UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

CAROLINE GOMES CARVALHO

Avaliação do efeito antimicrobiano da biguanida de polihexametileno (PHMB) comparada com digluconato de clorexidina (CHX) sobre um biofilme de microcosmos de saliva: Estudo *in vitro*

BAURU
2021

CAROLINE GOMES CARVALHO

Avaliação do efeito antimicrobiano da biguanida de polihexametileno (PHMB) comparada com digluconato de clorexidina (CHX) sobre um biofilme de microcosmos de saliva: Estudo *in vitro*

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Estomatologia, Radiologia e Imaginologia.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Sérgio da Silva Santos

Coorientador: Prof. Dr. Thiago Cruvinel da Silva

BAURU

2021

Carvalho, Caroline Gomes
Avaliação do efeito antimicrobiano da biguanida de polihexametileno (PHMB) comparada com digluconato de clorexidina (CHX) sobre um biofilme de microcosmos de saliva: Estudo *in vitro* / Caroline Gomes Carvalho. -- Bauru, 2021.
96 p.: il.; 31 cm.

Dissertação (mestrado) -- Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, 2021.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Sérgio da Silva Santos

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação/tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura: Caroline Gomes Carvalho.

Data: 03/08/2021

Comitê de Ética da FOB-USP
CAAE: 24525419.4.0000.5417
Parecer nº: 3.769.245
Data: 13/11/2019

DEDICATÓRIA

Dedico está conquista àqueles que são meu combustível de amor: a Deus, aos meus pais, Walber e Itamara; aos meus irmãos, Dyan e Júnior; e ao meu sobrinho Lucca. Seguir o caminho que Deus planejou para mim se tornou mais fácil com o amor e compreensão de vocês!

AGRADECIMENTOS

O maior agradecimento de minha vida é e sempre será a **Deus**. Ao meu Deus que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos da minha vida, que me permitiu enxergá-lo e viver aos Teus planos e Teus propósitos. Ao Deus que segurou na minha mão e caminhou comigo de São Luís/MA até Bauru/SP, foi tão nítido ver e sentir isso. Ao meu Deus que me acompanhou e assistiu de perto cada vitória, aflição, sorrisos, choros, angústia, felicidade, medo e saudade. Ao meu Deus que me disse "se tiver medo, Eu estou contigo, só confia em Mim". E eu simplesmente fiz. Fiz tudo o que Ele me mostrou através de meu coração e continuarei fazendo sempre. Te escutando quando Tu falas comigo no meu coração. Agradeço por me fazer Te sentir pertinho de mim e saber que eu sou forte, não porque Tu disseste para eu ser forte, mas sim, porque forte és Tu, o meu Deus, que habita em mim. Assim, eu me sinto a maior fortaleza e a nossa dupla é imbatível. Sempre foi e sempre será: Tu e eu. Se eu estou aqui, se eu fui capaz de fazer isso tudo, é porque Tu permitiu, assim como cada passo que eu dou em minha vida. Tudo és Tu! Tudo é Teu! Eu sou Tua e Tu és meu! Obrigada, obrigada e obrigada!

Agradecer ao meu pai, **Walber Jerônimo Carvalho** (*In memoriam*), chega a ser ousadia de minha parte. Ousadia em querer agradecer em palavras, que não são suficientes, um ser que fez TUDO por mim. O TUDO é absolutamente TUDO, em todo o tamanho e profundidade da palavra. Escrevo esse agradecimento no dia que completa dois meses sem a tua presença física, mas no meu coração, pai, tu estás comigo a cada segundo e eu sei que tu sabes do meu mais profundo agradecimento, o quanto sou grata por ter você e ter sido você. Sou eternamente grata por ter acreditado em mim, muito mais do que eu mesma. Por ter depositado tua confiança em mim. Por ter investido em mim. Por todos os teus ensinamentos, por você ser o meu espelho de dedicação, responsabilidade, respeito e integridade. A minha vida será uma eterna homenagem a você, porque você está dentro de mim e é responsável por quem eu sou hoje. E essa dissertação é tão sua, quanto minha. Você que fez isso tudo ser possível. Pai, eu serei mestre pela USP, acredita?! Eu queria tanto que você assistisse minha defesa para você saber tudo o que eu fiz nesses dois anos, mesmo sabendo que você não ia entender nada (como foi no meu TCC rs), mas só você me assistir e ver o que eu faço, eu fico tão feliz. Eu sei que agora você não está fisicamente, mas eu sei que sempre estará na primeira fila me assistindo e continuará cheio de orgulho de mim. Obrigada por ser você!

Sou muito agradecida pela minha família, pela base onde fui criada, pelos valores e princípios que fizeram parte de minha construção. Agradeço a minha mãe, **Itamara Sousa Gomes Carvalho**, por todo apoio, acolhimento, amor, saudade, carinho e tantos outros sentimentos mais que nos rodeavam por todo esse tempo longe. Obrigada por ser meu porto seguro, enquanto o mundo é tempestade. Obrigada por sempre apoiar todos os meus sonhos, independente do que seja, por mais que para realizar alguns eu precise ficar longe. Obrigada por ser bondade em tudo o que faz e em tudo o que toca, e por toda integridade de ser humano que te torna admirável e sempre um espelho para mim. Obrigada por TUDO! Aos meus irmãos, **Dyan** e **Júnior**, que me agregaram aprendizados como ser humano ao longo de minha vida, seja pela nossa convivência, por servirem de exemplo e por serem apoio, porque sei que, em qualquer circunstância, eu posso contar com vocês. Amo todos vocês! Obrigada pela compreensão de minha ausência física e os corações apertados de saudade. Saibam que vocês sempre foram e sempre serão o meu porto seguro que me impulsionam a ser melhor e ir mais longe.

Agradeço tanto ao meu sobrinho querido, lindo, amável e danado, **Dyan Lucca** (meu amor di vida!). Ah, meu amor! Se você soubesse o QUANTO foi difícil ficar longe de ti e o quanto isso deixava meu coração partido. Eu só rezava MUITO MUITO para que tudo tivesse um propósito e para que essa distância não fizesse você esquecer de mim. E Deus me surpreende, como sempre Ele tem os melhores planos. E voltar a te ter por perto é melhor do que ganhar na loteria. Ter teu abraço, teus cheiros e tuas danadezas, é combustível de vida. Neném, tu é luz que ilumina nossas vidas, é alegria que contagia. Você me inspira a ser melhor e que eu continue lutando para fazer do mundo um lugar melhor a cada dia mais para você. A titia te ama tanto!

