

AValiação DA CITOTOXICIDADE DAS SOLUÇÕES DE CLOREXIDINA NAS CONCENTRAÇÕES DE 2,5 % A 5%

EVALUATION OF CYTOTOXICITY IN CHLORHEXIDINE SOLUTIONS CONCENTRATIONS OF 2,5% TO 5%

Lílian Márcia Marins Cruz

Graduanda em Odontologia pela FO-UFF

Ana Gabriela Serejo Nascimento

Graduanda em Odontologia pela FO-UFF

Licínio Esmeraldo da Silva

Professor Adjunto do Departamento de Estatística – UFF

Bruno Leal Alves Ferreira Bruno Leal

Biólogo
Especialista em Microbiologia e Parasitologia aplicadas
Mestre em Neuroimunologia
Doutor em Neuroimunologia

Maria Theresa Alves da Cunha Kalil

Especialista em Motricidade Oral
Mestre em Motricidade Oral
Professora Assistente da Universidade Federal Fluminense

Helena Carla Castro Almeida

Professor Associado do Departamento GCM/EGB - UFF

Endereço para correspondência:

Rua: Cel. Moreira César 229, sala 1809
Icaraí, Niterói - RJ
CEP: 24.230.052
E-mail: odontok@gmail.com

Recebido em: 03/07/2012

Aceito em: 02/10/2012

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar, *in vitro*, os efeitos citotóxicos da solução aquosa de digluconato de clorexidina nas concentrações de 2,5% a 5%. Empregou-se o teste de citotoxicidade em cultivo de monocamadas celulares através de linhagens de células Hep-2, por leitura em espectrofotômetro. Comparadas as amostras nas concentrações avaliadas pelo método da análise de variância (ANOVA), o resultado mostrou que a um nível de significância de 5% há diferenças entre os tratamentos. Por meio da metodologia empregada, verificou-se que as amostras com concentrações de 2,5%, 3% e 3,5% comportaram-se como não citotóxicas. Por sua vez, as concentrações de 4%, 4,5% e 5% obtiveram valores de, respectivamente, 21,3%, 32,7% e 67%, representando, assim, a quantidade de células que foram eliminadas da colônia. Os dados afirmam que a concentração de clorexidina torna-se citotóxica a partir de aproximadamente 3,5%. Os dados para um controle positivo com hipoclorito de sódio (HS) a 5% forneceu o percentual de 100% de células eliminadas. Isto permitiu constatar que o HS a 5% é mais citotóxico do que qualquer uma das concentrações de testadas. O conhecimento das diferentes concentrações e propriedades do digluconato de clorexidina permite ao cirurgião-dentista e a outros profissionais utilizar esta substância em sua específica indicação.

Palavras-chave: Clorexidina. Citotoxicidade. Odontologia.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate *in vitro* cytotoxic effects of aqueous chlorhexidine digluconate at concentrations of 2.5% to 5%. We applied the test of cytotoxicity in cell culture monolayers using cell lines Hep-2 by a spectrophotometer. Concentrations compared to the samples analyzed by the method of analysis of variance (ANOVA), the result showed that the significance level of 5% for differences between treatments. By methodology, it was found that samples with concentrations of 2.5%, 3% and 3.5% behaved as non-cytotoxic. In turn, the concentration of 4%, 4.5% and 5% measured values of respectively 21.3%, 32.7% and 67%, thus representing the amount of cells were removed from the colony. The data say the concentration of chlorhexidine becomes cytotoxic from about 3.5%. The data for a positive control with sodium hypochlorite (HS) and 5% provided the percentage of 100% of cells discarded. This is found that the 5% HS is more cytotoxic than any of the concentrations tested. Knowledge of different concentrations and properties allows the digluconate declorhexidina dentists and other professionals use this substance in the specific indication.

Keywords: Chlorhexidine. Cytotoxicity. Odontology.

