

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**Marcel da Silva Garrote**

---

**Efeito antibacteriano de antissépticos bucais  
frente ao *S. mutans*, *E. faecalis* e *P. aeruginosa***

---

**GOIÂNIA  
2013**

**Marcel da Silva Garrote**

---

---

**Efeito antibacteriano de antissépticos bucais  
frente ao *S. mutans*, *E. faecalis* e *P. aeruginosa***

---

---

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

**Orientador: Prof. Dr. Carlos Estrela**

**Co-orientadora: Profa. Dra. Cyntia Rodrigues de Araújo Estrela**

**GOIÂNIA  
2013**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS**

**BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Aluno: Marcel da Silva Garrote**

**Orientador: Prof. Dr. Carlos Estrela**

**Co-orientadora: Profa. Dra. Cyntia Rodrigues de Araújo Estrela**

**Membros:**

**1. Prof. Dr. Carlos Estrela (presidente)**

**2. Prof. Dr. Hugo Alexandre de Souza**

**3. Prof. Dr. Julio Almeida Silva**

**Suplentes:**

**1. Prof. Dr. Orlando Aguirre Guedes**

**2. Prof. Dr. Daniel de Almeida Decurcio**

**Data: 11/12/2013**

## DEDICATÓRIA

---

*Dedico aos meus pais, Celso Garrote, in memoriam, um dos pioneiros da Odontologia no Estado de Goiás, que tanta saudade sinto e que tanta falta nos faz. E à minha mãe Maria Miranda Garrote, pelos ensinamentos de amor, compreensão, fé e coragem*

*A cada dia que vivo, mais me convenço de que o desperdício da vida está no amor que não damos, nas forças que não usamos, na prudência egoísta que nada arrisca e que, esquivando-se do sofrimento, perdemos também a felicidade.*

*(Carlos Drummond de Andrade)*

## AGRADECIMENTOS

---

*Em primeiro lugar a Deus, pelo sopro da vida, pela sua infinita graça, luz, amor e misericórdia;*

*Ao Prof. Carlos Estrela, meu amigo, orientador e grande mestre, por toda paciência, dedicação e conhecimento e por ter me aberto as portas da docência no ensino superior sou eternamente grato;*

*À Prof<sup>a</sup>. Cyntia Estrela, pelo auxílio e paciência em repassar seu conhecimentos durante a execução deste projeto;*

*À Prof<sup>a</sup>. Ana Helena Alencar, que sempre disponibilizou seu tempo durante esta caminhada e muito contribuiu para o nosso crescimento profissional e pessoal;*

*Às minhas irmãs Mariza, Marinez e Celma Garrote, sempre presentes na minha vida e que sempre me ajudam em todos os momentos que necessito. Agradeço especialmente à Celma, que a considero como minha segunda mãe;*

*À Anamaria, minha esposa e amada, que não mediu esforços e muito me incentivou para a realização desse sonho;*

*Aos queridos filhos, Celso e Marcel Filho, e enteados, Isadora, Nathália e Nelson, que souberam entender a minha ausência e me apoiaram;*

*Ao Prof. Luiz Humberto Cançado, pela oportunidade do convívio e amizade;*

*Aos amigos e irmãos de alma Felipe Cavalcanti, Omar Zina, Daniel Decurcio, Julio Almeida, Olavo Porto e Orlando Guedes, por todo o apoio, companheirismo e pelos momentos de convivência e aprendizagem;*

*À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Denise Alves, pelo auxílio na execução de etapas essenciais para a conclusão deste trabalho;*

*À Valdecina Quirino, pela paciência e orientação de sempre nos atender da melhor maneira;*

*Ao Prof.Dr. Paulo César da Veiga Jardim, pela competência na condução do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde;*

*Aos demais Professores e colegas do mestrado, pela convivência saudável e constante estímulo na busca de uma evolução científica e pessoal;*

*Ao curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da UFG pela oportunidade da realização do curso de mestrado;*

*À CAPES pelo apoio que permitiu a realização e conclusão deste curso.*

## SUMÁRIO

---

<b>Lista de Tabelas e Figuras.....</b>	<b>07</b>
<b>Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos.....</b>	<b>08</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>09</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>11</b>
<b>Introdução.....</b>	<b>13</b>
<b>Objetivo.....</b>	<b>17</b>
<b>Metodologia.....</b>	<b>18</b>
<i>Indicadores biológicos.....</i>	<i>18</i>
<i>Soluções experimentais.....</i>	<i>20</i>
<i>Teste de difusão em ágar.....</i>	<i>20</i>
<i>Teste por exposição direta.....</i>	<i>23</i>
<b>Resultados.....</b>	<b>25</b>
<i>Teste de difusão em ágar.....</i>	<i>25</i>
<i>Teste por exposição direta.....</i>	<i>25</i>
<b>Discussão.....</b>	<b>28</b>
<b>Conclusões.....</b>	<b>36</b>
<b>Referências .....</b>	<b>37</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>41</b>



## LISTA DE TABELAS E FIGURAS

---

<b>Figura 1.</b>	Processo de obtenção das suspensões microbianas.....	19
<b>Figura 2.</b>	Representação esquemática do teste de difusão em ágar.....	22
<b>Figura 3.</b>	Representação esquemática do teste por exposição direta.....	24
<b>Tabela 1.</b>	Médias dos diâmetros das zonas de inibição microbiana das soluções antissépticas por meio de difusão em ágar (em milímetros).....	26
<b>Tabela 2.</b>	Efeito antibacteriano das soluções antissépticas em teste por exposição direta.....	27

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

---

ATCC – American type culture collection

BAGN – Bacilos aeróbios Gram-negativos

BHI - Brain heart infusion

BHIA – Brain heart infusion agar

CAGP – Cocos aeróbios Gram-positivos

°C – Graus Celsius

µL – Microlitro

µg – Micrograma

mg – Miligrama

mL – Mililitro

mm – Milímetro

mm<sup>3</sup> – Milímetro cúbico

% - Porcentagem

## RESUMO

---

**Objetivo:** avaliar o efeito antibacteriano de antissépticos bucais sobre *S. mutans*, *E. faecalis* e *P. aeruginosa*, por meio de testes de difusão em ágar e teste por exposição direta. **Metodologia:** Cepas de *S. mutans* (ATCC 25175), *E. faecalis* (ATCC 29212) e *P. aeruginosa* (ATCC 27853) foram inoculadas em 7 mL de BHI e incubadas a 37°C por 24 horas. Para o teste de difusão em ágar, 13 placas de Petri com 20 mL de BHIA foram inoculadas com 0,1 mL das suspensões microbianas, com auxílio de *swab* esterilizados, de modo a se obter um crescimento confluyente. Trinta e seis discos de papel com 9 mm de diâmetro foram imersos nas soluções experimentais de cloreto de cetilpiridínio 0,07%, cloreto de cetilpiridínio 0,075%, gluconato de clorexidina 0,12% e cloreto de benzalcônio 0,13% mg durante um minuto. A seguir, três discos de papel contendo uma das soluções antissépticas foram colocados sobre a superfície do BHIA. As placas foram mantidas por uma hora em temperatura ambiente e incubadas a 37°C por 48 horas. Os diâmetros dos halos de inibição microbiana foram medidos valendo-se de duas medidas de forma perpendicular entre si, sendo obtida a média de seus comprimentos. Para o teste de exposição direta, 576 cones de papel absorventes esterilizados n°50 foram imersos na suspensão de micro-organismos por 5 minutos, e a seguir foram colocados em placas de Petri e cobertos com 10 mL de uma das soluções testes. Em intervalos de 1,5, 10 e 30 minutos, 3 cones de papel absorventes foram retirados do contato com as substâncias, transportados individualmente e imersos em 7 mL de Lethen Broth, e incubados a 37°C por 48 horas. O crescimento microbiano foi avaliado pela turbidez do meio de cultura. Um inóculo de 0,1 mL obtido do Lethen Broth foi transferido para 7 mL de BHI, e incubado nas mesmas condições descritas. O

crescimento microbiano foi novamente avaliado pela turbidez do meio de cultura.

**Resultados:** Os halos de inibição foram maiores que 10 mm para todas as substâncias e em todos os micro-organismos. A solução de cloreto de benzalcônio apresentou efeito antibacteriano contra os indicadores biológicos após 5 minutos em teste por exposição direta, enquanto que o cloreto de cetilpiridínio e o gluconato de clorexidina apresentaram efeito antibacteriano somente após 10 minutos. **Conclusão:** As soluções antissépticas estudadas apresentaram efeito antibacteriano por contato direto frente *S. mutans*, *E. faecalis* e *P. aeruginosa*.

## ABSTRACT

---

**Purpose:** to evaluate the antibacterial effect of oral antiseptics (cetylpyridinium chloride, chlorhexidine gluconate and benzalkonium chloride) on *S. mutans*, *E. faecalis* and *P. aeruginosa*, determined by agar diffusion test and direct exposition test. **Methods:** The strains were inoculated in 7 mL BHI and incubated at 37°C for 24 hours. For agar diffusion test, 13 Petri plates with 20 mL BHIA were inoculated with 0.1 mL of microbial suspensions, aided by sterilized swabs, obtaining a confluent growth. Thirty six paper discs with 9 mm diameter were immersed in experimental solutions (cetylpyridinium chloride 0.07%, cetylpyridinium chloride 0.075%, chlorhexidine gluconate 0.12% and benzalkonium chloride 1.30 mg) for 1 minute. Following, at each plate, 3 paper discs containing irrigant solutions were put on BHIA surface. The plates were kept for 1 hour at environmental temperature and incubated at 37°C for 48 hours. Inhibition zones were measured over the paper discs containing the solutions, using two perpendicular measurements and obtaining the mean value. For direct exposition test, 516 sterilized paper points #50 were immersed on microorganisms suspension for 5 minutes, put in Petri plates and covered with 10 mL of irrigant solution. At 1, 5, 10 and 30 minutes intervals, 3 paper points were removed from substances contact, transported individually and immersed in 7 mL Letheen Broth, and incubated at 37°C for 48 hours. Bacterial growth was evaluated by medium turbidity. An inoculum of 0.1 mL Letheen Broth was transferred to 7 mL BHI, and incubated at the same conditions previously described. Bacterial growth was again evaluated by medium turbidity. **Results:** Inhibition zones were greater than 10 mm for all substances and in microorganisms tested. Benzalkonium chloride presented antibacterial effect against the biological markers after

5 minutes in direct exposition, while cetylpyridinium chloride and chlorhexidine gluconate presented antibacterial effect against all the microorganisms after 10 minutes.

**Conclusion:**Theantiseptic solutions presented antibacterial effect against *S. mutans*, *E. faecalis* e *P. aeruginosa*.

## INTRODUÇÃO

---

Os micro-organismos da cavidade bucal comumente se organizam em biofilmes na forma de placa dentária aderida aos tecidos duros e moles da boca. O biofilme bacteriano é considerado um fator de extrema importância na etiologia das doenças cárie dentária e periodontal, bem como em infecções pós-cirúrgicas (TIMMERMAN & VAN DER WEIJDEN, 2006).

A boca abriga diferentes espécies microbianas que podem estar distribuídas em vários ecossistemas. O contato da saliva com os tecidos bucais possibilita a presença destas células oriundas de diferentes regiões (SHEARER, 1996; SPRATT, 2004). A saliva é um fluido corporal que mantém contato com toda a superfície bucal. Suas características influenciam a microbiota à medida que aumentam ou reduzem sua capacidade de sobrevivência. Na saliva, verifica-se a presença de proteínas que podem funcionar como receptores de ligação, favorecendo a adesão de micro-organismos à superfície dentária. Além disso, esta se apresenta como fonte primária de nutrientes para um número de aproximadamente  $10^8$ - $10^9$  micro-organismos viáveis/mL (SCHONFELD, 1992; MARSH, 2000).

Os dentes apresentam uma superfície mineralizada, não descamativa, que favorece o desenvolvimento de grandes depósitos microbianos. Apesar de mais de 700 espécies bacterianas terem sido isoladas e caracterizadas na placa dentária, ainda não foi possível identificar todas elas (SOCRANSKY & HAFFAJEE, 2002, 2005).