Agradeço de todo coração ao meu orientador, **prof. Dr. Paulo Sérgio da Silva Santos.** Prof, primeiramente, muito obrigada por ter me convencido a fazer a prova do mestrado. Não foi só uma prova para ingressar na USP, mas sim uma prova que colocou em prova todos os meus medos, anseios, frustrações, e me fez perceber que eu sou maior do que isso tudo, muito mais segura de minha capacidade. Obrigada por acreditar em mim! Obrigada pela oportunidade de estar perto do sr, pela convivência (inclusive, saudades!) e por todos os aprendizados, afinal, eu fui orientanda de um profissional que eu muito admirava e continuo admirando. Antes, essa admiração era profissional, hoje vai muito além dessas barreiras, principalmente, pelo seu coração e pelo ser humano que és. Obrigada pela oportunidade de ver de perto o seu cuidado e o seu olhar acolhedor para com aqueles que convivem com o sr. Obrigada pelo seu acolhimento

comigo, pela sua sensibilidade e pelos abraços confortantes (sempre que eu precisava, o sr conseguia perceber e eu ganhava um abraço bem quentinho). Obrigada, principalmente, pelos aprendizados que constroem a nossa vida como seres humanos. O sr mora no meu coração!

Ao **prof. Dr. Thiago Cruvinel da Silva** pelos seus conhecimentos sobre o mundo da microbiologia e parceria entre os departamentos que foram essenciais para realização desta pesquisa. Agradeço de todo coração pelo aprendizado que está pesquisa agregou na minha vida. Eu adorei a oportunidade de poder conhecer o universo da pesquisa laboratorial e que muito me encantou. Gratidão!

Ao meu amigo/irmão **João Victor**, que por obra de Deus, nos reencontramos em busca de nossos sonhos. Obrigada por ser você desde o início! Obrigada pela tua amizade ser tão verdadeira e sincera, e que distância nenhuma foi capaz de mudar um nada! Obrigada pelo teu companheirismo, compreensão, cuidado, alegria e empolgação contagiantes, e pelos abraços quentinhos para me proteger do frio. Obrigada pelo teu otimismo desde antes do resultado da prova, em já planejar um milhão de coisas. Contigo eu aprendi a emanar só energia boa para o universo, porque tu fez eu ver que tudo é possível, basta acreditar! Obrigada por tudo, Jô! Você é muito importante e especial na minha vida!

A **Daniela**, responsável por me apresentar o universo da microbiologia. Você fez isso com tanta leveza e amor por ser tão dedicada ao que faz, então não tinha como eu não absorver o mesmo sentimento. Aprender com você tornou tudo mais apaixonante, simples e fácil. Dani, muito obrigada por dedicar seu tempo, pelos ensinamentos, paciência, carinho e por sua amizade. Todo sucesso do mundo pra você!!

Aos amigos que fiz no Departamento. A **Aneliza**, a amiga que foi antipatia à primeira vista (rs), mas hoje já tem meu amor e faz morada no meu coração! Compartilhamos nossas experiências diárias a respeito de tudo, experiências boas e nem tão boas assim. Amiguinha, obrigada pela sua amizade, companhia e carinho sempre! A **Dayanne (Nanynha)**, minha quase gêmea ruiva com superpoderes extraterrestres, certeza que é encontro de outras vidas. Nanynha, obrigada por fazer meus dias coloridos, tagarelantes e circundados por energias maravilhosas! Você é luz! A **Raquel**, a dona de um coração tão lindo e admirável, agradeço o teu carinho e cuidado de sempre, mesmo distante (Saudade)! A **Gabriela**, a quem tenho muito carinho, sempre muito solícita e atenciosa, muito obrigada pelo teu carinho comigo desde a primeira vez que fui em Bauru, você merece o mundo todo de coisas boas! Aos demais amigos **Tamires, Gabriel, Patrícia, Bianca, Guilherme, Reyna, Brena, Verônica, Mariel, Mariela, Aloizio,**

agradeço de coração pelo convívio, aprendizados e experiências que tive com cada um em especial. Vocês moram no meu coração!

Aos professores do Departamento de Cirurgia, Estomatologia e Radiologia, **Izabel, Cássia, Osny, Eduardo Gonçales e Eduardo Sant'Ana** por todos os ensinamentos ao longo dessa jornada.

Aos funcionários do Centro Integrado de Pesquisa (CIP), a **Márcia**, ao **Marcelo**, e a todos os demais funcionários que contribuíram para a construção dessa pesquisa. Aos funcionários do Departamento, **Alexandre, Fernanda, Roberto, Marco, Luciana, Josieli e Andreia**, e funcionários do Centro de Pesquisa Clínica (CPC), **Anderson, Sueli, Poliana e Marcelo**, agradeço de coração toda disponibilidade.

Aos colegas da equipe do Hospital Estadual de Bauru, em especial ao **Daniel,** por toda paciência e simplicidade em passar seus ensinamentos, desde a primeira vez que fui ao HEB. O seu olhar simples, atencioso e carinhoso com os pacientes me ensinou muito.

Agradeço a todos os demais que conviveram comigo ao longo desses anos, e colaboraram no meu crescimento pessoal e profissional. Obrigada de coração!

O presente trabalho foi realizado com o apoio da **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil** (CAPES) – Código de Financiamento 001.

EPÍGRAFE

“E ainda que tivesse o dom de profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria.”

1 Coríntios 13:2

RESUMO

A biguanida de polihexametileno (PHMB) é quimicamente semelhante ao digluconato de clorexidina (CHX), ambas biguanidas, porém cadeias terminais distintas, o que proporciona diferença na atividade terapêutica e perfil toxicológico. O objetivo desta pesquisa foi avaliar e comparar o efeito antimicrobiano da solução de PHMB com a CHX sobre a viabilidade de biofilmes de microcosmos de saliva. Para a formação do inóculo, foi coletada a saliva de 4 indivíduos, e selecionadas as 3 amostras mais heterogêneas para o pool bacteriano. A saliva artificial de McBain modificada com sacarose foi utilizada como meio de crescimento. Amostras de esmalte bovino (n=180) foram preparadas para a formação do biofilme com 5 dias de crescimento, para posteriormente serem tratadas com as soluções em concentrações comerciais (PHMB 0.2% e CHX 0.12%) e não comerciais (PHMB 0.1% e CHX 0.06%). Após os tratamentos, realizou-se avaliação imediata e tardia (24h após o tratamento), sobre as Unidades Formadoras de Colônias (UFC), as concentrações de L-lactato, análise da resazurina, e a vitalidade de bactérias vivas, matriz extracelular e polissacarídeos extracelulares em microscopia confocal de varredura a laser. Os testes não-paramétricos de Kruskal-Wallis e post-hoc de Dunn foram realizados sobre os grupos ($p<0,05$). As concentrações não comerciais (CHX 0.06 e PHMB 0.1) apresentaram maior potencial antimicrobiano no momento imediato sobre as cepas de microrganismos estudados, sendo que a CHX 0.06 se sobressaiu em relação a PHMB 0.1. Para a substantividade, a concentração comercial da CHX (0.12%) apresentou maior eficácia, fato que pode justificar seu uso corriqueiro na prática clínica. Enquanto a concentração não comercial da PHMB (0.1%) apresentou maior substantividade em relação àquela disponibilizada comercialmente (PHMB 0.2). As soluções de PHMB apresentaram efeito antimicrobiano promissores no momento imediato contra os microrganismos cariogênicos, (*Estreptococos mutans* e *Lactobacilos* totais); e sobre a estrutura do biofilme de microcosmos de saliva, devido a degradação da matriz extracelular e redução dos polissacarídeos extracelulares. No entanto, o enxaguatório de CHX se sobressaiu quanto ao efeito da substantividade sobre a ecologia de biofilmes de microcosmos salivares.

