SUSIN & RÖSING, 1999).

O microorganismo *Candida albicans* foi escolhido para o estudo por estar envolvido com várias patologias orais e sistêmicas. Nos hospitais e ambulatórios percebe-se grande prevalência, fato muitas vezes capaz de levar à complicação nos tratamentos, como as candidoses (UETA *et al*, 2001, PINHO RESENDE *et al*, 2002).

Os resultados do trabalho apresentam uma ausência de diferença estatística, tanto para o gluconato de clorexidina a 0,12% como para o digluconato de clorexidina a 2%, nos diferentes tempos experimentais. Apesar de existirem altas temperaturas e baixa umidade do ar, esses fatores foram incapazes de modificar a eficiência dos fármacos sobre a *Candida albicans in vitro*. A interferência da temperatura na ação antimicrobiana foi objeto de estudo de EVANOV *et al*, (2004), testando a clorexidina e o hidróxido de cálcio a temperaturas de 37°C e 46°C. Em seus resultados percebeu-se uma manutenção da eficiência antimicrobiana dos dois agentes a 37°C e a diminuição da eficiência de ambos os agentes a temperaturas a 46°C, ocorrência

que nos suscitou dúvidas sobre a efetividade da clorexidina armazenada em Cuiabá – MT, por se tratar de uma cidade com temperaturas bastante elevadas.

As informações fornecidas pelos fabricantes sobre armazenamento dos produtos usados no estudo não mencionam quais condições de conservação devem ser utilizadas pelos estabelecimentos comerciais e pelos consumidores. Informações como temperatura e umidade são itens importantes para a segurança do consumidor, sendo que a Lei 8078/90 determina que os fornecedores divulguem esses dados. Em estudo sobre o tema, DA SILVA *et al* (2000) observaram a bula de 48 fármacos de mais de 26 fabricantes. Seus resultados sobre a questão armazenamento descrevem ser as bulas adequadas, pois informam os cuidados necessários em relação à temperatura, umidade e violação de rótulo, fato não percebido nos medicamentos analisados.

Os tempos experimentais de 8, 16 e 24 dias utilizados no estudo são longos se comparados a estudos usando metodologia de halo de inibição (CURY *et al*, 2000, ESTRELA *et al*, 2001, ESTRELA *et al*, 2003, CARSON *et al*, 2005); entretanto, a substantividade da clorexidina tem sido testada e percebida recentemente (ROSENTHAL *et al* 2004, DAMETO *et al*, 2005), fato encontrado nesse trabalho.

Apesar de os resultados apresentarem uma eficiência satisfatória, é importante deixar claro a necessidade de um aprofundamento nos estudos das estruturas físico-químicas do produto e do efeito antimicrobiano em um maior número de microorganismos, quando expostos a alta temperatura e baixa umidade.

Concluindo, de acordo com a metodologia empregada neste estudo, não foram observadas diferenças de armazenamento dos produtos testados entre dentais e farmácias de Cuiabá-MT, no que se refere à temperatura e umidade.

As amostras de gluconato de clorexidina a 0,12% bem como as de digluconato de clorexidina a 2% adquiridos em dentais e

farmácias de Cuiabá -MT, exerceram ação antimicrobiana estatisticamente semelhantes sobre *Candida albicans*.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao UNIVAG - Centro Universitário de Várzea Grande – MT e a Fapemat - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Mato Grosso, (APQ0036/2005) pelo suporte financeiro.

## ABSTRACT

The antimicrobial activity of 0.12% and 2% chlorhexidine gluconate (Cl), acquired at different hospital-based pharmacies and drugstores in Cuiabá-MT, on *Candida albicans* was evaluated. Seventy-two petri plates were used, containing agar-Saboraud culture medium. Initially, 6 plates were separated and 6 paper circles moistened in physiological solution were placed in the center of the respective plates (negative control). On another 66 plates, microorganisms were inoculated and in 6 plates, a paper circle was placed in the center (positive control). On the remaining 60 plates, 6 paper circles per plate were added, filled with test (Cl) and control substances (SF), one substance per sextant. The groups were analyzed after three experimental periods: 8, 16 and 24 days. For verification of the results, halo circles were used for the inhibition of bacterial growth, measured with a digitalis calibrator and the help of a stereoscopic magnifying glass. Observations on days 8, 16 and 24 revealed that no statistical differences occurred between 0.12% and 2% chlorhexidine gluconate. In conclusion, 0.12% and 2% chlorhexidine gluconate acquired in different hospital-based pharmacies and drugstores in Cuiabá, presented clear antimicrobial action against *Candida albicans*.