As doenças infecciosas bucais contribuem como um dos principais fatores de risco para as alterações sistêmicas. A cárie dentária é uma doença infecciosa da boca, multifatorial, com fatores genéticos, ambientais, dietéticos e bacterianos. Um

considerável número de estudos evidenciou uma associação significativa entre o *Streptococcus mutans* e o início de lesões cariosas (CURTISS, 1985; LOESCHE, 1986, 1993; CAUFIELD & WALKER, 1989; MATSUMOTO *et al.*, 2006).

O *S. mutans* é uma bactéria Gram-positiva que apresenta elevada capacidade de fermentação, acumulando, portanto, grande quantidade de ácidos e promovendo redução de pH. É um micro-organismo facultativo capaz de produzir polissacarídeos extracelulares e intracelulares que favorecem a aderência microbiana (LOESCHE, 1993). O *E. faecalis* constitui-se também em uma bactéria de importância na boca, relacionada com as infecções endodônticas e hospitalares que tem sido objeto de vários estudos (MOLANDER *et al.*, 1998; SUNDQVIST *et al.*, 1998; PORTENIER *et al.*, 2003). Esta caracteriza-se como bactéria Gram-positiva, facultativa, que apresenta como fatores de virulência a produção da substância de agregação e de agentes de adesão superficial que favorecem sua aderência às células do hospedeiro e matrizes extracelulares, facilitando a invasão tecidual (PORTENIER *et al.*, 2003). Além destes aspectos que destacam esta bactéria como importante nas infecções endodônticas, deve-se ressaltar a sua capacidade de sobreviver em condições adversas, como em ambientes de elevado pH e elevadas concentrações de cloreto de sódio (SLOTS & TAUBMAN, 1992; MOLANDER *et al.*, 1998). A *Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria Gram-negativa, aeróbia facultativa. Esta bactéria é um patógeno oportunista, que raramente causa doenças em um sistema imunológico saudável, mas explora eventuais fraquezas do organismo para estabelecer um quadro de infecção. Essa característica, associada à sua resistência natural a um elevado número de antibióticos e antissépticos justificam sua alta frequência em ambiente hospitalar. Uma das hipóteses levantadas é o uso incorreto desses desinfetantes (SLOTS & TAUBMAN, 1992).



Socransky & Haffajee (1992) classificaram os micro-organismos como patógenos em potencial ou não. Assim, para que um micro-organismo possa ser considerado patógeno, este deve estar associado a uma doença; ser evidenciado em número elevado nos sítios doentes; estar ausente ou reduzido nos sítios que demonstrem resolução clínica; induzir resposta do hospedeiro na forma de uma alteração celular ou resposta imune humoral; ser capaz de causar doença em modelos de animais experimentais; demonstrar fatores de virulência responsáveis por permitir ao micro-organismo causar destruição dos tecidos do hospedeiro.

Outro aspecto de relevância à microbiota bucal relaciona-se à presença de bactérias no sangue (bacteremia), que constitui um meio pelo qual as infecções locais se espalham para órgãos distantes. Normalmente é transitória, devido a uma resposta vigorosa do sistema imune quando a bactéria é detectada no sangue. A endocardite infecciosa representa uma infecção rara, porém séria, envolvendo as válvulas cardíacas ou as superfícies endoteliais do coração (VILLORIA & COSTINHA, 2013). Outro fator crítico associado ao risco da microbiota bucal é o manejo dos tecidos bucais, que podem favorecer a invasão de bactérias na corrente sanguínea.

Desta forma, um dos recursos para o controle da microbiota bucal é o emprego de colutórios (enxaguatórios) bucais, que têm sido utilizados como agentes antibacterianos antes, durante e após o manejo cirúrgico, prevenindo sua disseminação. Neste sentido, várias substâncias têm sido preconizadas para realização desta antissepsia. Dentre estas, a clorexidina é uma substância cujo efeito antibacteriano foi amplamente estudado, sendo, portanto, indicada para este fim. Outras substâncias também indicadas para a antissepsia bucal são os amônios quaternários, que também se mostraram substâncias antibacterianas eficientes (SLOTS

& TAUBMAN, 1992; LOESCHE, 1993).

Considerando a importância do papel das bactérias em frequentes doenças que ocorrem na boca e as possíveis influências em outras infecções, a análise das atividades antibacterianas das soluções antissépticas disponibilizadas no mercado representam aspectos de elevada importância clínica.

## **OBJETIVO**

---

O presente estudo objetiva avaliar o efeito antibacteriano dos antissépticos bucais sobre *S. mutans*, *E. faecalis* e *P. aeruginosa*, por meio de teste de difusão em ágar e teste por exposição direta.

## METODOLOGIA

---

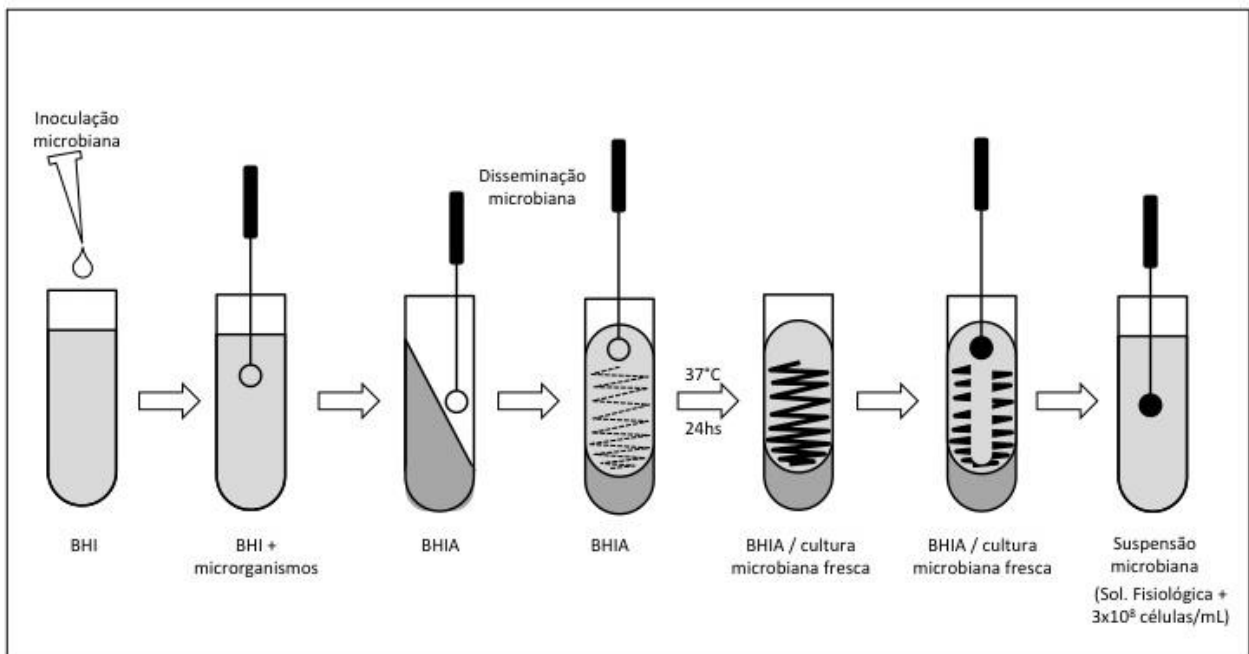
### *Indicadores biológicos*

Para o presente estudo foram utilizados três amostras de micro-organismos obtidas da *American Type Culture Collection*:

1. *Streptococcus mutans* (ATCC 25175)
2. *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212)
3. *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853)

O método experimental utilizado no presente estudo foi previamente empregado em outras investigações (Estrela *et al.*, 2004, 2005)

As cepas foram inoculadas em 7 mL de *brain heart infusion* (BHI; Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) e incubadas a 37°C por 24 horas. Os três micro-organismos indicadores foram cultivados na superfície do *brain heart infusion agar* (BHIA; Difco Laboratories, Detroit, MI, USA), seguindo as mesmas condições da incubação; células microbianas foram suspensas em solução fisiológica para dar uma concentração final de cerca de  $3 \times 10^8$  células/mL, semelhante ao tubo nº 1 da escala MacFarland. A figura 1 demonstra a representação esquemática do processo realizado para obtenção das suspensões microbianas.



**Figura 1.** Processo de obtenção das suspensões microbianas.

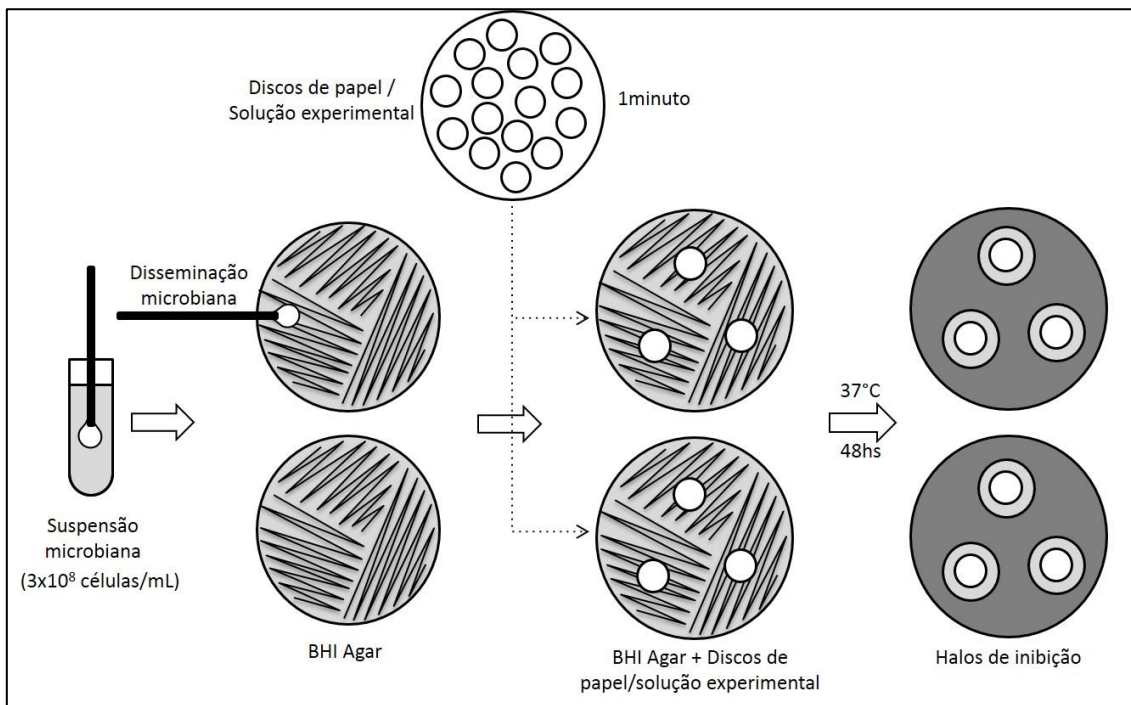
### *Soluções experimentais*

As soluções antissépticas testadas foram cloreto de cetilpiridínio 0,07% (Oral B Pro Saúde Clinical Protection®, The Procter & Gamble, Iowa City, IA, USA), cloreto de cetilpiridínio 0,075% (Colgate Plax soft mint®, Colgate-Palmolive Ind. Ltda, São Bernardo do Campo, SP, Brasil), gluconato de clorexidina a 0,12% (Colgate Periogard®, Colgate-Palmolive Ind. Ltda, São Bernardo do Campo, SP, Brasil) e o cloreto de benzalcônio 1,30 mg / cloridrato de lidocaína 25 mg (spray antisséptico Nexcare®, 3M, Nova Odessa, SP, Brasil).

### *Teste de difusão em ágar*

Para o teste de difusão em ágar, 13 placas de Petri com 20 mL de BHIA foram inoculadas com 0,1 mL das suspensões microbianas, com o auxílio de *swabs* esterilizados. O inóculo foi disseminado na superfície do meio de cultura, de modo a obter um crescimento confluyente. Trinta e seis discos de papel com 9mm de diâmetro foram imersos nas soluções experimentais, durante um minuto. Para o controle negativo, outros 3 discos de papel foram imersos em água destilada por um minuto e depositados em placas com ágar. Para cada placa contendo o meio de cultura (BHIA) foram colocados 3 discos de papel. As placas foram mantidas por uma hora em temperatura ambiente, e então, incubados a 37°C por 48 horas. Os diâmetros dos halos de inibição microbiana foram medidos ao redor dos discos de papel contendo as substâncias testes. Foram feitos controles positivos e negativos, mantendo-se as placas com BHIA inoculadas e sem inoculação, sob períodos e condições de incubação idênticas. Todo o experimento foi realizado sob condições assépticas. A Figura 2 demonstra a representação esquemática do delineamento experimental utilizado para o

teste de difusão em ágar.