Palavras-chave: Biguanida de polihexametileno. Clorexidina. Antissépticos bucais.

ABSTRACT

Evaluation of the antimicrobial effect of polyhexamethylenebiguanide (PHMB) compared with chlorhexidinedigluconate (CHX) on a saliva microcosm biofilm: In vitro study

Polyhexamethylene biguanide (PHMB) is chemically similar to chlorhexidine gluconate (CHX), both biguanides, but with distinct terminal chains, which provide a difference in therapeutic activity and toxicological profile. This research aimed to evaluate and compare the antimicrobial effect of PHMB solution with CHX on the viability of saliva microcosm biofilms. For inoculum formation, saliva from 4 individuals was collected, and the 3 most heterogeneous samples were selected for the bacterial pool. McBain's artificial saliva modified with sucrose was used as the growth. Bovine enamel samples (n=180) were prepared for biofilm formation after 5 days of growth, to be later treated with solutions in commercial (PHMB 0.2% and CHX 0.12%) and non-commercial (PHMB 0.1% and CHX 0.06%) concentrations. After the treatments, an immediate and late evaluation (24h after treatment) was carried out on the Colony Forming Units (CFU), L-lactate concentrations, resazurin assay, and the vitality of live bacteria, extracellular matrix, and polysaccharides extracellular cells in confocal laser scanning microscopy. The non-parametric Kruskal-Wallis and Dunn posthoc tests were performed on the groups ($p<0.05$). The non-commercial concentrations (CHX 0.06 and PHMB 0.1) showed greater antimicrobial potential in the immediate moment on the strains of microorganisms studied, and CHX 0.06 stood out concerning PHMB 0.1. For substantivity, the commercial concentration of CHX (0.12%) was more effective, a fact that may justify its common use in clinical practice. While the non-commercial concentration of PHMB (0.1%) was more substantial than commercially available (PHMB 0.2). The PHMB solutions showed promising antimicrobial effect immediately against cariogenic microorganisms (*Streptococci mutans* and total *Lactobacilli*); and on the biofilm structure of saliva microcosms, due to extracellular matrix degradation and reduction of extracellular polysaccharides. However, the CHX mouthwash excelled in terms of the effect of substantivity on the ecology of salivary microcosm biofilms.

Key-words: Polyhexamethylen-biguanide. Chlorhexidine. Mouthwashes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Viabilidade de lactobacilos totais (1), estreptococos do grupo mutans (2), estreptococos totais (3), microrganismos totais (4) e *Candida albicans* (5) após os diferentes tratamentos com as soluções antimicrobianas na análise imediata. Os diagramas de caixa representam os valores correspondentes às medianas, aos percentis 25 e 75 e aos limites inferiores e superiores do intervalo de confiança (95%) da contagem de UFC de cada um dos grupos. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas (P < 0.05). 46

Figura 2. Viabilidade de lactobacilos totais (1), estreptococos do grupo mutans (2), estreptococos totais (3), microrganismos totais (4) e *Candida albicans* (5) após os diferentes tratamentos com as soluções antimicrobianas na análise mediata. Os diagramas de caixa representam os valores correspondentes às medianas, aos percentis 25 e 75 e aos limites inferiores e superiores do intervalo de confiança (95%) da contagem de UFC de cada um dos grupos. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas (P < 0.05). 48

Figura 3. Viabilidade de células vivas (1), matriz extracelular (2) e polissacarídeos extracelulares (3) após os diferentes tratamentos com as soluções antimicrobianas na análise imediata. Os diagramas de caixa representam os valores correspondentes às medianas, aos percentis 25 e 75 e aos limites inferiores e superiores do intervalo de confiança (95%) da viabilidade celular de cada um dos grupos. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas (P < 0.05). 54

Figura 4. Viabilidade de células vivas (1), matriz extracelular (2) e polissacarídeos extracelulares (3) após os diferentes tratamentos com as soluções antimicrobianas na análise mediata. Os diagramas de caixa representam os valores correspondentes às medianas, aos percentis 25 e 75 e aos limites inferiores e superiores do intervalo de confiança (95%) da viabilidade celular de cada um dos grupos. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas (P < 0.05). 56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Atividade metabólica representada pelos valores de absorbância a partir da coloração com resazurina pelos diferentes grupos de tratamento na análise imediata e mediata. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas (P < 0.05). 50

Tabela 2. Atividade metabólica representada pelos valores da produção do ácido lático pelos diferentes grupos de tratamento na análise imediata e mediata. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas (P < 0.05). ... 50

Tabela 3. Viabilidade do biofilme por CSLM no biofilme inteiro, camada externa, média e interna pelos diferentes grupos de tratamento na análise imediata e mediata. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas (P<0.05). 52

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

a.C	antes de Cristo
ADS	Sistema Anti-Descoloração
AL	Ácido Lático
Al_2O_3	Óxido de alumínio
AM	Atividade Metabólica
BPW	Água Peptonada Tamponada
CaCl2	Cloreto de Cálcio
CAAE	Certificado de Apresentação de Apreciação Ética
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CHX	Digluconato de Clorexidina
CPW	Cisteina-Peptona
CSLM	Microscopia Confocal por Varredura a Laser
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EUA	Estados Unidos da América
FOB	Faculdade de Odontologia de Bauru
g	grama
GC	Grupo Controle
h	horas
ICI	Imperial Chemical Industries
IL	Interleucina
K2HPO4	Fosfato de potássio
KCl	Cloreto de Potássio
KPO4	Fosfato Monopotássico
L	Litro
ME	Matriz Extracelular
min	minuto
mL	mililitro
mm	milímetros
mmol	milimolar
mW	megawatt

Na2PO4	Sulfato de Potássio
NaCl	Cloreto de Sódio
NAD	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo e H^+
NaOCl	Hipoclorito de Sódio
nm	nanômetro
NS	Não significativo
ºC	Graus Celsius
PAVM	Pneumonia Associada à Ventilação Mecânica
PBS	Água Peptonada Tamponada
PEC	Polissacarídeos Extracelulares
pH	potencial hidrogeniônico
PHMB	Biguanida de Polihexametileno
ppm	partes por milhão
s	segundo
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UFC	Unidade Formadora de Colônia
USP	Universidade de São Paulo
µL	microlitros
µm	micrómetro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 17