INTRODUÇÃO

Testes de citotoxicidade são frequentemente utilizados na pesquisa em Odontologia para avaliar a citotoxicidade relativa e, assim, investigar os efeitos de materiais sobre células. Além de permitirem a utilização da pesquisa quantitativa para sobrevivência e proliferação celular (BAUMGARTHER *et al.*, 1984; CARVALHO *et al.*, 1999; CCHA, 1990). Eles representam um método importante para a avaliação dos aspectos da segurança e eficácia das soluções quanto à exposição aos tecidos (HARRISON, 1984; PAIVA *et al.*, 1993; KOULAUZIDOU *et al.*, 1999).

Trabalhos aplicados em cultivo celular de monocamadas celulares, por leitura em espectrofotômetro, têm demonstrado ser um recurso eficiente e visam medir a sobrevivência ou a proliferação celular, demonstrando rapidez e precisão. É um método automatizado que possibilita a manipulação de um grande número de amostras com alto grau de precisão, proporcionando uma adicional vantagem: a de se trabalhar os resultados com processadores computadorizados. Estes medem o número de atividades de células vivas ao fim da pesquisa, sendo também de fácil reprodução (GILLIES *et al.*, 1986; MARGIS *et al.*, 1989).

Os testes, *in vitro*, são muito úteis para a compreensão dos efeitos biológicos básicos dos materiais dentários, mas eles podem ser limitados, no que diz respeito à habilidade de simularem condições clínicas. Pode ser

irreal transferir achados, *in vitro*, para situações clínicas. Contudo, uma interpretação comparativa destes dados fornece valiosa informação do potencial geral de toxidade dos materiais tratados, como relatado pelos autores Kimoto (2001), Koulaouzidou (1999) e Lopes (1999).

Com relação à escolha das soluções a serem avaliadas, Kuruvilla, em 1998, demonstrou a capacidade antimicrobiana das soluções aquosas de hipoclorito de sódio (HS) a 2,5% e clorexidina (CHX) a 0,2 %, concluindo que o uso combinado destas duas substâncias, como agentes irrigantes dos canais radiculares, é mais eficiente do que seu uso isolado, habilitando a solução aquosa de clorexidina como agente químico auxiliar antibacteriano ao preparo químico mecânico dos canais radiculares. Assim como Ferraz (2001), que avaliou em estudo, *in vitro*, a ação antimicrobiana e a habilidade mecânica do gel de clorexidina como irrigante do canais radiculares, concluindo, da mesma forma, que o digluconato de clorexidina tem potencial para ser utilizado como solução irrigante dos canais radiculares.

Já a solução de hipoclorito de sódio é a substância mais utilizada durante a terapia endodôntica, visto que promove a limpeza do resto pulpar contaminado ou vital, auxiliando a instrumentação dos canais radiculares (HARRISON, 1984).

No entanto, com relação ao tratamento das infecções endodônticas, qualquer substância antimicrobiana, invariavelmente, irá

apresentar toxicidade às células vivas. Isto porque não detém propriedade de seletividade para bactérias, o que torna difícil conciliar a ação antibacteriana, ou solvente de tecido, ou ainda quelante, com a compatibilidade biológica, já que, quanto maior a concentração das soluções mais efetiva se torna a sua ação antibacteriana (LOPES, SIQUEIRA, 1999).

Contudo, do ponto de vista clínico, a correta interpretação dos resultados obtidos através destes testes fornece subsídios

importantes para segura indicação das substâncias (KALIL, 2000; KIMOTO *et al.*, 2001; MARLEY *et al.*, 2001).

Dentre outros estudos citados neste trabalho, nenhum empregou concentrações superiores a 2,0% de clorexidina (CHX). Sendo assim, na busca de esclarecimento, este trabalho teve como objetivo avaliar, *in vitro*, a citotoxicidade relativa da solução de clorexidina de 2,5 a 5% em cultivos de células Hep-2, comparada à solução aquosa de hipoclorito de sódio a 5%.

MATERIAL E MÉTODOS

CULTURA DE CÉLULAS

As células utilizadas neste experimento são uma linhagem de células Hep-2 originária de células epitelióides, carcinoma de laringe humana (Departamento de Imunologia- INCQS). Trata-se de uma linhagem que foi aceita e parte da Coleção Americana de Tipos de Cultura Celulares (ATCC), desde 1961 (ATCC, 1988; LEVIN, 1817; MASTERS, 2000).