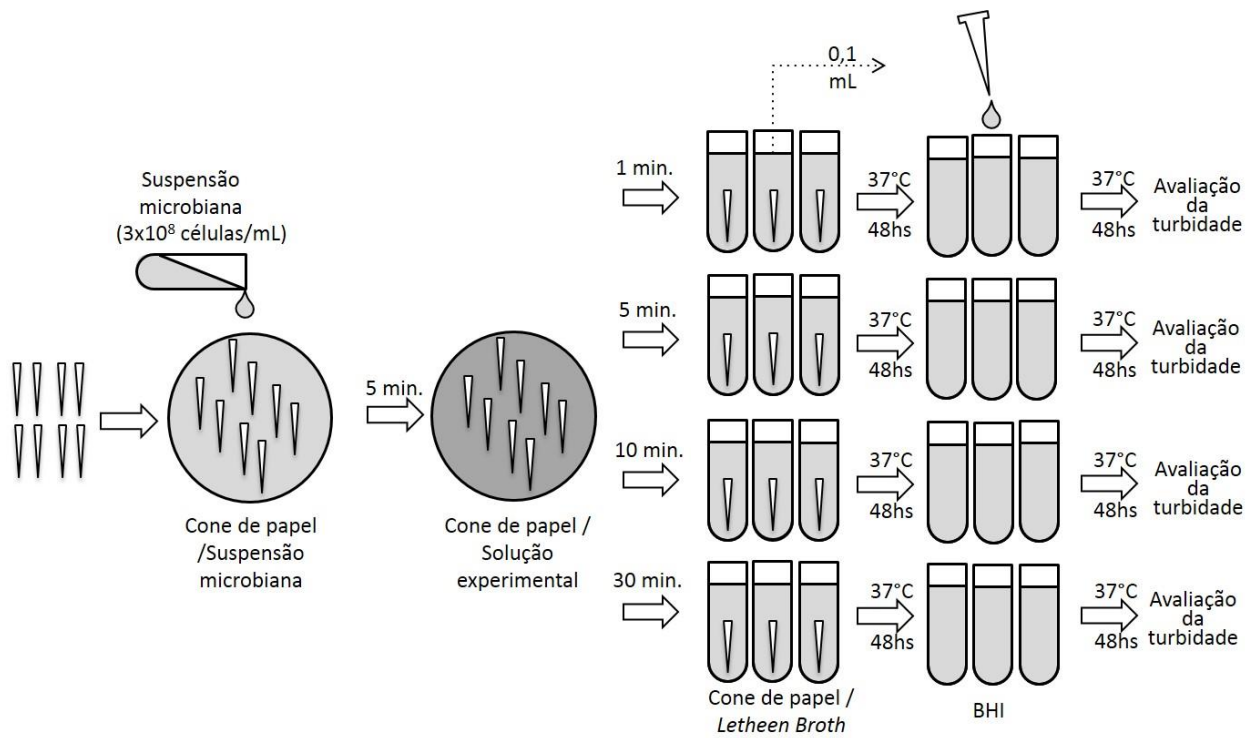


**Figura 2.** Representação esquemática do teste de difusão em ágar.

### *Teste por exposição direta*

Para o teste de exposição direta, 516 cones de papel absorventes esterilizados nº 50 (Tanari, Tanariman Indústria, Ltda., Manacapuru, AM, Brasil) foram imersos nas suspensões de micro-organismos por 5 minutos, e a seguir colocados em placas de Petri e cobertos com 10 mL de uma das quatro soluções antissépticas, ou com água destilada esterilizada (grupo controle). Em intervalos de 1, 5, 10 e 30 minutos, 3 cones de papel absorventes foram retirados do contato das substâncias, transportados individualmente, e imersos em 7mL de *Lethen Broth* (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA). Este representa um meio contendo neutralizadores ou acrescido de *Tween 80* e tiosulfato de sódio (P.A., Art Laboratories, Campinas, SP, Brasil) em concentrações apropriadas, e subsequentemente, incubados a 37°C por 48 horas. Em seguida, um inóculo de 0,1 mL obtido do *Lethen Broth* foi transferido para 7 mL de BHI, sob condições de incubação idênticas. O crescimento microbiano foi analisado pela turbidade do meio de cultura. Todos os experimentos foram realizados sob condições assépticas. A Figura 3 demonstra a representação esquemática do delineamento experimental utilizado para o teste por exposição direta. A Figura 6 ilustra os procedimentos realizados no teste por exposição direta.





**Figura 3** – Representação esquemática do teste por exposição direta.

## RESULTADOS

---

### *Teste de difusão em ágar*

Todas as soluções antissépticas testadas apresentaram efeito antimicrobiano contra os indicadores biológicos testados. Os halos de inibição foram maiores que 10 mm para todas substâncias e micro-organismos. Os resultados do teste de difusão em ágar estão apresentados na Tabela 1.

### *Teste por exposição direta*

A solução de cloreto de benzalcônio apresentou efeito antimicrobiano contra todos os indicadores biológicos após 5 minutos. Enquanto que o cloreto de cetilpiridínio e o gluconato de clorexidina apresentaram efeito antimicrobiano contra todos os micro-organismos somente após 10 minutos. Os resultados do teste de exposição direta estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 1. Médias dos diâmetros dos halos de inibição microbiana das soluções antissépticas por meio de difusão em ágar (em milímetros).

<b>Substâncias/micro-organismos</b>	<b><i>S. mutans</i> CAGP</b>	<b><i>E. faecalis</i> CAGP</b>	<b><i>P. aeruginosa</i> BAGN</b>
Cloreto de Cetilpiridínio 0,07%	11	13	11
Cloreto de Cetilpiridínio 0,075%	12	11	10
Gluconato de Clorexidina 0,12%	14	14	17
Cloreto Benzalcônio / Lidocaína	14	13	12
Controle (Água destilada)	0	0	0

(CAGP = cocos aeróbios Gram-positivos; BAGN = bacilos aeróbios Gram-negativos)

Tabela 2. Efeito antibacteriano das soluções antissépticas em teste por exposição direta.

<b>Substâncias/micro-organismos</b>	<b>1min</b>	<b>5min</b>	<b>10min</b>	<b>30min</b>
<b>Cloreto de Cetilpiridínio 0,07%</b>				
<i>S. mutans</i>	+++	---	---	---
<i>E. faecalis</i>	+++	+++	---	---
<i>P. aeruginosa</i>	+++	---	---	---
<b>Cloreto de Cetilpiridínio 0,075%</b>				
<i>S. mutans</i>	+++	+++	---	---
<i>E. faecalis</i>	+++	+++	---	---
<i>P. aeruginosa</i>	+++	+++	---	---
<b>Gluconato de Clorexidina 0,12%</b>				
<i>S. mutans</i>	---	---	---	---
<i>E. faecalis</i>	+++	+++	---	---
<i>P. aeruginosa</i>	+++	---	---	---
<b>Cloreto Benzalcônio / Lidocaína</b>				
<i>S. mutans</i>	---	---	---	---
<i>E. faecalis</i>	+++	---	---	---
<i>P. aeruginosa</i>	---	---	---	---

+++, Presença de crescimento; ---, Ausência de crescimento

## DISCUSSÃO

---

A boca constitui um ambiente séptico do organismo, com presença de uma microbiota complexa, caracterizada pela presença de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos, protozoários e vírus. Estas bactérias estão distribuídas em várias concentrações em quatro principais ecossistemas orais - epitélio bucal, dorso da língua, superfície dentária supragengival e superfícies dentária - e epitelial subgengival e na saliva, que não possui microbiota própria, pois demonstra o que está presente nos sítios da boca (LOESCHE, 1993; BAMMANN & ESTRELA, 2009).

O controle bacteriano nas diferentes circunstâncias clínicas torna-se essencial, como protocolos de antissepsia pré-cirúrgica. A adoção de uma técnica asséptica durante qualquer ato operatório clínico requer a realização de uma eficaz degermação e antissepsia das mãos e da boca, com efetivos agentes antimicrobianos, o que possibilita considerável redução da população microbiana (BAMMANN & ESTRELA, 2009). Várias soluções antissépticas em diferentes concentrações (gluconato de clorexidina, preparações com polivinilpirrolidona-iodo, solução alcoólica de iodo a 1% (álcool-iodado), álcool isopropílico a 70%, triclosan a 1%, cloreto de cetilpiridínio, cloreto de benzalcônio, etc.) têm sido sugeridas para estas finalidades. No entanto, os antissépticos mais estudados recentemente incluem o gluconato de clorexidina, o cloreto de cetilpiridínio, e o cloreto de benzalcônio (LAWRENCE, 1960; SCHROEDER *et al.*, 1962; GJERMO *et al.* 1970; BONESVOLL & GJERMO, 1978; PELCZAR-Jr *et al.* 1993; QUIRYNEN *et al.*, 1999; HAPS *et al.*, 2008; BUSSCHER *et al.*, 2008; TORTORA *et al.*, 2009; Alves *et al.* 2012; OSSO *et al.*, 2013).

Anteriormente à discussão dos resultados torna-se oportuno analisar alguns fatores a cerca da metodologia. O espectro de atividade de um agente antimicrobiano mostra-se essencial para melhorar o controle da infecção. Em geral, destacam-se três técnicas, *in vitro*, que são utilizadas para esta finalidade: o método de diluição, o qual produz um resultado quantitativo para o agente antimicrobiano; o método de difusão em ágar, que dá uma zona de inibição em torno do agente; o método de exposição direta, que fornece informações qualitativas sobre a substância. Todas as técnicas apresentam vantagens e desvantagens. O método de diluição pode ser usado apenas com as substâncias que são solúveis no meio de cultura. O tamanho da zona de inibição microbiana depende da solubilidade e difusibilidade da substância teste no método de difusão em ágar e, por conseguinte, pode não expressar todo o seu potencial. O método de exposição direta está correlacionado com a eficácia de substâncias e seu contato direto com micro-organismos. Este método é independente de outras variáveis e é prático em laboratório (ESTRELA *et al.*, 2005; BAMMANN & ESTRELA, 2009). Considerando estes aspectos, no presente estudo houve aplicação de mais de um método, com intuito de minimizar distorções nos resultados.

A metodologia empregada teve como referencial uma análise de estudos anteriores (ESTRELA *et al.*, 2003, 2004, 2005), que também utilizaram estes mesmos métodos. No teste de difusão em ágar, o parâmetro de referência relaciona-se a medida dos halos de inibição de crescimento microbiano. No presente estudo, influências como a diferença de solubilidade e difusibilidade dos agentes foram eliminadas a partir dos critérios de seleção das soluções testes. O teste de difusão em ágar não distingue propriedades bacteriostáticas e bactericidas das soluções avaliadas. O método é muito utilizado em microbiologia, e também padrão para antibiograma. Os resultados dos

diferentes experimentos devem ser cuidadosamente examinados e interpretados para não ser equivocadamente extrapolados para uma aplicação clínica (ESTRELA *et al.*, 2005; BAMMANN & ESTRELA, 2009).

Os micro-organismos selecionados para este estudo constituíram-se de micro-organismos expressivos presentes em processos de cárie dentária, canais radiculares infectados e infecções hospitalares, apresentando distintas características morfológicas, tintoriais e respiratórias. Adotou-se como base para a seleção os micro-organismos *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*. Especialmente, em relação ao meio de cultura, os meios empregados no experimento suportam as exigências nutritivas de micro-organismos exigentes. Os períodos de análise foram escolhidos devido à importância no contexto do estudo. A opção por estas técnicas experimentais ocorreu em função de serem simples, reprodutíveis e eficazes aos propósitos descritos. Além do mais, permitem alcançar os diferentes tipos respiratórios de bactérias; facultativas e anaeróbias, e recuperar células microbianas quando em pequena quantidade, especialmente quando se estuda ecossistemas microbianos ricos. Os parâmetros, quanto à adoção de uma técnica asséptica, foram rigorosamente seguidos durante o desenvolvimento destas metodologias.