2 REVISÃO DE LITERATURA 21
2.1 Biguanida de polihexametileno 21
2.2 Digluconato de clorexidina 22
2.3 Microcosmos 24
2.4 Relevância do estudo 25

3 PROPOSIÇÃO 29
3.1 Objetivo geral 29
3.2 Objetivos específicos 29

4 MATERIAL E MÉTODOS 33
4.1 Aspectos éticos 33
4.2 Caracterização do estudo e coleta da saliva 33
4.3 Riscos e benefícios 34
4.4 Soluções antimicrobianas 34
4.5 Diluição das soluções antimicrobianas 35
4.6 Preparo dos blocos de esmalte e grupos de tratamento 35
4.7 Crescimento do biofilme de microcosmos e tratamento 36
4.8 Determinação das Unidades Formadoras de Colônia (UFC) 38
4.9 Análise da resazurina 38
4.10 Análise da produção de ácido lático 39
4.11 Análise da viabilidade do biofilme por microscopia Confocal (CSLM) 40
4.12 Análise estatística 41

5 RESULTADOS 45
5.1 Determinação das Unidades Formadoras de Colônia (UFC) 45
5.1.1 Análise imediata 45
5.1.2 Análise mediata 47
5.2 Análise da resazurina 49

5.2.1 Análise imediata 49
5.2.2 Análise mediata 49
5.3 Análise da produção de ácido lático 50
5.4 Análise da viabilidade do biofilme por microscopia Confocal (CSLM) 51
5.4.1 Viabilidade do biofilme inteiro e camadas externa, média e interna 51
5.4.1.1 Análise imediata 51
5.4.1.2 Análise mediata 51
5.4.2 Viabilidade do biofilme para células vivas, mortas, matriz extracelular e polissacarídeos extracelulares 53
5.4.2.1 Análise imediata 53
5.4.2.2 Análise mediata 55

6 DISCUSSÃO 59

7 CONCLUSÃO 71

REFERÊNCIAS 75

ANEXOS 89

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A utilização de colutórios bucais é oriunda da medicina chinesa por volta de 2.700 a.C, e suas formulações surgiram a partir da época de Hipócrates (480 a.C.). Ao longo de 50 anos, pesquisas científicas sobre soluções bucais antissépticas foram realizadas, desde Slanetz e Brown (1949), prosseguindo com Stralfors (1962) (HOFFMANN et al, 2001). Em 1950, nos laboratórios da *Imperial Chemical Industries* (ICI) Ltd (Reino Unido), a polihexanida (PHMB) e clorexidina (CHX) foram sintetizadas pela primeira vez (KAEHN, 2010). Apenas no início dos anos 90, a PHMB foi introduzida na área da saúde para antissepsia local na medicina e, desde então, seu uso progrediu pela efetividade na redução da carga bacteriana e taxas de infecção de lesões crônicas (KAEHN, EBERLEIN, 2008; KAEHN, 2010).

A biguanida de polihexametileno (PHMB) é um polímero catiônico com peso molecular de 3.000 Da, interage com ácidos e moléculas aniônicas, como os fosfolipídios das membranas bacterianas (KAEHN, 2010). A PHMB e CHX apresentam estrutura química semelhante, ambas biguanidas, a CHX com 2 unidades de biguanidas e PHMB varia de 2 a 40, possuem estrutura central em comum, porém cadeias terminais distintas, o que proporciona diferença na atividade terapêutica e perfil toxicológico (ABAD-VILLAR et al., 2006; MCBAIN, 2013; AFONSO, 2013), e ambas com amplo espectro de ação (EGLI-GANY et al, 2012). O efeito antiplaca da CHX, que o torna padrão-ouro, pode ser atribuído devido sua substantividade, capacidade em se manter ativa a longo prazo após o período de aplicação (LANG, BRECX, 1986; GJERMO, 1989; CUMMINS, 1992; ADDY, MORAN, WADE, 1994; CHARLES et al., 2004), característica também presente na solução de PHMB sobre mucosa bucal (ROSIN et al., 2001, ROSIN et al., 2002) e placa bacteriana (ROSIN et al., 2002).

Ambas as soluções, possuem mecanismo de ação semelhantes, através do rompimento da integridade da membrana bacteriana, o qual proporciona mau funcionamento metabólico, extravasamento do citoplasma e, consequentemente, a morte bacteriana. A PHMB possui amplo espectro de ação, abrangendo bactérias gram-positivas, gram-negativas, fungos (*Candida albicans, Aspergillusniger, Fusariumsolani, Saccharomycescerevisiae*), leveduras, protozoário (*Acanthamoebaspp*) e contra o vírus HIV envelopado (KAEHN, 2010). Ainda, apresenta estabilidade química, estrutura altamente solúvel em água e álcoois alifáticos e pouco solúvel em lipídios, alta efetividade, custo razoável e baixa toxicidade para células de mamíferos, devido restrita interação, garante segurança quanto ao risco-benefício em relação aos outros

agentes antimicrobianos (KAEHN, 2010; LLORENS et al, 2015; AMPAWONG, ARAMWIT, 2017).

Estudos sobre a efetividade da PHMB em cavidade oral e sua capacidade inibitória de placa bacteriana são escassos (ADDY, WILLIS, MORAN, 1983; ROSIN et al., 2001, ROSIN et al., 2002; WELK et al., 2005; ROHRER et al., 2010; UZER-CELIK et al., 2016). Estudos *in vivo* (ROSIN et al. 2001; ROSIN et al. 2002) relataram maior efetividade antibacteriana do colutório bucal de PHMB 0,04% apenas em mucosa bucal, enquanto não houve diferença em superfície dentária, quando comparado ao grupo placebo (ROSIN et al., 2001). Quanto ao PHMB a 0,12% em superfície dentária, sua eficácia foi relevantemente maior em comparação a concentração de 0,04% (ROSIN et al., 2002). Ambas as concentrações foram menos efetivas do que a CHX (ROSIN et al. 2001; ROSIN et al. 2002).

A solução de PHMB 0,2%, tem demonstrado atividade antimicrobiana comparável a CHX (WELK et al., 2005; ROHRER et al., 2010; UZER-CELIK et al., 2016). Estudo *in vitro* em monoespécie relatou que a PHMB permanece ativa quando altamente diluída, em contrapartida, a CHX perde sua eficácia quando diluída para menos de 10% de sua concentração original, e ambos apresentam efeito prolongado após a aplicação (ROHRER et al., 2010). Um estudo *in vivo* (WELK et al., 2005) utilizando colutório bucal com PHMB a 0,2%, relatou menor efetividade em inibir o crescimento de placa quando comparada a CHX a 0,12%. No entanto, devido à baixa toxicidade e boa compatibilidade tecidual da PHMB em comparação com a CHX, aplicações de PHMB em concentrações ainda maiores são possíveis (WELK et al., 2005).