TESTE APLICADO

Foram dispensados 250µl por poço da solução aquosa de digluconato de clorexidina nas concentrações de 2,5%, 3%, 3,5%, 4%, 4,5% e 5% de uso em Endodontia (H. HAHNEMANN LTDA, RJ, Brasil), em placas de 24 poços, contendo a monocamada celular para avaliação, conforme Figura 1.

Com a finalidade de retirar do experimento qualquer possibilidade de erro nas leituras, foram testados, também, os efeitos diretos da solução de clorexidina nas concentrações de 2,5%, 3,0%, 3,5%, 4,0%, 4,5% e 5,0% na placa. A leitura dos poços, sem qualquer

solução ou célula (grupo branco), também foi realizada para eliminar os possíveis efeitos da placa na leitura por espectrofotômetro e, ainda, do meio com a placa. O controle negativo foi realizado nos poços contendo a monocamada celular com o meio Dulbecco's (Eagle's modificado) para cultura celular. E, finalmente, o controle positivo com a solução aquosa de hipoclorito de sódio a 5% (Biodinâmica Química e farmacêutica LTDA), em placa específica (KURUVILLA, KAMATH, 1998).

O tempo de exposição padronizado foi de cinco minutos, visto que este teste permite a exposição direta das soluções em suas concentrações de uso, obedecendo, ainda, a critérios individuais e pertinentes ao mecanismo de ação da solução utilizada, levando-se em conta o tempo de permanência da substância no organismo (SEMRA, AHMET, 2000; SIQUEIRA JR *et al.*, 1999).

Em seguida, procedeu-se à lavagem das células com solução PBS, 500µL, através do poço e, em seguida, fixação com 1mL de solução salina fosfatada (PBS) com formol a 0,01%, por 15 minutos. Só depois da comple-

	1	2	3	4	5	6
A	Branco (Placa vazia)	Branco (Placa vazia)	Branco (Placa vazia)	Branco (Meio + Cel)	Branco (Meio + Cel)	Controle (Meio + Cel)
B	CHX (placa)	CHX (placa)	CHX (placa)	Meio (placa)	Meio (placa)	Meio (placa)
C	CHX 2,5%	CHX 3,0%	CHX 3,5%	CHX 2,5%	CHX 3,5%	CHX 3,5%
D	CHX 4,0%	CHX 4,5%	CHX 5,0%	CHX 4,0%	CHX 4,5%	CHX 5,0%

FIGURA 1
Esquema da placa de 24 poços da forma como foi realizado no experimento.

ta secagem das placas, colocou-se o corante Coomassie Brilliant Blue R- 250, 250µL por orifício, durante uma hora. Após este período, lavaram-se as placas em água com posterior secagem e, com finalidade de eluição, colocou-se 1mL/poço de solução de dodecil-sulfonato de sódio (SDS) a 1,0%, por uma hora. Passou-se, então, à leitura ótica no leitor de microplacas

Bio-Tec ELX-800, com um comprimento de onda de 595nm. O processamento da placa, para fins de leitura, foi realizado em todos os 24 poços das cinco placas deste experimento e os resultados, submetidos aos critérios de classificação da Norma número 9 da FDI de 1980 (LAUGHTON, 1984; MARGIS, BOTOJEVIC, 1989; STANFORD, 1980).