As bactérias utilizadas foram selecionadas devido à importância clínica. A cárie dentária representa uma doença infecciosa da boca, com uma importante participação do *S. Mutans*, cujo potencial de aderência evidencia sua importância em odontologia (LOESCHE, 1986, 1993; CAUFIELD & WALKER, 1989; CURTISS, 1986; MARSH, 2003; MATSUMOTO *et al.*, 2006). O *E. Faecalis*, bactéria Gram-positiva facultativa, apresenta destaque como agente de elevada capacidade patogênica em infecções hospitalares e infecções endodônticas (SLOTS & TAUBMAN; MOLANDER *et al.*, 1998;

SUNDQVIST *et al.*, 1998; LOVE, 2001; PORTENIER *et al.*, 2003, ESTRELA *et al.*, 2012). Love (2001) verificou o possível mecanismo que pudesse explicar como o *Enterococcus faecalis* poderia sobreviver e crescer dentro dos túbulos dentinários e reinfectar um canal radicular obturado. O fator de virulência do *E. faecalis* no fracasso de dentes tratados endodonticamente pode estar relacionado à habilidade destas célulasmanterem a capacidade para invadir os túbulos dentinários e aderir ao colágeno. A *Pseudomonas aeruginosa*, bactéria Gram-negativa facultativa, também apresenta importância relacionada às infecções hospitalares (SLOTS & TAUBMAN, 1992).

Os resultados do presente estudo demonstraram que as soluções antissépticas bucais testadas apresentaram efeito antibacteriano frente ao *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa*. No teste de difusão em ágar, o cloreto de cetilpirínio 0,07% e 0,075% apresentaram halos de inibição bacteriana com mensurações a partir de 10 mm, enquanto que, o cloreto de benzalcônio exibiu valores superiores a 12 mm para os indicadores biológicos testados. As maiores medidas de difusão em ágar foram verificadas no gluconato de clorexidina 0,12%, com médias acima de 14 mm. No teste por contato direto, o cloreto de cetilpiridínio 0,07% e 0,075% e o gluconato de clorexidina 0,12% apresentaram efeito antibacteriano contra todos os micro-organismos somente após 10 minutos de teste. A solução de cloreto de benzalcônio apresentou efeito antibacteriano frente aos indicadores biológicos decorridos 5 minutos de exposição direta às bactérias.

Os antissépticos bucais são recomendados para o controle da microbiota bacteriana, porém, nem todos os profissionais reconhecem a importância de sua utilização. A efetividade antibacteriana de antissépticos bucais possibilita reduzir micro-organismos planctônicos e favorecer o controle de placa bacteriana e gengivite.



Os resultados do presente estudo estão de acordo com avaliações prévias (LAWRENCE, 1960, HENNESSEY, 1973). Lawrence (1960) verificou a atividade antimicrobiana da clorexidina, do cloreto de benzalcônio, do iodo-povidine e do fenol. A clorexidina desempenhou atividade antimicrobiana superior quando comparada às substâncias derivadas do amônio quaternário. Hennessey (1973), avaliando as propriedades antimicrobianas da clorexidina, verificou efetividade, sendo que, os micro-organismos Gram-positivos foram mais sensíveis que os Gram-negativos, e que os estafilococos foram mais resistentes que os estreptococos.

A clorexidina é um agente catiônico que exibe atividade antibacteriana. A natureza catiônica do composto promove conexão com o grupo aniônico na superfície bacteriana (grupos fosfatos do ácido teicóico nas bactérias Gram-positivas e lipopolissacarídeo nas bactérias Gram-negativas), sendo capaz de alterar sua integridade. O íon potássio, sendo uma entidade pequena, é a primeira substância a aparecer quando a membrana citoplasmática promove precipitação de proteínas citoplasmáticas, por alterar o balanço osmótico da célula, interferindo no metabolismo, crescimento, divisão celular, inibindo a membrana ATPase e inibindo o processo anaeróbio (ESTRELA *et al.*, 2003).

Estrela *et al.* (2003) determinaram a concentração inibitória mínima de hipoclorito de sódio a 1%, clorexidina a 2%, para inibir *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *C. albicans* e uma mistura destes micro-organismos, a partir de uma série de diluições na proporção de 1:10. Os resultados mostraram que a concentração inibitória mínima do hipoclorito de sódio a 1% necessária para inibir *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa* e *C. albicans* foi 0,1% e 1% para *B. Subtilise* para a mistura. A clorexidina a

2% mostrou concentração inibitória mínima de 0,000002% para *S. aureus*; 0,002% para *P. aeruginosa*; 0,02% para *E. faecalis*, *B. Subtilis*, *C. albicans* e para a mistura.

Os compostos de amônio quaternário catiônicos são substâncias com capacidade antimicrobiana, estabilidade e solubilidade na água. A atividade antibacteriana está relacionada com parte da carga positiva da molécula (o cátion). As estruturas dos compostos de amônio quaternário são relacionadas com cloreto de amônio (NH<sub>4</sub>Cl) (Pelczar-Jr *et al.*, 1993). O cátion ambiente da molécula estimula a ligação com composto aniônico na superfície da bactéria, e é capaz de alterar a integridade da membrana citoplasmática. Uma vez a membrana citoplasmática danificada, as alterações das funções que envolvem a permeabilidade da membrana citoplasmática podem ser observadas. A inativação das enzimas membrana citoplasmática traz consequências graves, tais como a desnaturação de proteínas (ESTRELA & PÉCORA, 2009; TORTORA *et al.*, 2009; BUSSCHER *et al.*, 2008; ESTRELA *et al.*, 2012). Os detergentes catiônicos (em compostos de amônio quaternário) são amplamente utilizados como agentes ativos de superfície. Dois destes detergentes são bem conhecidos - o cloreto de benzalcônio e cloreto de cetilpiridínio (BUSSCHER *et al.*, 2008).

Haps *et al.* (2008) desenvolveram uma revisão sistemática sobre o cloreto de cetilpiridínio (CCP) presente em enxaguatórios bucais, em função da efetividade na escovação, e prevenção do acúmulo de placa e inflamação gengival. Posterior a triagem independente de títulos e resumos de 3250 manuscritos, resultou em oito publicações que atenderam aos critérios de elegibilidade. As comparações descritivas foram apresentadas para escovar, ou apenas escovar os dentes e enxaguar. A evidência existente suporta que o CCP presente nos enxaguatórios bucais, quando

usado como coadjuvante, supervisionado ou não em higiene oral, proporciona benefício adicional na redução do acúmulo de placa e inflamação gengival. Osso *et al.* (2013) frente a revisão sistemática relataram que a maioria dos estudos têm mostrado que os enxaguatórios bucais contendo gluconato de clorexidina ou óleos essenciais e salicilato de metila fornecem benefícios clínicos anti-placa e gengivite. A clorexidina, os óleos essenciais e o CCP mostraram-se efetivos. Os estudos apoiam a eficácia da lavagem da boca com antisséptico na redução de placa e gengivite. Todavia, evidências disponíveis são insuficientes para apoiar a afirmação de que os antissépticos bucais podem reduzir o risco de periodontite em desenvolvimento ou a taxa de progressão da periodontite. Estrela *et al.* (2012) verificaram o potencial antibacteriano de cloreto de cetilpiridínio em 40 canais radiculares infectados por *E. faecalis* durante 60 dias. Os resultados mostraram a presença de *E. faecalis* posterior ao processo de sanificação do canal radicular. O cloreto de cetilpiridínio mostrou reduzir o número de bactérias. No teste de difusão em ágar, o CCP determinou inibição microbiana, com resultados semelhantes à CHX a 2% e maiores do que o hipoclorito de sódio a 2,5%. O cloreto de cetilpiridínio demonstrou potencial antibacteriano em infecção endodôntica por *E. faecalis*.

O processo de antissepsia anterior às cirurgias bucais deve ser adotada como rotina pelos cirurgiões bucomaxilofaciais, uma vez que o controle da microbiota presente na cavidade bucal pode favorecer o processo de reparação tecidual. Todavia, estudos clínicos longitudinais são necessários para sedimentar as tomadas de decisões quanto ao controle microbiano pré-cirúrgico.

## **CONCLUSÕES**

---

Considerando a metodologia descrita é lícito concluir que as soluções antissépticas estudadas apresentaram efeito antibacteriano por contato direto frente *S. mutans*, *E. faecalis* e *P. aeruginosa*.

## REFERÊNCIAS

---

1. Alves D, Costa AL, Almeida RF, Carvalho JFC, Felino A. Cetylpyridinium chloride - a literature review. *Rev Port Estomatol Med Dent Cir Maxill* 2012;53:81-9.
2. Bammann LL, Estrela C. Microbiological aspects in endodontics. In: Estrela C. *Endodontic Science*. 2 ed. Artes Médicas: São Paulo, 2009.
3. Bonesvoll P, Gjermo P. A comparison between chlorhexidine and some quaternary ammonium compounds with regard to retention, salivary concentration and plaque-inhibiting effect in the human mouth after mouth rinses. *Archs Oral Biol* 1978;23:289-94.
4. Busscher HJ, White DJ, Atema-Smit J, Geertsema-Doornbusch G, De Vries J, Van Der Mei HC. Surfactive and antibacterial activity of cetylpyridinium chloride formulations *in vitro* and *in vivo*. *J Clin Periodontol* 2008;35:547-54.
5. Caufield PW, Walker TM. Genetic diversity within *Streptococcus mutans* evident from chromosomal DNA restriction fragment polymorphisms. *J Clin Microbiol* 1989;27:274-6.
6. Curtiss RIII. Genetic analysis of *Streptococcus mutans* virulence. *Curr Top Microbiol Immun* 1985;118:253-77.
7. Estrela C, Estrela CRA. *Controle de infecção em odontologia*. São Paulo: Artes Médicas, 2003. 188p.
8. Estrela C, Pécora JD. Root canal irrigants. In: Estrela C. *Endodontic Science*. 2 ed. São Paulo: Artes Médicas, 2009, p. 697-744.

9. Estrela C, Pimenta FC, Estrela CRA. Testes microbiológicos aplicados à pesquisa. In: Estrela C. Metodologia Científica. São Paulo: Artes Médicas; 2005. p.295-326
10. Estrela C, Sousa-Neto MD, Alves DRS, Alencar AHG, Santos TO, Pécora JD. A preliminary study of the antibacterial potential of cetylpyridinium chloride in root canals infected by *E. faecalis*. Braz Dent J 2012;23:645-53.
11. Estrela C, Estrela CRA, Pécora JD, Amorim LFG, Toledo OA Eficácia antimicrobiana de formulações de digluconato de clorexidina de concentrações e procedências diferentes. Robrac 2004;13:10-3.
12. Estrela C, Alencar AHG, Decurcio DA, Borges AH, Guedes AO, Estrela CRA. Influência de estratégias de sanificação no sucesso do tratamento da periodontite apical. Robrac 2012;21:367-75.
13. Gjermo P, Baastad KL, Rölla G. The plaque-inhibiting capacity of 11 antibacterial compounds. J Periodont Res 1970;5:102-9.
14. Haps S, Slot DE, Berchier CE, Van der Weijden GA. The effect of cetylpyridinium chloride-containing mouth rinses as adjuncts to tooth brushing on plaque and parameters of gingival inflammation: a systematic review. Int J Dent Hyg 2008;6:290-303.
15. Hennessey TS. Some antibacterial properties of chlorhexidine. J periodontal 1973;12:61-7.
16. Lawrence CA. Antimicrobial activity *in vitro* of chlorhexidine. J Amer Pharmaceut Ass 1960;49:731-4.
17. Loesche WJ. Cárie dental – Uma infecção tratável. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 1993. 349p.

18. Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. Microbiol Rev 1986;50:353-80.
19. Love RM. *Enterococcus faecalis*: mechanism for its role in endodontic failure. Int Endod J 2001;34:399-406.
20. Marsh PD. Plaque as a biofilm: pharmacological principles of drug delivery and action in the sub- and supragingival environment. Oral Diseases 2003;9: 16–22.
21. Matsumoto Y, Sugihara N, Kosek M, Maki Y. A rapid and quantitative detection system for *Streptococcus mutans* in saliva using monoclonal antibodies. Caries Res 2006;40:15-9.
22. Molander A, Reit C, Dahlén G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. Int Endod J 1998;31:1-7.
23. Osso D, Kanani N. Antiseptic mouth rinses: an update on comparative effectiveness, risks and recommendations. J Dent Hyg. 2013;87:10-8.
24. Pelczar-Jr MJ, Chan ECS, Krieg NR. Microbiology: concepts and applications. New York: McGraw-Hill, 1993. p. 210-28.
25. Portenier I, Waltimo T, Haapasalo M. *Enterococcus faecalis* – The root canal survivor and “star” in post-treatment disease. Endod Top 2003;6:135-59.
26. Quirynen M, Gizani S, Mongardini C, Declerck D, Vinckier F, van Steenberghe D. The effect of periodontal therapy on the number of cariogenic bacteria in different intra-oral niches. J Clin Periodontol 1999;26:322-7.
27. Schonfeld SE. Oral microbial ecology. In: Slots J, Taubman MA. Contemporary oral microbiology and immunology. St. Louis: Mosby, 1992. p. 267-74.
28. Schroeder HE, Marthaler TM, Muhlemann HR. Effects of some potential inhibitors on early calculus formation. Helv Odont Acta 1962;6:6-9.

29. Shearer BG. Biofilm and the dental office. *J Am Dent Ass* 1996;127:181-89.
30. Slots J, Taubman MA. *Contemporary Oral Microbiology and Immunology*. St Louis: Mosby, 1992. 649p.
31. Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontology* 2000 2002;28:12-55.
32. Socransky SS, Haffajee AD. Microbiologia da doença periodontal. In: Lindhe J, Karring T, Lang NP. *Tratado de Periodontia Clínica e Implantodontia Oral*. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p.105-47.
33. Socransky SS, Haffajee AD. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. *J Periodontol* 1992;63:322-31.
34. Spratt DA. Significance of bacterial identification by molecular biology methods. *Endod Top* 2004;9:5-14.
35. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative retreatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998;85:86-93.
36. Timmerman MF, van der Weijden GA. Risk factors of periodontitis. *Int J Dent Hygiene* 2006;4:2-7.
37. Tortora GJ, Funke BR, Case CL. *Microbiology: An introduction*. 10 ed. San Francisco, Benjamin Cummings, 2009. 960p.
38. Villoria GEM, Costinha LHC. Antissépticos bucais no controle da bacteremia de origem oral. *Revista HUPE* 2013;12:76-83.



## **ANEXO 1**

### **Publicação**

**Antibacterial effect of oral antiseptics on  
*S. mutans*, *E. faecalis* and *P. aeruginosa***

**Efeito antibacteriano de antissépticos bucais frente  
ao *S. mutans*, *E. faecalis* e *P. aeruginosa***

**Marcel da Silva Garrote<sup>1</sup>, Ana Helena Gonçalves de Alencar<sup>2</sup>, Cyntia Rodrigues de Araújo Estrela<sup>3</sup>, Hugo Alexandre de Souza<sup>4</sup>, Denise Ramos Silveira Alves<sup>5</sup>, Carlos Estrela<sup>6</sup>**

<sup>1</sup>MSc, Department of Medicine, Federal University of Goiás, Goiânia-GO, Brazil. Acquisition, analysis and interpretation of data, manuscript writing.

<sup>2</sup> PhD, Associate Professor, Department of Endodontics, Federal University of Goiás, Goiânia-GO, Brazil. Substantial scientific and intellectual contributions, manuscript writing.

<sup>3</sup> PhD, Assistant Professor, Department of Dentistry, University of Cuiabá, Cuiabá-MT, Brazil. Responsible for conception and design, acquisition, analysis and interpretation of data.

<sup>4</sup> PhD, Associate Professor, Department of Surgery, Federal University of Goiás, Goiânia-GO, Brazil. Substantial scientific and intellectual contributions, critical revision.

<sup>5</sup> Master, Fellow PhD Degree, Department of Endodontics, Federal University of Goiás, Goiânia-GO, Brazil. Acquisition, analysis and interpretation of data, manuscript writing.

<sup>6</sup> PhD, Chairmain and Head, Department of Endodontics, Federal University of Goiás, Goiânia-GO, Brazil. Responsible for conception and design, responsible for manuscript preparation, manuscript writing, final approval of the version to be published.

### **Correspondence**

MSc Marcel da Silva Garrote

Department of Endodontics, School of Dentistry, Federal University of Goiás

Av. Universitária esquina com Primeira Avenida, s/n, Setor Leste Universitário.

CEP:74605-220

Goiânia-GO, Brazil.

Phone: 55 62 32096053

e-mail: estrela3@terra.com.br

## ABSTRACT

**Purpose:** to evaluate the antibacterial effect of oral antiseptics (cetylpyridinium chloride, chlorhexidine gluconate and benzalkonium chloride) on *S. mutans*, *E. faecalis* and *P. aeruginosa*, determined by agar diffusion test and direct exposition test. **Methods:** The strains were inoculated in 7 mL BHI and incubated at 37°C for 24 hours. For agar diffusion test, 13 Petri plates with 20 mL BHIA were inoculated with 0.1 mL of microbial suspensions, aided by sterilized swabs, obtaining a confluent growth. Thirty six paper discs with 9 mm diameter were immersed in experimental solutions (cetylpyridinium chloride 0.07%, cetylpyridinium chloride 0.075%, chlorhexidine gluconate 0.12% and benzalkonium chloride 0.13%) for 1 minute. Following, at each plate, 3 paper discs containing irrigant solutions were put on BHIA surface. The plates were kept for 1 hour at environmental temperature and incubated at 37°C for 48 hours. Inhibition zones were measured over the paper discs containing the solutions, using two perpendicular measurements and obtaining the mean value. For direct exposition test, 516 sterilized paper points #50 were immersed on microorganisms suspension for 5 minutes, put in Petri plates and covered with 10 mL of irrigant solution. At 1, 5, 10 and 30 minutes intervals, 3 paper points were removed from substances contact, transported individually and immersed in 7 mL Letheen Broth, and incubated at 37°C for 48 hours. Bacterial growth was evaluated by medium turbidity. An inoculum of 0.1 mL Letheen Broth was transferred to 7 mL BHI, and incubated at the same conditions previously described. Bacterial growth was again evaluated by medium turbidity. **Results:** Inhibition zones were greater than 10 mm for all substances and in microorganisms tested. Benzalkonium chloride presented antibacterial effect against the biological markers after

5 minutes in direct exposition, while cetylpyridinium chloride and chlorhexidine gluconate presented antibacterial effect against all the microorganisms after 10 minutes.

**Conclusion:** The antiseptic solutions presented antibacterial effect against *S. mutans*, *E. faecalis* e *P. aeruginosa*.

**Keywords:** Cetylpyridinium, Chlorhexidine, Benzalkonium.

## INTRODUCTION

Oral microorganisms in microbial biofilms organized in the form of dental plaque adhering to hard and soft tissues of the mouth. The presence of oral microbial biofilm is considered an important factor in the etiology of dental caries and periodontal diseases as well as in post-surgical infections<sup>1</sup>.

There are different microbial species in the mouth that can be distributed across multiple ecosystems: oral epithelium, dorsum of the tongue supragingival tooth surface, dental and epithelial subgingival surface. The contact of saliva with these oral tissues enables these cells, from different regions<sup>2,3</sup>.

Saliva is a body fluid that is in contact with the entire oral surface. Their characteristics influence the microbiota as increase or decrease their survivability. There are proteins that function as ligand receptors in the saliva, which favors the adhesion of microorganisms on the tooth surface. Furthermore, the saliva is the primary source of nutrients for approximately 10<sup>8</sup>-10<sup>9</sup> viable microorganisms / ml<sup>4,5</sup>.

The teeth have a surface mineralized, not desquamative, which favors the development of large microbial deposits. Despite more than 700 bacterial species have been isolated and characterized in dental plaque, has not yet been possible to identify all of them<sup>6,7</sup>.

The oral infectious diseases contribute as the main risk factors for the systemic changes. Dental caries is an infectious disease of the mouth, multifactorial, with genetic, environmental, dietary and bacterial factors. A considerable number of studies showed a significant association between *Streptococcus mutans* and early carious lesions<sup>8-12</sup>.

*S. mutans* is a Gram-positive bacterium which shows high fermentability, thereby accumulating a large amount of acid, and provide a reduction in pH. It is a facultative microorganism capable of producing extracellular and intracellular polysaccharides which favor microbial adherence<sup>10</sup>. *E. faecalis* is a bacterium which has been studied because it is associated with endodontic and hospital infections<sup>13-15</sup>. This is a Gram positive, facultative bacterium, which has as a virulence factor production of the substance of aggregation and surface adhesion agents that promote its adherence to host cells and extracellular matrix, thus facilitating invasion of the tissue<sup>15</sup>. Addition to these aspects that highlight these bacteria as important in endodontic infections, it should be emphasized its ability to survive in adverse conditions, such as high pH environments and high concentrations of sodium chloride<sup>13,16</sup>. *Pseudomonas aeruginosa* is a Gram-negative bacteria, facultative aerobic. This bacterium is an opportunistic pathogen that rarely causes disease in a healthy immune system, but takes advantage of any weakness in the body to cause infections. This characteristic, associated with resistance to various antibiotics and antiseptics justify the high frequency in a hospital environment. One of the hypotheses is the incorrect use of these disinfectants<sup>16</sup>.

Socransky & Haffajee (1992)<sup>17</sup> classified the microorganisms as potential pathogens or not. So that a microorganism can be considered pathogen, it must be associated with a disease, must be evidenced in high numbers in diseased sites, must be absent or reduced in sites that demonstrate clinical resolution; induce host response, in the form of a cell modification or humoral immune response, must be apt to cause disease in experimental animal models, show virulence factors responsible for allowing the microorganism to cause destruction of host tissues.

Another aspect of relevance to oral microbiota is related to the presence of bacteria in the blood (bacteremia), a form of the local infections spread to distant organs. Normally it is temporary, due to a vigorous immune response when the bacterium is detected in the blood. Infective endocarditis is a rare infection. but serious because involving the heart valves or heart endothelial surfaces<sup>18</sup>. Another critical factor associated with the risk of oral microbiota is the management of the oral tissues, which can encourage bacterial invasion into the blood.

One of the resources to control the oral microbiota is the use of mouthwashes, which have been used as antibacterial agents before, during and after surgical

management with the purpose to reduce microorganisms, thus preventing propagation. Thus, several substances have been recommended for carry out this antiseptics. Among these, chlorhexidine is a substance whose antibacterial effect has been widely studied, and is therefore suitable for this purpose. Other substances also suitable for oral antiseptic are quaternary ammonium compounds which also show effective antibacterial substances<sup>10,16</sup>.

Considering the importance of bacteria as a cause of common diseases that occur in the mouth and the possible influences of other infections, the analysis of antibacterial activity of antiseptic solutions available for sale is an important subject for study. Thus, this study aimed to evaluate the antibacterial effect of mouthwash on *S. mutans*, *E. faecalis* and *P. aeruginosa* by means of agar diffusion test and test for direct exposure.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Biological indicators**

For this study, three samples of microorganisms obtained from American Type Culture Collection were used.

1. *Streptococcus mutans* (ATCC 25175)
2. *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212)
3. *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853)

The strains were inoculated into 7 ml of Brain Heart Infusion (BHI, Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) and incubated at 37 ° C for 24 hours. The three indicator microorganisms were grown on the surface of Brain Heart Infusion Agar (BHIA, Difco Laboratories, Detroit, MI, USA), following the same incubation conditions, microbial cells were suspended in saline to give a final concentration of about 3 X 10<sup>8</sup> cells / ml, similar to tube 1 of the McFarland scale. Figure 1 shows a schematic representation of the process performed to obtain the microbial suspensions.