Devido características comparáveis a CHX e necessidade de investigação do potencial clínico e efeito sobre biofilme em estudos *in vitro* (UZER-CELIK et al., 2016*)*, inicialmente, sugere-se avaliar e caracterizar detalhadamente a solução de PHMB, em um modelo de biofilme de microcosmos de saliva, a fim de verificar sua viabilidade como uma alternativa, além da solução padrão-ouro, tendo em vista que, a partir do diagnóstico estabelecido e finalidade de tratamento, verificar-se-á o antisséptico mais indicado diante da aplicabilidade clínica. Posteriormente, este estudo pode amparar pesquisas futuras abrangendo uma microbiota específica de pacientes a âmbito hospitalar - os quais apresentam comprometimento sistêmico, possibilidade de baixo fluxo salivar e alto risco de cárie dentária – público que, corriqueiramente, faz uso desses antissépticos bucais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Biguanida de polihexametileno

A PHMB é um polímero que apresenta repetição de grupos biguanidas e ligações terminais, as quais podem ser grupos aminas, guanidinas ou ciano-guanidinas. As moléculas da cadeia principal – grupos biguanidas - que proporcionam as propriedades antibacterianas devido uma alta basicidade e dependendo da quantidade de polímeros, pois quanto maior o número de polímeros, maior será a ligação e separação dos fosfolipídios aniônicos da parede celular bacteriana (PINTO, MAILLARD, DENYER, 2010), enquanto os grupos terminais são responsáveis por sintetizar a substância (KREBS et al., 2005; FUMAROLA, 2011; ULMER et al., 2012). Quimicamente, apresenta uma estrutura anfifílica, ou seja, de caráter hidrofílica e hidrofóbica, característica importante para fornecer interação entre meios distintos (PAULA, NETO, MATTOSO, 2011).

Esta solução possui estrutura química estável, caráter catiônico, com pH entre 4 e 10, e que apresenta facilidade de ligação com superfícies com carga iônica negativa, como a parede celular bacteriana (SCHNUCH, 2007; PINTO, MAILLARD, DENYER, 2010; ELSZTEIN, DE LUCENA, DE MORAIS, 2011; PAULA, NETO, MATTOSO, 2011). O seu mecanismo de ação ocorre através do aumento na permeabilidade da membrana celular bacteriana, o qual proporciona um desequilíbrio osmótico e extravasamento de citoplasma. Além disso, relatou-se que a substância possibilita uma ligação e condensação seletiva ao DNA bacteriano interrompendo sua divisão celular, fato que pode explicar o baixo risco de resistência antimicrobiana (CHINDERA et al., 2016).

A PHMB possui um amplo espectro bacteriano, abrangendo os gram-positivos e gram-negativos, principalmente contra *Staphylococcus aureus, Enterococcus faecalis, Bacillus subtilis, Enterobacter cloacae* e *Streptococcus lactis,* além de leveduras e fungos, como *Candida albicans*. Essa solução apresenta baixa citotoxicidade e alta compatibilidade tecidual, uma vez que não ocorre interação eletrostática entre a PHMB e fosfolipídios neutros da membrana citoplasmática, desta forma, apresenta maior tolerabilidade local quando comparada ao iodo, peróxido de hidrogênio ou CHX, por exemplo, o que a considera uma substância não mutagênica e não genotóxica. Diferentemente de outras soluções, sua eficácia não é prejudicada ao contato com fluidos, tecidos, albumina ou sangue, característica importante para a prática

clínica (IKEDA et al., 1985; WERNER, 1992; EPA, 2004; DOGAN et al., 2008; GILLIVER, 2009; HÜBNER; KRAMER, 2010; YANAI et al., 2011; UZER-CELIK et al., 2016)

Estudo *in vitro* (ROHRER et al., 2010) com monoespécies de *S. mutans, S. sanguinis, C. albicans*e *F. nucleatum,* demonstrou eficácia antimicrobiana da PHMB contra *S. sanguinis,* antifúngica e controle do *F. nucleatum.* Em relação ao *S.mutans,* a CHX apresentou maior efetividade. Dentre essas espécies, *S. mutans*e *S. sanguinis* são comumente encontradas na flora bucal. *C. albicans*, patógeno oportunista, capaz de ocasionar infecções que variam de afta neonatal inofensiva a candidíase mucocutânea profunda grave ou sepse em pacientes imunocomprometidos, local ou sistêmica, ou em pacientes em uso de antibióticos. E *F. nucleatum*, importante entre os colonizadores primários e secundários da placa dentária, observado em lesões periodontais, e patógeno da pneumonia associada à ventilação mecânica (PAVM) ou outras infecções graves (ROHRER et al., 2010). Quanto ao *S. aureus*, a PHMB também apresenta efetividade sobre a descolonização dessas cepas resistentes à CHX (RENZONI et al., 2017).

A utilização da PHMB apresenta vantagens quando comparada a CHX, tais como: atividade antimicrobiana com baixa alteração em presença de matéria orgânica e variação de pH (ROWHANI, LAGALANTE, 2007; LUCAS, 2012); solução incolor e inodora (FRANZIN, 2010); ausência de coloração e gosto desagradável em cavidade bucal (ROSIN et al., 2001); ação eficaz e rápida (GAO et al., 2011); boa biocompatibilidade (GILLIVER, 2009); e estabilidade térmica e de armazenamento (FRANZIN, 2010; LUCAS et al., 2012).

2.2 Digluconato de clorexidina

A CHX é uma biguanida catiônica com amplo espectro antimicrobiano, liga-se a estrutura dental e mucosa oral, reduzindo a formação do biofilme dental, consequentemente, evitando doenças biofilme-dependentes (BASCONES et al., 2005), sendo o composto mais utilizado em cavidade oral. Possui uma importante característica denominada substantividade ou persistência de ação, o que permite a solução se manter ativa por longos períodos após sua aplicação (ADAMS, ADDY, 1994; COUSIDO et al., 2010; SAJJAN et al., 2016). Possui amplo espectro de ação, abrange bactérias anaeróbias e aeróbias, incluindo *Streptococcus mutans, Streptococcus aureus, P. gingivalis* e *Prevotella intermedia* (JONES, 2000; MALHOTRA et

al., 2011;). Especificamente sobre o *Streptococcus mutans*, a CHX atua ao inativar o piruvato de fosfonila e, assim, alterando sua atividade metabólica (SAJJAN et al., 2016).

A ação tópica da CHX em cavidade oral favorece baixa toxicidade sistêmica (MATHUR et al, 2011), no entanto, estudos questionam sobre sua total efetividade nos patógenos bucais (BONEZ et al., 2013; HARDY et al., 2018; ROODE, BUTOW, 2018), os quais sugerem resistência microbiana, possibilitando o uso de antimicrobianos, consequentemente, uma maior resistência dos patógenos também a esses fármacos (ROODE, BUTOW, 2018).