**UNITERMS:** chlorexidine, drug storage, *Candida albicans*

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- 1- Almas K, Skaug N, Ahamad I. An in vitro antimicrobial comparison of miswak extract with commercially available non-alcohol mouthrinses. *Int J Dent Hygiene* 2005; 3: 18-24.
- 2- Altman, D.C. *Practical statistics for medical Research*. Boca Raton: Chapman & Hall/CRC, 1991, 611p.
- 3- Anvisa, Ministério da Saúde, Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/328\\_99.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/328_99.htm), 11/08/2006 as 16:50 Hs.
- 4- Bosco, AF; Okamoto T; Nagata, MJH; Machado GJR. Efeitos da nicotina no processo de reparo de feridas cutâneas associadas à aplicação tópica de clorexidina. *Rev odonto ciênc* 2004;19: 207-213.
- 5- Carson KR, Goodell GG, Macclanahan SB, Comparation of the antimicrobial activity of six irrigants on primary endodontic pathogens. *J Endodontics* 2005; 31: 471-473.
- 6- Cury JA, Rocha EP, Koo H, Francisco SB, Cury AADB. Effect of saccharin on antibacterial activity of chlorhexidine gel. *Braz Dent Journal* 2000; 11: 29-34.
- 7- Da Silva T, Dal-Pizzol F, Bello CM, Mengue SS, Schenkel EP. Bulas demedicamentos e a informação adequada ao paciente. *Rev de saúde pública* 2000; 34: 184-189.
- 8- Dametto FR, Ferraz CCR, Gomes BPFA, Zaia AA, Teixeira FB, DDS, MSc, PhD, Souza-Filho FJ. 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* 2005; 99: 768-72.
- 9- Davies A. The Mode of Action of Chlorhexidine. *J Periodontal Res* 1973; 8, Suppl.12; 68-75.
- 10- Estrela C, Bammann LL, Pimenta FC, Pécora JD. Control of Microorganisms in Vitro by Calcium Hydroxide Pastes. *Int Endod J* 2001; 34: 341-345.
- 11- Estrela C, Ribeiro, RG, Estrela, CRA, Pécora JD, Sousa-Neto MD. Antimicrobial effect of 2% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine tested by different methods. *Braz Dent J* 2003; 14: 58-62.
- 12- Evanov C, Liewehr F, Buxton TB, Joyce AP. Antibacterial efficacy of calcium hydroxide and chlorhexidine gluconate irrigants at 37°C and 46°C. *J Endodontics* 2004; 30: 653-657.
- 13- Filgueiras JL, Caçado RP, Silva CHPM, Salim MAA. 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 odontol* 2004; 61: 195-198.
- 14- Jorge, AOC, Koga-Ito CY, Maegi B; Barbosa APP, Komiyama EY. Desinfecção de superfície em odontologia: avaliação do álcool gel 70° INPM, lenços embebidos em solução de clorexidina e spray de cloreto benzalcônio. *RGO* 2005; 53: 151-154.
- 15- Løe H, Schiott CR. The Effect of Mouthrinses and Topical Application of Chlorhexidine on the Development of Dental Plaque and Gingivitis in Man. *J Periodontal Res* 1970; 5: 79-83.
- 16- Pereira JV, Bergamo DCB, Pereira JO, França SC, Pietro RCLR, Silva-Sousa YC. Antimicrobial Activity of *Arctium lappa* Constituents Against Microorganisms Commonly Found in Endodontic Infections. *Braz Dent J* 2005; 16: 192-196.
- 17- Pinho Resende JC, Resende MA, Saliba JL. Prevalence of *Candida* spp. in hospitalized patients and their risk factors. *Mycoses* 2002; 45: 306-312.
- 18- Rølla G, Løe H, Schiott CR. The Affinity of Chlorhexidine for Hydroxyapatite and Salivary Mucins. *J Periodontal Res* 1970; 5: 90-95.
- 19- Rosenthal S, Spangberg L, Safavi K, Conn F. Chlorhexidine substantivity in root canal dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004; 98: 488-92.
- 20- Silva CAG. Efetividade Antimicrobiana do Hipoclorito de Sódio e Clorexidina como Irrigantes Endodônticos. {Mestrado}. Canoas: Universidade Luterana do Brasil; 1999. 100 p.
- 21- Susin C & Rösing CC. *Praticando odontologia baseada em evidência*. Canoas: Editora da Ulbra; 1999.
- 22- Ueta E, Tanida T, Yoneda K, Yamamoto T, Osaki T. Increase of *Candida* cell virulence by anticancer drugs and irradiation. *Oral Microbiol Immunol* 2001; 16: 243-249.

Endereço para correspondência:

Alex Semenoff Segundo

Rua da Aviação, 1800 - Bloco11 - Apto. 11 - Bairro Aviação

CEP: 16056 725 - Araçatuba (SP)

Fones (18) 3608-1909 ou (18) 9722-1424.

E-mail : semenoff@uol.com.br