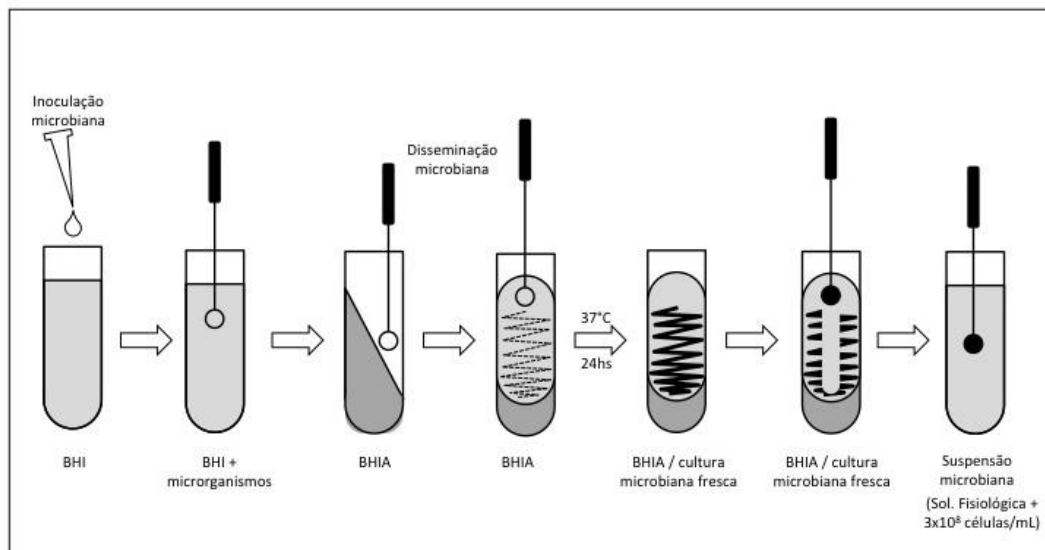


Figure 1. Process for obtain the microbial suspensions.

### Experimental solutions

The antiseptic solutions tested in this study were 0.07% cetylpyridinium chloride (Oral B Pro Health Clinical Protection ®, The Procter & Gamble Manufacturing Company, 2200 Lower Road Iowa City, IA 52240 USA), cetylpyridinium chloride 0.075% (Colgate Plax soft mint ®, Colgate-Palmolive Industrial Ltda, V. Anchieta, 14 km, SB Campo, SP, Brazil), chlorhexidine gluconate 0.12% (Colgate Periogard ®, Colgate-Palmolive Industrial Ltda, V. Anchieta, km 14, SB Field, SP, Brazil) and benzalkonium chloride 1.30 mg / lidocaine hydrochloride 25 mg (antiseptic spray Nexcare ®, 3M).

### The agar diffusion test

For the agar diffusion test, 13 Petri plaque with 20 ml BHIA were inoculated with 0.1 ml of the microbial suspension, with the aid of sterile swabs. The inoculum was disseminated in surface of the culture medium so as to obtain confluent growth. Thirty-six paper disks 9 mm in diameter were immersed in the experimental solution for one minute. For the negative control, another 3 paper discs were immersed in distilled water for one minute and deposited on agar plates. To each plaque containing culture medium (BHIA) 3 paper discs were placed. The Petri plaque were maintained for one hour at room temperature, and then incubated at 37 ° C for 48 hours. The diameters of the zones of microbial inhibition were measured around the paper disks containing the test

substances. Positive and negative controls were done, keeping the BHIA plaque inoculated and non-inoculated, and periods under identical incubation conditions. The entire experiment was performed under aseptic conditions. Figure 2 shows a schematic representation of the experimental design used for the agar diffusion test.

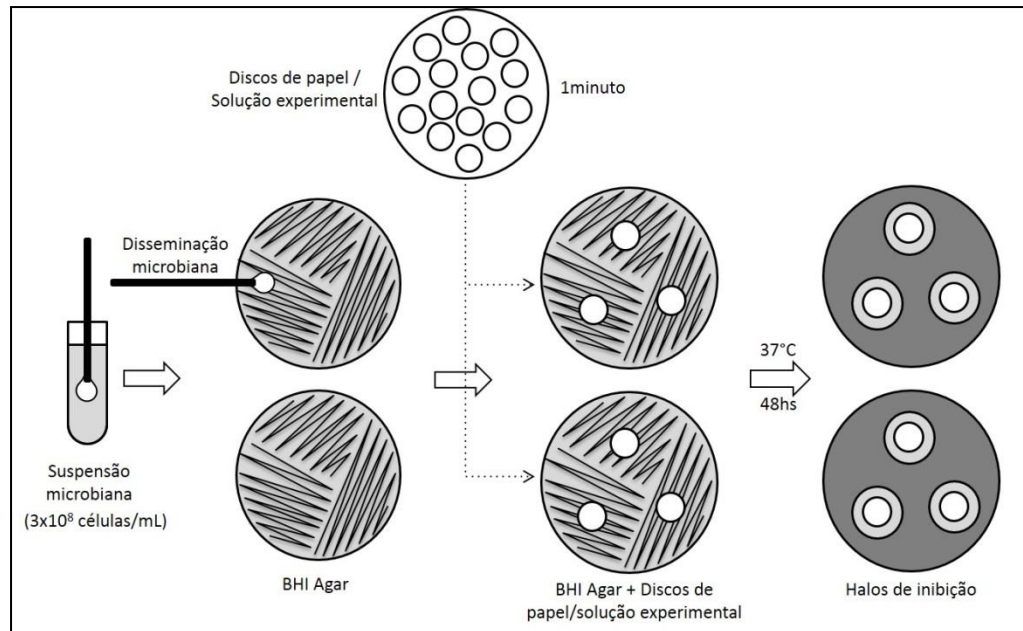
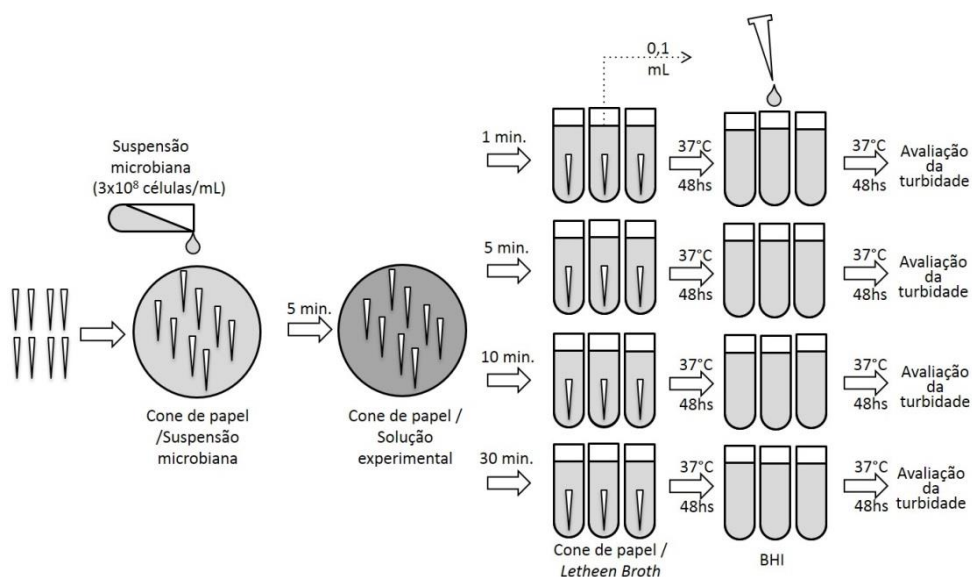


Figure 2. Schematic representation of agar diffusion test.

### Test for direct exposure

For the direct exposure test, 516 of absorbent paper cones sterilized at 50 (Tanari, Tanariman Industry Ltda., Manacapuru, AM, Brazil) were immersed in suspensions of microorganisms for 5 minutes, and were then placed on Petri plaque and covered with 10 mL of four antiseptic solutions, or sterile distilled water (control group). At intervals of 1, 5, 10 and 30 minutes, 3 cones of absorbent paper were removed from the contact of the substances transported individually and immersed in 7 mL of Lethen Broth (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) or medium containing neutralizing plus Tween 80 and sodium thiosulfate (PA, Art Laboratories, Campinas, SP, Brazil) at appropriate concentrations, and subsequently incubated at 37 ° C for 48 hours. At intervals of 1, 5, 10 and 30 minutes, 3 cones of absorbent paper were removed from the contact of the substances transported individually and immersed in 7 mL of Lethen

Broth (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) or medium containing neutralizing plus Tween 80 and sodium thiosulfate (PA, Art Laboratories, Campinas, SP, Brazil) at appropriate concentrations, and subsequently incubated at 37 ° C for 48 hours. Then, an inoculum of 0.1 ml of Letheen broth obtained was transferred to 7 mL of BHI under identical incubation conditions. Microbial growth was assessed by turbidity of the culture medium. All experiments were performed under aseptic conditions. Figure 5 shows a schematic representation of the experimental design for testing by direct exposure.



**Figure 3.** Schematic representation of the test by direct exposure.

## RESULTS

### The agar diffusion test

All antiseptic solutions tested showed antimicrobial effect against the biological indicators tested. The inhibition zones were larger than 10 mm for all substances and microorganisms. Results of the agar diffusion test are shown in Table 1.

### Test by direct exposure

The solution of benzalkonium chloride showed antimicrobial effect against all biological indicators after 5 minutes. While cetylpyridinium chloride and chlorhexidine



gluconate showed antimicrobial activity against all microorganisms only after 10 minutes. The results of the direct exposure test are shown in Table 2.

Table 1. Average of the diameters halos of inhibition of microbial antiseptic solutions by means of agar diffusion (in millimeters).

Chemicals / microorganisms	<i>S. mutans</i> CAGP	<i>E. faecalis</i> CAGP	<i>P. aeruginosa</i> BAGN
Cetylpyridinium chloride 0.07%	11	13	11
Cetylpyridinium chloride 0.075%	12	11	10
Chlorhexidine gluconate 0.12%	14	14	17
Benzalkonium chloride / Lidocaine	14	13	12
Control (distilled water)	0	0	0

(CAGP = Gram-positive aerobic cocci; Bagn = Gram-negative aerobic bacilli)

Table 2. Antibacterial effect of antiseptic solutions under test by direct exposure.

Chemicals / microorganisms	1min	5min	10min	30min
<b>cetylpyridinium chloride0.07%</b>				
<i>S. mutans</i>	+++	---	---	---
<i>E. faecalis</i>	+++	+++	---	---
<i>P. aeruginosa</i>	+++	---	---	---
<b>cetylpyridinium chloride0.075%</b>				
<i>S. mutans</i>	+++	+++	---	---
<i>E. faecalis</i>	+++	+++	---	---
<i>P. aeruginosa</i>	+++	+++	---	---
<b>Chlorhexidine gluconate0.12%</b>				
<i>S. mutans</i>	---	---	---	---
<i>E. faecalis</i>	+++	+++	---	---
<i>P. aeruginosa</i>	+++	---	---	---
<b>Benzalkonium chloride / lidocaine</b>				
<i>S. mutans</i>	---	---	---	---
<i>E. faecalis</i>	+++	---	---	---
<i>P. aeruginosa</i>	---	---	---	---

+++ , Presence of growth; --- Absence of growth.

## DISCUSSION

The mouth is an antiseptic environment of the organism, the presence of a complex microbiota, characterized by the presence of Gram-positive and Gram-negative bacteria, fungi, protozoa and viruses. These bacteria are distributed in various concentrations in four main ecosystems oral - oral epithelium, the tongue, supragingival tooth surface and tooth surfaces - and subgingival epithelial and saliva, which has no own microbiota, as it demonstrates what is present in the sites of the mouth<sup>10,19</sup>.

The bacterial control in different clinical conditions it is essential, such as pre-operative antiseptic protocols. The adoption of aseptic technique during any clinical

surgery requires making an effective antiseptic and antiseptics of hands and mouth, with effective antimicrobial agents, which allows considerable reduction of the microbial population<sup>19</sup>. Various antiseptic solutions at different concentrations (chlorhexidine gluconate, preparations containing povidone-iodine alcoholic solution of iodine (1% iodine alcohol), isopropyl alcohol 70% 1% triclosan, cetylpyridinium chloride, benzalkonium chloride, etc.) have been suggested for these purposes. However, more recently studied include antiseptics chlorhexidine, cetylpyridinium chloride and benzalkonium chloride<sup>20-30</sup>.