Os efeitos adversos da CHX são locais, como coloração dentária (FLÖTRA et al., 1971; LANG et al., 1982; ERIKSEN et al., 1985; LANG, BRECX, 1986; SEGRETO et al., 1986; LANG et al., 1998; JONES, 2000), comprometimento transitório da sensação gustativa (JONES, 2000; MATHUR et al, 2011; WALSH, OLIVEIRA-NETO, MOORE, 2015), descamação gengival, (HOFFMANN et al, 2001; WALSH, OLIVEIRA-NETO, MOORE, 2015), sensação de gosto amargo (MATHUR et al, 2011), raro edema de parótida, ocasionalmente, sensação de queimação e lesões descamativas dolorosas (MATHUR et al, 2011; WALSH, OLIVEIRA-NETO, MOORE, 2015). A CHX pode aumentar a formação do cálculo supragengival pela precipitação das proteínas salivares e sais inorgânicos na superfície dentária, ocasionando aumento da espessura da película. Suas limitações incluem a não seletividade bacteriana; não remoção da placa já instalada; reage com surfactantes aniônicos, como o lauril sulfato de sódio, reduzindo a atividade do agente, o que impede sua inserção em dentifrícios (KOLAHI, SOOLARI, 2006; MATHUR et al, 2011). Desta forma, o uso a longo prazo da CHX não é recomendado (SHARMA et al., 2018).

Algumas formulações da CHX foram acrescidas de metabissulfito de sódio e ácido ascórbico, a fim de tentar diminuir os seus efeitos colaterais (CORTELLINI et al., 2008), porém, essas substâncias podem competir com a molécula de CHX e inibir sua adesão as estruturas intra-orais, sendo plausível a interferência sobre a eficácia da CHX (ARWEILER et al., 2006). O Sistema Anti-Descoloração (ADS) foi criado para reduzir os efeitos negativos sem interferir na eficácia antimicrobiana, constatando boa eficácia antisséptica e redução da pigmentação dentária (BERNARDI et al., 2004), no entanto, há uma tendência de que, apesar da redução de pigmentação, apresente uma eficácia reduzida sobre a placa bacteriana e inflamação gengival (POLIZZI et al., 2020), apesar das evidências de qualidade moderada, que mostram que CHX com ADS parecem não afetar na eficácia contra a biofilme e inflamação gengival, utilizando-se do enxaguatório acompanhado com ou sem escovação dentária (VAN SWAAIJ et al., 2020).

A genotoxicidade da CHX dar-se pelo dano provocado ao DNA das células epiteliais bucais. O uso em curta duração favorece um dano transitório e reversível, devido ao mecanismo inerente de reparo do DNA. No entanto, pelas condições do sistema de defesa dos indivíduos, esse mecanismo pode estar alterado. Indivíduos com doenças genéticas (ataxia telangiectasia, xeroderma pigmentoso, anemia de Fanconi, síndrome de Bloom), diabetes mellitus, geriátricos, exposição ambiental a carcinógenos (metais pesados e compostos orgânicos) apresentam capacidade reduzida de reparo do DNA, podendo, então, apresentar alto risco carcinogênico, devendo fazer uso cauteloso dessa solução (DURBAKULA, PRABHU, JOSE, 2017).

A CHX apresentou citotoxicidade para fibroblastos gengivais humanos e células de osteossarcoma (JOHN, BECKER, SCHWARZ, 2014). Ao avaliar citotoxicidade de CHX 0.2% e 0.05%, a maior concentração apresentou maior potencial citotóxico, consequentemente, maior atividade antimicrobiana, enquanto a concentração 0.05% possui proporção favorável em preservar viabilidade de células eucarióticas e inibir crescimento bacteriano procarióticas (MÜLLER et al., 2017).

2.3 Microcosmos

A microbiota oral humana possui mais de 2.000 táxons de bactérias e fungos, incluindo patógenos oportunistas relacionados a doenças locais e sistêmicas, como alteração periodontal, doenças cardiovasculares, respiratórias, diabetes e osteoporose (KUO, POLSON, KANG, 2008). A complexidade da microbiota bucal correlacionada às dificuldades éticas encontradas em estudos *in vivo*, induziu ao desenvolvimento de modelos laboratoriais capazes de mimetizar a condição bucal *in vitro* (AZEVEDO et al., 2011; TANG et al., 2003). Os microcosmos representam um sistema laboratorial derivado de um ecossistema natural capaz de simular as condições do ambiente de estudo (WIMPENNY, 1988; FILOCHE, SOMA, SISSONS, 2007; SIGNORI et al., 2016), os quais parecem refletir a complexidade, diversidade e heterogeneidade do ambiente *in vivo*, permitindo seu estudo em condições controladas (SISSONS, 1997; WIMPENNY, 1997).

O biofilme de microcosmos permite facilmente a simulação de um ecossistema natural em um ambiente *in vitro* sob condições controladas, permitindo o monitoramento microbiano após determinados tratamentos quando combinados com técnicas e análises de última geração (FERNANDEZ-Y-MOSTAJO et al., 2017). A condição desse biofilme *in vitro* está mais

próxima da situação *in vivo*, o qual apresenta microbiota complexa quando comparada aos estudos *in vitro* com microrganismos definidos e específicos, além da facilidade de manuseio e menor dependência do participante em comparação ao biofilme cultivado *in situ* (EXTERKATE, CRIELAARD, W.; TEN CATE, 2010; RUDNEY et al., 2012;). A escolha das condições de crescimento é um fator crucial para monitoramento e análises bem-sucedidas, principalmente quando se trata de crescimento de anaeróbios exigentes (EDLUND et al., 2013; FERNANDEZ-Y-MOSTAJO et al., 2017).

A obtenção do biofilme de microcosmos pode ser realizada de diferentes sítios intraorais como saliva, raspado de língua, esfregaço de tonsila e placa subgengival, sendo elegível a região que maior favorece o desenho de cada estudo, assim como a quantidade em volume de amostras microbiológicas necessárias em um único ou vários pacientes (UZER-CELIK et al., 2016). Além disso, a escolha dos pacientes eleitos para coleta das amostras são cruciais para a cultura desse tipo de biofilme, tanto quanto a escolha do sítio de coleta, uma vez que há diferentes comunidades microbianas associadas a diferentes doenças em diferentes pacientes, favorecendo a necessidade de tratamentos distintos (BIZZARRO et al., 2016).

2.4 Relevância do estudo

A finalidade na utilização de tratamentos tópicos, o que inclui os colutórios bucais, varia de acordo com o diagnóstico bucal inicial, para que assim, sabendo-se o mecanismo e período de ação de cada substância, indique-se a aplicabilidade com base no tratamento necessário. Em função disso, deve-se atentar na escolha da solução para prevenção e/ou tratamento das patologias bucais, assim como o provável agente etiológico que se deve combater (ARDIZZONI et al. 2018).