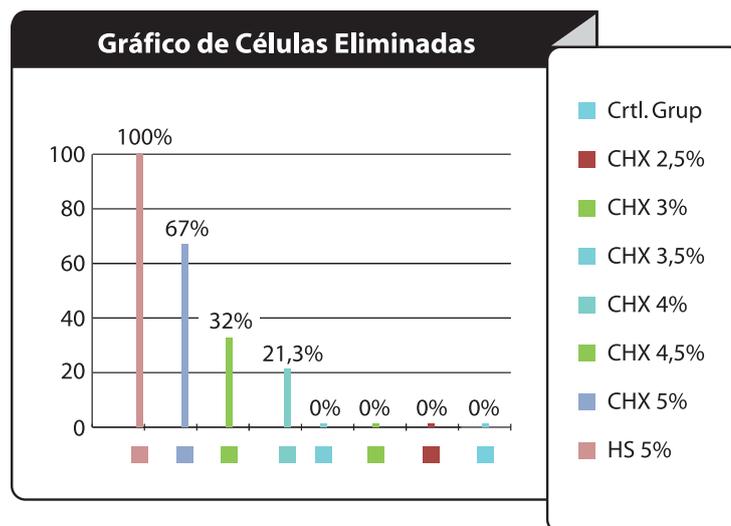
ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos protocolos foi realizada para as soluções aquosas de clorexidina a 2,5%, 3,0%, 3,5%, 4,0%, 4,5% e 5,0%, e hipoclorito de sódio a 5,0%, através da modelagem matemática para um delineamento fatorial com dois fatores (substância e fator de diluição): o primeiro, com oito níveis (as oito substâncias) e o segundo, com cinco níveis (a solução de uso de cada substância, que correspondente à metade da de uso, a correspondente à quarta parte da solução de uso, à oitava parte e à décima sexta parte), o que fornece 40 cruzamentos. Para cada uma dessas quarenta possibilidades, foram realizadas nove observações da variável de resposta. A análise estatística realizada foi a ANOVA (Análise da Variância) para um experimento fatorial a dois fatores com oito e cinco níveis, com variável de resposta identificada como percentual de células sobreviventes, após a ação do agente químico durante cinco minutos (LAUGHTON, 1984). A identificação das diferenças entre as quarenta combinações foi precedida usando o método HSD (diferença mínima significativa) de Tuckey a 1% de significância (LEVIN, 1817).

RESULTADOS

A leitura em espectrofotômetro forneceu valores que, transferidos para o computador, forneceram planilhas que permitiram a confecção de gráficos.

A análise estatística realizada foi a ANOVA (Análise da Variância), para um experimento fatorial a dois fatores com oito e cinco níveis,



com variável de resposta identificada como o percentual de células sobreviventes após a ação do agente químico.

Os resultados obtidos por este teste foram avaliados de duas maneiras.

A primeira, através de uma análise estatística da variância, cujo resultado mostrou que, a um nível de significância de 5%, há diferenças entre os tratamentos. O valor-p de $1,03 \times 10^{-17}$ traz um resultado altamente significativo. A segunda foi através das porcentagens obtidas de células mortas.

Os resultados do Gráfico 1 representam a diferença entre os grupos controles e a quantidade de células que sobreviveram, dando um resultado que representa, aproximadamente, o número de células lesadas, permitindo uma conclusão sobre o grau de citotoxicidade das substâncias.

Os resultados obtidos através da análise do gráfico de células lesadas neste experimento foram submetidos aos critérios que constam da norma de testes de citotoxicidade número 9 da FDI de 1980 (Tabela 1).

GRÁFICO 1

Quantidade de células eliminadas da colônia posta em experimentação.

Zero	Não Citotóxico	Sem Lise Celular	Soluções
1,0	Pouco Citotóxico	Lise Celular de até 20%	CHX 0%
2,0	Moderadamente Citotóxico	Lise Celular de até 40%	
3,0	Severamente Citotóxico	Lise Celular acima de 40%	HS 100%

TABELA 1
Norma número
9 da FDI.

DISCUSSÃO

Os testes de citotoxicidade *in vitro* fazem parte dos testes que avaliam a biocompatibilidade dos materiais odontológicos. Estudos em cultivo celular, como o presente, vêm sendo utilizados por mais de trinta anos, visando à avaliação da citotoxicidade induzida por materiais utilizados em Endodontia e em outras áreas da ciência (GILLIES *et al.*, 1986; MARGIS, BOROJEVIC, 1989; HAUMAN, LOVE, 2003).

No entanto, a metodologia empregada em outros trabalhos *in vitro* não permite a avaliação das soluções em suas concentrações de uso, o que não acontece no teste de contagem por espectrofotômetro. Este fator permite maior confiabilidade nos resultados. Ademais, são utilizadas no controle de qualidade de soros e vacinas pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade na Saúde, da mesma forma (CRAIG *et al.*, 1997; KIMOTO *et al.*, 2001; KOULAOUZIDOU *et al.*, 1999; MARGIS *et al.*, MASTERS, 2000; 1989; MONTGOMERY, 1997; MOSMANN, 1983).