Before the discussing the results it is timely to consider some factors about the methodology. The spectrum of activity of an antimicrobial agent shown to be essential for improving infection control. In general, three techniques stand out in vitro, which are used for this purpose: the dilution method, which produces a quantitative results for the antimicrobial agent, the method of diffusion in agar, which gives a zone of inhibition around agent, the method of direct exposure, which provides qualitative information on the substance. All techniques have advantages and disadvantages. The dilution method can be used only with substances that are soluble in the culture substrate. The size of the microbial inhibition zone depends upon the solubility and diffusivity of the test substance in the agar diffusion method, and therefore cannot express its full potential. The method of direct exposure is correlated with the efficacy of substances and their direct contact with microorganisms. This method is independent of other variables and is practical in the laboratory<sup>19,31-33</sup>. Considering these aspects, in this study there was more than one application method, with the purpose to minimize distortions in the results.

The methodology used had as reference an analysis of previous studies<sup>31-33</sup>, who also used these same methods. In the agar diffusion test, the benchmark relates to the measurement of inhibition zones of microbial growth. In the present study, influences how the difference in solubility and diffusivity of the agents were removed from the criteria for selecting the test solutions. Factors like agar concentration, temperature, pH, absence of pre-incubation, the culture medium resection, maintenance for longer than the allowed for a correct analysis favor the obtaining of questionable results. The agar diffusion test does not distinguish between bacteriostatic and bactericidal properties of the evaluated solutions. The method is widely used in microbiology, and also standard

for susceptibility testing. The results of different experiments should be carefully examined and interpreted not to be mistakenly extrapolated to a clinical application<sup>19,33</sup>.

The organisms selected for this study consist of significant microorganisms in the process of dental caries, endodontic infections and hospital infections with distinct morphological, tinctorial and respiratory characteristics. It was adopted as the basis for selection, microorganisms studied by other authors, which are made by *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*<sup>10,31-33</sup>. Especially in relation to the culture substrate, those used in the experiment support the nutritional requirements of fastidious microorganisms<sup>33</sup>. The study periods were chosen because of the importance in the context of the study, within the possibilities of the methodology.

The choice of these techniques was due to be simple, reproducible and effective pair the purposes described. Moreover, suitable to achieve different types of respiratory bacteria, anaerobic and facultative, and recovering microbial cells in small amounts when, especially when studying rich microbial ecosystems. The parameters such as the adoption of aseptic technique, were strictly followed during the development of these methodologies.

The bacteria used in this study were previously studied in different studies. Dental caries is an infectious disease of the mouth, with an important participation of *S. Mutans*, whose potential adherence highlights its importance in dentistry<sup>5,8-12</sup>. *E. Faecalis*, Gram-positive facultative, has highlighted how high capacity pathogenic agent in endodontic infections and hospital infections<sup>13-16,34-36</sup>. Love (2001)<sup>34</sup> verified a possible mechanism that could explain how the *Enterococcus faecalis* could survive and grow inside the dentinal tubules and reinfect a root canal filled teeth. The virulence factor of *E. faecalis* in the failure of endodontically treated teeth may be related to the ability of the cells of *E. faecalis* retain the ability to invade dentinal tubules and adhere to collagen in the presence of human serum. *Pseudomonas aeruginosa*, Gram-negative facultative bacteria, has also related to hospital infections<sup>16</sup>.

The results of this study demonstrated that the oral antiseptic solutions tested showed antibacterial effect against *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, and *Pseudomonas aeruginosa*. In the agar diffusion test, chloride cetilpirínio 0.07% and 0.075% had bacterial inhibition halos with measurements from 10 mm, whereas benzalkonium chloride exhibited greater than 12 mm for biological indicators tested. The

largest measures agar diffusion were observed in 0.12% chlorhexidine gluconate, with greater than 14 mm. In the test by direct contact, cetylpyridinium chloride 0.05% and 0.07% and 0.12% chlorhexidine gluconate showed antibacterial effect against all microorganisms only after 10 minutes of test. The solution of benzalkonium chloride showed antibacterial effect against biological indicators after 5 minutes of direct exposure to the bacteria.

Mouthwash is recommended for the control of bacterial microbiota, but not all professionals recognize the importance of their use. The effectiveness of antibacterial mouthwashes possible to reduce planktonic microorganisms and encourage the control of plaque and gingivitis.

The results of this study agree with previous reviews<sup>20,37</sup>. Lawrence (1960)<sup>20</sup> examined the antimicrobial activity of chlorhexidine, the benzalkonium chloride, povidone-iodine and phenol. Chlorhexidine played higher antimicrobial activity compared to derivatives of quaternary ammonium. Hennessey (1973)<sup>37</sup> evaluated the antimicrobial properties of chlorhexidine, verified effectiveness, and the Gram-positive organisms were more sensitive than Gram-negative, and that the *staphylococci* were more resistant than *streptococci*.

Chlorhexidine is a cationic agent that exhibits antibacterial activity. The cationic nature of the compound promotes connection with the anionic group on the bacterial surface (phosphate groups of teichoic acid in Gram-positive bacteria and lipopolysaccharide in Gram-negative bacteria), being able to change its entirety. The potassium ion, with a small entity, of the first substance to appear when the cytoplasmic membrane promotes precipitation of cytoplasmic proteins by altering the osmotic balance of the cell by interfering with the metabolism, growth, cell division by inhibiting the ATPase membrane and inhibiting the process anaerobic<sup>32</sup>.

Estrela *et al.* (2003)<sup>32</sup> determined the minimum inhibitory concentration of sodium hypochlorite 1%, 2% chlorhexidine to inhibit *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *C. albicans* and a mix of these microorganisms from a dilution series of 1:10. The results showed that the minimum inhibitory concentration of sodium hypochlorite required to inhibit 1% *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa* and *C. albicans* 0.1% and 1% for *B. Subtilis* and to the mixture. The 2% chlorhexidine showed a minimum

inhibitory concentration of 0.000002% for *S. aureus*, 0.002% of *P. aeruginosa*; 0.02% for *E. faecalis*, *B. Subtilis*, *C. albicans* and mixing.

The cationic quaternary ammonium compounds are substances with antimicrobial properties, stability and solubility in water. The antibacterial activity is related to part of the positive charge of the molecule (the cation). The structures of the quaternary ammonium compounds are related with ammonium chloride ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ )<sup>24</sup>. The cation environment of the molecule stimulates binding to anionic compound on the surface of the bacterium and is capable of altering the integrity of the cytoplasmic membrane. Once the damaged cytoplasmic membrane, the function changes involving the permeability of the cytoplasmic membrane can be observed. The inactivation of the cytoplasmic membrane enzymes has serious consequences, such as protein denaturation<sup>27,28,36,38</sup>. Cationic detergents (for quaternary ammonium compounds) are widely used as surface active agents. Two of these detergents are well known - benzalkonium chloride and cetylpyridinium chloride<sup>27</sup>.

Haps *et al.* (2008)<sup>26</sup> developed a systematic review of cetylpyridinium chloride (CPC) present in mouthwashes, depending on the effectiveness of toothbrushing, and preventing plaque accumulation and gingival inflammation. Later independent screening of titles and abstracts of 3250 manuscripts resulted in eight publications that met the eligibility criteria. The descriptive comparisons were presented for brushing or just brush your teeth and rinse. Existing evidence supports the CPC present in mouthwashes, when used as adjuvant, or not supervised oral hygiene, provides additional benefit in reducing plaque accumulation and gingival inflammation. Osso *et al.* (2013)<sup>30</sup> compared the systematic review reported that most studies have shown that mouthwashes containing chlorhexidine or essential oils and methyl salicylate provide clinical benefits of anti-plaque and gingivitis. The chlorhexidine, essential oils and the CPC have been effective. The studies support the efficacy of antiseptic mouth wash in reducing plaque and gingivitis. However, the available evidence is insufficient to support the claim that mouthwash may reduce the risk of developing periodontitis or the rate of progression of periodontitis. Estrela *et al.* (2012)<sup>36</sup> reported antimicrobial activity of cetylpyridinium chloride (CPC) in 40 infected root canals by *E. faecalis* for 60 days. The results showed the presence of *E. faecalis* later the process of root canal disinfection. Cetylpyridinium chloride was shown to reduce the number of bacteria. In the agar diffusion test, the CPC

determined microbial inhibition, with similar results to a 2% CHX and larger than sodium hypochlorite and 2.5%. Cetylpyridinium chloride showed antimicrobial activity in endodontic infection by *E. faecalis*.

The process prior to oral surgery antiseptics should be adopted as routine by maxillofacial surgeons, since the control of the microbiota present in the oral cavity may facilitate the process of tissue repair.

## CONCLUSIONS

Considering the methodology described it can be concluded that antiseptic solutions studied showed antibacterial effect by direct contact against *S. mutans*, *E. faecalis* and *P. aeruginosa*.

## REFERENCES

1. Timmerman MF, van der Weijden GA. Risk factors of periodontitis. *Int J Dent Hygiene* 2006;4:2–7.
2. Shearer BG. Biofilm and the dental office. *J Am Dent Ass* 1996;127:181-89.
3. Spratt DA. Significance of bacterial identification by molecular biology methods. *Endod Top* 2004;9:5-14.
4. Schonfeld SE. Oral microbial ecology. In: Slots J, Taubman MA. *Contemporary oral microbiology and immunology*. St. Louis: Mosby, 1992. p. 267-74.
5. Marsh PD. Plaque as a biofilm: pharmacological principles of drug delivery and action in the sub- and supragingival environment. *Oral Diseases* 2003;9: 16–22.
6. Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontology* 2000 2002;28:12-55.

7. Socransky SS, Haffajee AD. Microbiologia da doença periodontal. In: Lindhe J, Karring T, Lang NP. Tratado de Periodontia Clínica e Implantodontia Oral. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p.105-47.
8. Curtiss RIII. Genetic analysis of *Streptococcus mutans* virulence. Curr Top Microbiol Immun 1985;118:253-77.
9. Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. Microbiol Rev 1986;50:353-80.
10. Loesche WJ. Cárie dental – Uma infecção tratável. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 1993. 349p.
11. Caufield PW, Walker TM. Genetic diversity within *Streptococcus mutans* evident from chromosomal DNA restriction fragment polymorphisms. J Clin Microbiol 1989;27:274-6.
12. Matsumoto Y, Sugihara N, Kosek M, Maki Y. A rapid and quantitative detection system for *Streptococcus mutans* in saliva using monoclonal antibodies. Caries Res 2006;40:15-9.
13. Molander A, Reit C, Dahlén G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. Int Endod J 1998;31:1-7.
14. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative retreatment. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 1998;85:86-93.
15. Portenier I, Waltimo T, Haapasalo M. *Enterococcus faecalis* – The root canal survivor and “star” in post-treatment disease. Endod Top 2003;6:135-59.
16. Slots J, Taubman MA. Contemporary Oral Microbiology and Immunology. St Louis: Mosby, 1992. 649p.