A PHMB, como relatado em estudos anteriores, apresenta características comparáveis a CHX e pode ser utilizada como uma alternativa na escolha de enxaguatórios bucais (ROSIN et al., 2001; ROSIN et al., 2002; WELK et al. 2005; UZER-CELIK et al., 2016). Desta forma, verifica-se a necessidade de investigação desse efeito sobre biofilme em estudos *in vitro*, especificamente sobre a inibição do crescimento bacteriano e/ou inibição metabólica celular; além de sua ação na estrutura do biofilme, e dependendo da concentração da solução, varia entre ação bactericida e/ou bacteriostática (MARIN et al., 1982; CHITSAZI et al., 2008; YOUSEFIMANESH et al. 2015).

Durante a prática clínica, exemplificando-se pelo uso desses colutórios bucais previamente a cirurgias de biópsia, uma solução com ação específica e pontual é elegível, enquanto em casos de alterações periodontais severas, indica-se uma substância com alto potencial da substantividade, em que há a real necessidade de uma ação contínua dessa substância no substrato. Além disso, a utilização de enxaguatórios no pós-operatório, a fim de evitar complicações/infecções pós-cirúrgicas, prefere-se também uma solução que apresenta ação prolongada e progressiva, ou seja, maior potencial de substantividade (ARDUINO et al., 2020).

Posteriormente, os resultados deste estudo podem estimular pesquisas futuras em microbiota salivar de um grupo específico de pacientes, como aqueles com comprometimento sistêmico, nos casos em que a utilização do método mecânico de higiene bucal é impossibilitada, tendo como única alternativa o uso de colutórios bucais.

3 PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

3.1 Objetivo geral

Avaliar e comparar o efeito antimicrobiano da solução de biguanida de polihexametileno (PHMB) com o digluconato de clorexidina (CHX) sobre a viabilidade de biofilmes de microcosmos de saliva.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da solução de PHMB (0,1% e 0,2%) e CHX (0,06% e 0,12%) sobre a viabilidade de grupos específicos de microrganismos em biofilmes de microcosmo de saliva em análise imediata e mediata;
- Avaliar a atividade metabólica dos biofilmes de microcosmos por meio da solução de resazurina 0.0016% de saliva após aplicação da solução de PHMB (0,1% e 0,2%) e CHX (0,06% e 0,12%) em análise imediata e mediata;
- Analisar a produção de ácido lático após aplicação da solução de PHMB (0,1% e 0,2%) e CHX (0,06% e 0,12%) em análise imediata e mediata;
- Comparar a vitalidade de bactérias vivas presentes no biofilme intacto após o tratamento com PHMB (0,1% e 0,2%) e CHX (0,06% e 0,12%) em análise imediata e mediata.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) com Seres Humanos sob o CAAE: 24525419.4.0000.5417 (Anexo I), e pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), registro nº 032/2019 (Anexo II), da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo. Todos os indivíduos que participaram desta pesquisa receberam as informações pertinentes a pesquisa bem como seus riscos e benefícios e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo III).

4.2 Caracterização do estudo e coleta da saliva

Foi realizada uma pesquisa experimental *in vitro*. Quatro alunos da Pós-graduação em Ciências Odontológicas Aplicadas da Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB-USP), foram selecionados como voluntários para realizar a coleta de saliva. Os doadores deveriam obedecer aos seguintes critérios de inclusão: Adultos jovens com idade entre 25 e 35 anos e fluxo salivar adequado (estimulado > 1 mL/min e não estimulado > 0,3 mL/min) e ausência de lesão de cárie ativa. Os critérios de exclusão incluíam aqueles com diagnóstico de síndromes e/ou doenças sistêmicas, presença de lesão de cárie e uso de antibióticos nos últimos 90 dias (ZHENG et al., 2017).

Para a coleta da saliva, os participantes cessaram a higiene bucal por um período de 24 horas e se absteriam da ingestão de comidas e líquidos nas 2 horas antes da coleta. Em casos de dificuldade de produção de saliva, foi cedido parafina (*Parafilm*) para mascar, a fim de estimular a produção salivar. Os participantes depositaram 25 mL de saliva em tubo falcon estéril, posteriormente filtrada com lã de vidro previamente esterilizada, para a remoção de restos alimentares e de células epiteliais. Foi realizado o plaqueamento das quatro amostras de saliva nos meios Ágar Soja Triptona Sangue, Ágar Mitis Salivarius, Ágar Mitis Salivarius contendo 0,2% de bacitracina e 20% de sacarose, Ágar Rogosa com 0,13% de ácido acético glacial e Ágar Saborou. Após 24 horas, foi realizada a contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) e, selecionadas as três amostras de saliva mais heterogêneas para incluir no

pool bacteriano. As três amostras selecionadas foram diluídas em glicerol a 60% e estocada a -80°C até o momento de utilização (EXTERKATE; CRIELAARD; TEN CATE, 2010).

Previamente ao início do experimento, as três amostras salivares foram descongeladas em temperatura ambiente e, em seguida, vigorosamente agitados por 2 minutos em vórtex (40 mW, 1 pulso/s por 15 s; Vibra CellTM, Sonics and Materials Inc, Newtown, E.U.A.). Para a obtenção de um pool bacteriano, um volume de 10 mL da solução estoque de saliva/glicerol de cada amostra foi transferido para um tubo universal estéril e, em seguida, homogeneizado em vórtex.

4.3 Riscos e benefícios

A participação nesta pesquisa acarretou risco mínimo, que aconteceria caso apresentasse leve desconforto devido ao cansaço no momento da coleta. O dispositivo de parafina foi fornecido para facilitar a produção salivar e acelerar o tempo de coleta, promovendo conforto físico e psicológico ao participante. O fato de não realizar a higiene bucal por 24 horas não aumentou o risco à carie dentária ou gengivite.

A pesquisa gerou benefício com maior conhecimento científico sobre o efeito antimicrobiano das soluções em teste em biofilme de microcosmos, o que poderá gerar novas opções na prevenção de infecções bucais, assim como fomentar pesquisas clínicas sobre a ação das soluções em cavidade bucal.

4.4 Soluções antimicrobianas

As soluções antimicrobianas utilizadas foram o polihexametileno (PHMB) 0,2% e digluconato de clorexidina 0,12%, obtidos comercialmente através das empresas Walkmed Produtos Médicos Ltda. R Joao Pessoa, 60 Cj 56 - 11013-000 – Santos/SP CNPJ: 00.165.012/0001-76; e Bauru Fórmulas Farmácia de Manipulação de Fórmulas Eireli. Al Doutor Octavio Pinheiro Brisolla Quadra, 16-5, Vila Nova Cidade Universitaria - 17012-191 – Bauru/SP. CNPJ: 05.538.567/0001-30, respectivamente. O digluconato de clorexidina 0,12% foi a solução de comparação.