Os resultados obtidos através deste experimento, quando comparados aos resultados de outros trabalhos semelhantes que se utilizam de cultivo celular, demonstram correspondência, o que o credencia como um recurso de fácil reprodução e eficiente no estudo da citotoxicidade *in vitro* (FERRAZ *et al.*, 2001; KALIL, 2000; KIMOTO *et al.*, 2001; MONTGOMERY, 1997; OSÓRIO *et al.*, 1998).

Não parece existir um consenso quanto à padronização de um cultivo celular universal. Pelo contrário, os ensaios são realizados em diferentes linhagens celulares, visto que, na verdade, as células cultivadas são fibroblastos humanos (BAUMGARTNER *et al.*, 1984; LAUGHTON, 1984; MONTGOMERY, 1997; CHANG *et al.*, 1998; KOULAOUZIDOU *et al.*, 1999; KIMOTO *et al.*, 2001).

Outro fator importante é a padronização do tempo de exposição ou tempo de incubação das substâncias testadas. Os trabalhos avaliados parecem obedecer a critérios individuais e pertinentes à característica de cada material avaliado. O tempo de permanência da substância no organismo, tempo de uso em Endodontia, é conhecido. Portanto, convencionou-se o tempo de exposição em cinco (5,0) minutos para avaliação da eficácia, levando-se em conta a sua utilização com segurança (SEMRA, AHMET, 2000).

O mecanismo de ação das substâncias testadas, assim como o tempo de exposição aos tecidos delas e local de utilização, foram levados em consideração para o modelo metodológico do presente trabalho. Isto porque os testes de longa duração e baixas concentrações, em substâncias que manterão contato com o organismo por breve espaço de tempo, servem mais como ilustração para extrapolação de resultados do que a simulação direta de utilização.

Frente às pesquisas relatadas na literatura, convém destacar a necessidade do perfeito conhecimento dos efeitos biológicos básicos das soluções irrigadoras dos canais radiculares, para uma segura indicação e, portanto, para possibilitar maior segurança e sucesso na clínica diária.

Pesquisas adicionais são necessárias para assegurar que os efeitos de tais agentes sejam completamente compreendidos. É preciso, ainda, considerar que existem limitações quando as informações científicas são obtidas através do sistema de modelo de cultivo celular e que há riscos de extrapolar os resultados para a clínica. Um trabalho clínico para avaliar uma situação *in vivo* deve ser considerado, assim como trabalhos visando a avaliar sua atividade microbiana.

CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que as soluções aquosas de clorexidina a 2,5%, 3%, e 3,5% reagiram como não citotóxicas. No entanto, as soluções de 4,0% e 4,5% comportaram-se como soluções moderadamente citotóxicas. Contudo, a de 5% comportou-se como solução severamente citotóxica, semelhante à de hipoclorito de sódio a 5%. Entretanto, os dados para um controle positivo com hipoclorito de sódio a 5% (soda clorada) forneceu o percentual de menos de 9% de células sobreviventes (ou 109% de células eliminadas), significando que esta solução destruiu todas as células submetidas aos testes e mais um percentual da própria placa. A potência destrutiva da clorexidina estará igualada à da soda clorada a 5% quando sua concentração alcançar o nível de 5,2%. Estes resultados permitem afirmar que a soda clorada a 5% é mais citotóxica do que qualquer uma das concentrações de clorexidina testadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Baumgartner, J.C.; Brown, C.M.; Mader, C.L.; Peters, D.D.; Shulman, J.D. *A scanning electron microscopic evaluation of root canal debridement using saline, sodium hypochlorite and citric acid*. J Endod 1984; 10:525-31.
2. Carvalho, E.M.O.F.; Robazza, C.R.; Marques, J.L.L.; Mello, I. *Análise da superfície dentinária, por meio de microscopia eletrônica, após condicionamento ácido*. RBO 1999; 56:108-11.
3. Chang, Y.; Huang, F.; Cheng, N.; Chou, L.S.; Chou, M. *In vitro evaluation of cytotoxicity and genotoxicity of root canal medicines on human pulp fibroblast*. J Endod 1998; 24:604-6.
4. Craig, R.G.; Ziroff, M.; Rosemberg, P.A. *The effect of endodontic materials on periodontal ligament cell proliferation, alkaline phosphatase activity, and extracellular matrix protein synthesis in vitro*. J Endod 1997; 23:494-8.
5. Ferraz, C.C.R.; Gomes, B.P.F.A.; Zaia, A.A.; Teixeira, F.B.; Souza-Filho, F.J. *In vitro assessment of the antimicrobial action and the mechanical ability of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant*. J Endod 2011; 27:452-8.
6. Gillies, R.J.; Ddier, N.; Denton, M. *Determination of cell number in monolayer cultures*. Anal Biochem 1986; 159:109-13.
7. Harrison, J.W. *Irrigation of the root canal system*. Dent Clin North Am 1984; 28:797-808.
8. Hauman, C.H.J.; Love, R.M. *Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review*. Part 1. Intracanal drugs and substances. Int Endod J 2003; 36:75-85.
9. Kalil, M. da V. *Estudo comparativo entre as soluções de ácido cítrico a 10% e EDTA a 15% pelo teste in vitro, em culturas de células hep-2* [Mestrado em Odontologia, área de concentração Clínica Odontológica – Dissertação]. Niterói: Faculdade de Odontologia, Universidade Federal Fluminense; 2000. 147f.
10. Kinomoto, W.; Carnes Jr, D.L.; Ebiso, S. *Cytotoxicity of intracanal bleaching agents on periodontal ligaments cell in vitro*. J Endod 2011; 27:574-7.
11. Koulaouzidou, E.A.; Margelos, J.; Beltes, P.; Kortsaris, A.H. *Cytotoxic effects of different concentrations of neutral and alkaline EDTA solution used as root canal irrigants*. J Endod 1999; 25:21-3.
12. Kuruvilla, J.R.; Kamath, M.P. *Antimicrobial activity of 2,5% sodium hypochlorite and 0,2% chlorhexidine gluconate, separately and combined, as endodontics irrigants*. J Endod 1998; 24:472-6.
13. Laughton, C. *Quantification of attached cells in microtiter plates based on coomassie brilliant blue g-250 staining of total cellular protein, analytical biochemistry*. J Endod 1984; 140:417-23.
14. Levin, J. *Estatística aplicada a ciências humanas*. 2ª ed.[S.l]: Harbra; 1817.
15. Lopes, H.P.; Siqueira Jr, J.F. *Endodontia: Biologia e técnica*. 1ªed.[S.l]: EDSI; 1999.
16. Margis, R.; Borojevic, R. *Quantification of attached cell in tissue culture plates and on microcarries*. Anal Biochem 1989; 181:209-11.
17. Marley, J.T.; Freguson, D.B.; Hartwell, G.R. *Effects of chlorhexidine gluconate as an endodontic irrigant on the apical seal: short-term results*. J Endod 2001; 27: 775-8.
18. Masters, J.R.W. *Animal cell culture*. 3rd edition. Oxford University Press; 2000.
19. Montgomery, D.C. *Design and analysis of experiments*. 4ª ed. New York: John Wiley and Sons; 1997.
20. Paiva, J.G.; Antoniazzi, J.H. *Endodontia, bases para a prática clínica*. 2ª ed. São Paulo: Artes Médicas; 1993.
21. Mosmann, T. *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay*. J Immunol Methods 1983; 83:55-64.
22. Osório, R.M.; Heft, A.; Vertucci, F.J.; Shawley, A.L. *Cytotoxicity of endodontic materials* 1998. J Endod 1998; 24:91-6.
23. Semra, Ç.; Ahmet, S. *Time – depend effect of EDTA on denting structures*. J Endod 2000; 28:17-9.
24. Siqueira Jr, J.F.; Moraes, S.R.; Lopes, H.P. *Atividade antimicrobiana das águas sanitárias disponíveis no mercado nacional*. RBO 1999; 56:57-60.
25. Stanford, J.W. *FDI Technical report n.9: recommended standard practices for biological evaluation of dental materials*. Int Dent J 1980;30:40-88.