17. Socransky SS, Haffajee AD. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. *J Periodontol* 1992;63:322-31.
18. Villoria GEM, Costinha LHC. Antissépticos bucais no controle da bacteremia de origem oral. *Revista HUPE* 2013;12:76-83.
19. Bammann LL, Estrela C. Microbiological aspects in endodontics. In: Estrela C. *Endodontic Science*. 2 ed. Artes Médicas: São Paulo, 2009.
20. Lawrence CA. Antimicrobial activity *in vitro* of chlorhexidine. *J Amer Pharmaceut Ass* 1960;49:731-4.
21. Schroeder HE, Marthaler TM, Muhlemann HR. Effects of some potencial inhibitors on early calculus formation. *Helv Odont Acta* 1962;6:6-9.
22. Gjermo P, Baastad KL, Rölla G. The plaque-inhibiting capacity of 11 antibacterial compounds. *J Periodont Res* 1970;5:102-9.
23. Bonesvoll P, Gjermo P. A comparison between chlorhexidine and some quaternary ammonium compounds with regard to retention, salivary concentration and plaque-inhibiting effect in the human mouth after mouth rinses. *Archs Oral Biol* 1978;23:289-94.
24. Pelczar-Jr MJ, Chan ECS, Krieg NR. *Microbiology: concepts and applications*. NewYork: McGraw-Hill, 1993. p. 210-28.
25. Quirynen M, Gizani S, Mongardini C, Declerck D, Vinckier F, van Steenberghe D. The effect of periodontal therapy on the number of cariogenic bacteria in different intra-oral niches. *J Clin Periodontol* 1999;26:322-7.
26. Haps S, Slot DE, Berchier CE, Van der Weijden GA. The effect of cetylpyridinium chloride-containing mouth rinses as adjuncts to tooth brushing on plaque and

- parameters of gingival inflammation: a systematic review. *Int J Dent Hyg* 2008;6:290-303.
27. Busscher HJ, White DJ, Ateima-Smit J, Geertsema-Doornbusch G, De Vries J, Van Der Mei HC. Surfactive and antibacterial activity of cetylpyridinium chloride formulations *in vitro* and *in vivo*. *J Clin Periodontol* 2008;35:547-54.
28. Tortora GJ, Funke BR, Case CL. *Microbiology: An introduction*. 10 ed. San Francisco, Benjamin Cummings, 2009. 960p.
29. Alves D, Costa AL, Almeida RF, Carvalho JFC, Felino A. Cetylpyridinium chloride - a literature review. *Rev Port Estomatol Med Dent Cir Maxill* 2012;53:81-9.
30. Osso D, Kanani N. Antiseptic mouth rinses: an update on comparative effectiveness, risks and recommendations. *J Dent Hyg*. 2013;87:10-8.
31. Estrela C, Estrela CRA, Pécora JD, Amorim LFG, Toledo OA Eficácia antimicrobiana de formulações de digluconato de clorexidina de concentrações e procedências diferentes. *Robrac* 2004;13:10-3.
32. Estrela C, Estrela CRA. *Controle de infecção em odontologia*. São Paulo: Artes Médicas, 2003. 188p.
33. Estrela C, Pimenta FC, Estrela CRA. Testes microbiológicos aplicados à pesquisa. In: Estrela C. *Metodologia Científica*. São Paulo: Artes Médicas; 2005. p.295-326.
34. Love RM. *Enterococcus faecalis*: mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J* 2001;34:399-406.
35. Estrela C, Alencar AHG, Decurcio DA, Borges AH, Guedes AO, Estrela CRA. Influência de estratégias de sanificação no sucesso do tratamento da periodontite apical. *Robrac* 2012;21:367-75.

36. Estrela C, Sousa-Neto MD, Alves DRS, Alencar AHG, Santos TO, Pécora JD. A preliminary study of the antibacterial potential of cetylpyridinium chloride in root canals infected by *E. faecalis*. Braz Dent J 2012;23:645-53.
37. Hennessey TS. Some antibacterial properties of chlohexidine. J periodontal 1973;12:61-7.
38. Estrela C, Pécora JD. Root canal irrigants. In: Estrela C. Endodontic Science. 2 ed. São Paulo: Artes Médicas, 2009, p. 697-744.

## Anexo 2

### Normas de publicação no periódico

**ACTA  
CIRÚRGICA  
BRASILEIRA**

ISSN 0102-8650 *printed  
version*  
ISSN 1678-2674 *online  
version*

### **INSTRUCTIONS TO THE AUTHORS**

- [Scope and policy](#)
- [Organizing electronic manuscript](#)

#### **Scope and policy**

The Journal Acta Cirurgica Brasileira has rule, norm, standard and style. Follow Instructions to the Authors available from [www.scielo.br/acb](http://www.scielo.br/acb) (English) and observe models of published articles.

Manuscript that does not comply with these instructions is not accepted.

**The Journal follows - INTERNATIONAL COMMITTEE OF MEDICAL JOURNAL EDITORS - ICMJE.** Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Ethical Considerations in the Conduct and Reporting of Research: [www.icmje.org](http://www.icmje.org)

#### **Authorship**

The Journal considers all article participants as authors.

Authorship credit should be based on substantial contributions. An author must take responsibility for at least one component of the work:

1. substantive scientific and intellectual contributions to the study;
2. responsible for conception and design;
3. responsible for manuscript preparation;
4. acquisition of data, or analysis and interpretation of data;
5. manuscript writing;
6. critical revision;
7. final approval of the version to be published.

Contributors who not meet the criteria for authorship should be listed in an acknowledgments section (Ex.: Persons who provided purely technical help or general support). Cite the responsible for English language version.

**Acta Cirúrgica Brasileira** is a peer-reviewed journal and publishes articles on surgical research. Articles are submitted for review by experts who are not part of the editorial staff. The journal has national and international boards of consultants. Each manuscript is read by the Editor and one of the Associate Editors. Together, they decide whether to send the paper to outside reviewers. Rejected manuscripts are returned to authors. Editor-in-Chief has full authority over the editorial content of the journal.

The journal does not accept case reports/retrospective studies/review articles.

Must be submitted manuscripts resulted from experimental surgery.

The Editors of **Acta Cirúrgica Brasileira** welcome systematic reviews and meta-analysis and they will be regarded for publication when a surgical topic of current interest is addressed. All meta-analysis of randomized trials must adhere to guidelines outlined in the QUORUM statement (Lancet 1999;354:1896-1900) and a suitable QUORUM flow chart must be included in the submission.

Manuscript must be delivered by e-mail to the chief editor [[sgolden@terra.com.br](mailto:sgolden@terra.com.br)], written in English language.

## Organizing electronic manuscript

### First page

The title page must contain: a) the title of the article (in English and in Portuguese), which should be concise but informative. Insert the number one superscript (Arabic) indicating, after the References, where research was performed (laboratory, research center, division, department and institution).

### Affiliation

Full name of all the authors with the sequence number superscript (Roman) indicating below:

- a) the highest academic degree(s) Access [www.scielo.br/acb](http://www.scielo.br/acb) Acta Cir Bras. 2006;21(2):60 Mar-Abr. Academic degrees examples
- b) the name of division/department and institution Follow examples of

published articles.

## **ABSTRACT**

Must not exceed 200 words and should be presented in a structured format:

**Purpose:** The main aim of the study or investigation.

**Methods:** Selection of subjects (patients or experimental animals); Basic procedures.

**Results:** Main findings (giving specific data and their statistical significance).

**Conclusion:** state the main answer concerning the purpose of the study.

**Key words:** should be provided based on Medical Subject Headings - Mesh (<http://www.nlm.nih.gov/mesh/meshhome.html>).

## **Manuscript format**

### **Introduction**

Clearly state the subject and the purpose of the study. Give only pertinent citations, and do not review the subject extensively.

### **Methods**

Describe your selection of the observational or experimental subjects (patients or laboratory animals, including controls) clearly (quantity and quality). Identify all procedures in sufficient detail. Identify precisely all drugs and chemicals used, **including generic name(s)**, dosage(s), and route(s) of administration. Do not use patient's names, initials, or hospital numbers. Describe statistical procedures with enough detail to enable a knowledgeable reader with access to the original data to verify the reported results. Authors are responsible for the accuracy of their report including all statistical calculations and drug doses.

### **ETHICS**

When reporting experiments on human subjects, indicate whether the procedures were in accord with the Ethical Committee on Human Experimentation of the Institution in which the experiments were done or in accord with the Helsinki Declaration of 1975 as revised in 2008 [World Medical Association ([www.wma.net/e/policy/b3.htm](http://www.wma.net/e/policy/b3.htm)) Patients have a right to privacy that should not be infringed without informed consent. Obligation to register clinical trials in a public trials registry established by the World Health Organization. Identification number at the end of abstract [CONSORT - Consolidated Standards of Reporting Trials ([www.consort-statement.org](http://www.consort-statement.org)) and International Clinical Trials Registry Platform (ICTRP).

When reporting experiments on animals, indicate that the use of laboratory

animals follow the Council for International Organization of Medical Sciences (CIOMS) ethical code for animal experimentation (WHO Chronicle 1985; 39(2):51-6)

The journal reserves the right not to accept an article on the grounds that appropriate ethical or experimental standards have not been reached.

## **Results**

Present the results in logical sequence in the text, using table, chart and figure. Do not repeat in the text, all the data in the tables, chart and figures. In the text, emphasize or summarize only important findings. Include the statistical significance.

**Tables:** Are numbered in sequence (use arabic numerals), and supply a brief title for each at **the top**. Use only approved abbreviations. Explain in footnotes all non standards abbreviations that are used in each table. Must be without vertical lines.

**Chart:** Is descriptive and closed. title at **the top**.

**Figures [illustrations, photos, graphics]:** must be with good quality. Numbered in sequence (use arabic numerals). The legends must be **in the bottom** of the figure.

## **Discussion**

Emphasize the new and important aspect of the study Compare the method and the results with those formely published. DO NOT REPEAT RESULTS.

## **Conclusion**

Must be clear and concise. Link the conclusion with the goals of the study. AVOID CONCLUSIONS NOT SUPPORTED ON DATA.

## **Acknowledgments**

Acknowledge only persons who have made substantial contributions to the study.

## **References**

Follow model of published article

The journal follow the Vancouver style:

**UNIFORM REQUIREMENTS FOR MANUSCRIPTS SUBMITTED TO BIOMEDICAL JOURNALS of the International Committee of Medical Journal Editors ([www.icmje.org](http://www.icmje.org)).**

All references should be numbered consecutively in the order in which they are first mentioned by superscript in the text.

List all the authors, "*et al*" is not accepted.

Abbreviations of journals should conform to those used in MEDLINE/PubMed.

The article must have at a maximum of 20 references.

**References to abstracts, personal communications and books is discouraged. Books are not indexed. Reference to unpublished communications will not be accepted.**

Examples of references are given below:

### **Journal article**

List all authors

You must not repeat a set of ten, one hundred or thousand in the final page.

Diethelm AG. Surgical management of complications of steroid therapy. Ann Surg. 1977;185(3):251-63.

Park HK, Fernandez I, Dujovny M, Diaz FG. Experimental animal models of traumatic brain injury: medical and biomechanical mechanism. Crit Rev Neurosurg. 1999;9:44-52.

### **Correspondence:**

Name, address

Phone/Fax, e-mail of author.

**Declare** conflict of interest.

Inform the source(s) of support.

Inform where research was performed (laboratory, research center, division, department and institution).

### **PROCEDURES OF THE JOURNAL**

1. The article will be examined to verify whether it complies with the journal's instructions; **Manuscripts that do not conform to the requirements and style of the journal will be returned for recasting. Do an accurately revision of the manuscript before sending it;**
2. The article will be submitted to peer-review for analysis and approval, in addition to approval by the Editors;
3. After approval, the manuscript will be published according to the date of submission.

The Editors retain the right to alter style and shorten material for publication.

**PLEASE, CONSULT RECENT ISSUES OF THE JOURNAL available**



from [www.scielo.br/acb](http://www.scielo.br/acb)

### **Copyright to Acta Cirurgica Brasileira**

This statement must be sent in a separate letter to the editor together with the paper and **must be signed by all authors**. Submissions received without a signed copyright statement will not be acceptable. The main author is responsible for ensuring that all authors have seen, approved and are fully conversant with its contents.

#### **Copyright transfer**

The authors undersigned transfer copyright of the article

#### **name of article**

to Acta Cirúrgica Brasileira. They declare that this is an original unpublished article that does not transgress any copyright or intellectual property rights of other people and it **is not being evaluated for publication in other journals**. The article has been read and each contribution was approved.

Names of authors

date

**Article that do not comply with these instructions is not accepted**

#### **Manuscript Fees:**

In order to participate in publication costs, authors have a charge of US\$400.00 for each accepted manuscript. Please send payment order to:

#### **Beneficiary Customer:**

SOCIEDADE BRASILEIRA DESENVOLVIMENTO PESQ CIRURGIC SOB RADPEC  
ALAMEDA RIO CLARO , 179 AP 141  
CNPJ: 57.860.488/0001-44

**Account number: 001189880000091618**

**Beneficiary Bank:** BANCO DO BRASIL S.A.

São Bernardo do Campo (SP) Brasil

**BIC SWIFT:** BRASBR RJ SBO

**Address: RUA SÃO BENTO, 465 5º ANDAR, CENTRO SÃO PAULO SP**

**Through:** BANCO DO BRASIL S.A.

New York - USA

**BIC SWIFT:** BRASUS33

**ABA:** FW026003557

**FURTHER INFORMATION OR QUESTIONS PLEASE CONTACT  
PROF. SAUL GOLDENBERG**

Editor-in-Chief

[sgolden@terra.com.br](mailto:sgolden@terra.com.br)