As soluções foram previamente filtradas (filtro 0,22mm), mantendo a cadeia asséptica, e em seguida, mantidas a 4ºC até o momento de uso.

4.5 Diluição das soluções antimicrobianas

Além das concentrações estabelecidas comercialmente, uma diluição de 1:10 também foi testada. Assim, as soluções antimicrobianas utilizadas foram PHMB a 0,1% e 0,2% e CHX a 0,06% e 0,12%. Desta forma, foi necessário realizar a macrodiluição das soluções para alcançar as concentrações de PHMB0,1% e CHX 0,06%. Com auxílio de micropipetas, cada solução foi distribuída em tubo Falcon estéril e diluídos em água destilada estéril na proporção de 1:1. Após as diluições, os tubos foram agitados no vórtex (Vortex-mix VX200, Edison, NJ, USA) por 1 minuto. Esses procedimentos foram realizados imediatamente antes da utilização.

4.6 Preparo dos blocos de esmalte e grupos de tratamento

Cento e oitenta amostras de blocos de esmalte foram obtidas a partir de noventa coroas de incisivos bovinos, previamente autorizadas pelo Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA). Os dentes bovinos possuem similaridade da composição química ao esmalte humano, considerados de primeira escolha como substitutos dos dentes humanos em estudos *in vitro*, além de fácil obtenção e manipulação (TERUEL et al., 2015; ORTIZ-RUIZ et al., 2018).

Para a confecção dos blocos de esmalte, as coroas foram fixadas em placas de acrílico (40 x 40 x 5 mm) com godiva termoativada (KerrCo., Orange, E.U.A.), visando mantê-las imóveis sobre uma superfície rígida. As coroas foram seccionadas por dois discos de diamante (Diaflex-F, Wilcos do Brasil, Petrópolis, Brasil) separados por um espaçador de aço inoxidável de 4 mm, primeiramente no sentido inciso-cervical e em seguida mesio-distal, para obtenção de um bloco de esmalte de 4 x 4 mm. As superfícies de esmalte foram seccionadas longitudinalmente por um disco de diamante (Diaflex-F, Wilcos do Brasil, Petrópolis, Brasil) e dois blocos de esmalte de 4 mm de diâmetro que foram obtidos de cada metade. As superfícies do esmalte foram sequencialmente planas com discos de carboneto de silício resfriados a água (600, 800 e 1200 granulação Al_2O_3, BuehlerLtd., Lake Bluff, EUA) polidos por 10 segundos com papel feltro molhado por spray diamantado (1 μm Buehler Ltd.). Por fim, os blocos foram

limpos em ultrassom (T7 Thornton, Unique Ltd., São Paulo, Brasil) por 20 min, e posteriormente mantidos em água estéril deionizado até o momento de uso.

As amostras de blocos de esmalte foram divididas em 10 grupos (n=9/grupo):

- Para análise imediata:

- Grupo controle em meio aquoso (GC);
- Grupo com polihexanida a 0,1% (PHMB 0,1%);
- Grupo com polihexanida a 0,2% (PHMB 0,2%);
- Grupo com digluconato de clorexidina a 0,06% (CHX 0,06%);
- Grupo com digluconato de clorexidina a 0,12% (CHX 0,12%);

Para a análise imediata, além das soluções antimicrobianas, foi utilizado também a solução neutralizadora estéril (*Tween*) composta por 3 g de lecitina, 0,34 g de K2HPO4, 30 g de polissorbato, 500 mL de demiwater (por litro, pH 7,2), a fim de remover a substantividade das soluções.

- Para análise mediata:

- Grupo controle em meio aquoso (GC);
- Grupo com polihexanida a 0,1% (PHMB 0,1%);
- Grupo com polihexanida a 0,2% (PHMB 0,2%);
- Grupo com digluconato de clorexidina a 0,06% (CHX 0,06%);
- Grupo com digluconato de clorexidina a 0,12% (CHX 0,12%);

O teste foi realizado em triplicata com duas repetições.

4.7 Crescimento do biofilme de microcosmos e tratamento

A câmara de fluxo laminar (Esco, Arstream, classe II A2, Jacari, São Paulo) foi utilizada para garantir as condições assépticas onde foram conduzidos os procedimentos microbiológicos e a manipulação das soluções.

Utilizou-se a versão modificada do modelo Active Attachment Biofilm Model Amsterdam (ACTA, Amsterdã, Holanda) (SILVA et al., 2012), o qual consiste em uma tampa

de aço com 24 parafusos de poliestireno adaptados para a fixação horizontal dos espécimes dentários. Esta tampa encaixa-se sobre as placas de 24 poços (Greiner Bio-One International, CellStar®, Alemanha), contendo os meios para crescimento e tratamento dos biofilmes. Os espécimes foram fixados com silicone de condensação leve (Zetaplus®, Zhermack, Badia Polesine, Itália). Em seguida, os modelos permaneceram em temperatura ambiente por 12 h, sendo esterilizados em autoclave a 121ºC por 15 min e, posteriormente, secos em estufa.

O inóculo bacteriano foi obtido por meio de culturas sucessivas do pool bacteriano por um período de 5 dias. O crescimento bacteriano foi obtido em fase exponencial, no período de 24 horas, em meio McBain modificado [mucina a 2,5 g.L-1, peptona a 2,0 g.L-1, peptona de caseína a 2,0 g.L-1, extrato de levedura a 1,0 g.L-1, NaCl a 0,35 g.L-1, KCl a 0,2 g.L-1 , CaCl2 a 0,2 g.L-1, hemina a 0,001 g.L-1, vitamina K1 a 0,0002 g.L-1, agente tamponador PIPES a 50 mmol.L-1, sacarose a 0,4% diluídos em água deionizada/L, pH 7,0] (MCBAIN et al., 2005)., seguido de incubação em estufa a 37 ºC. Devido a fotossensibilidade, o meio foi manipulado sem luz fria. Em tubos falcon com meio McBain, foi acrescentado 400µL do pool bacteriano e 40µL de sacarose 50%, resultando em McBain a 0,4% de sacarose, levado ao vórtex e incubado em microaerofilia por 14-16h (*overnight*). Posteriormente, foi realizada a estocagem das amostras em tubos de eppendorf acrescidas, proporcionalmente, com glicerol e armazenados a -80ºC.

Placa de 24 poços contendo amostras de esmalte (n=9 em 3 experimentos independentes) foram preenchidos com 750 µL de inóculo (saliva humana) e incubadas em 750 µL de meio McBain estéril à 37°C por 5 dias. A cada 24 horas, pela técnica de fartura e miséria, o meio foi renovado com 1500µL de McBain a 0,2% de sacarose. No 5º dia, as amostras foram lavadas com 1mL de solução cisteina-peptona (CPW), a fim de remover bactérias fracamente aderidas. As soluções antimicrobianas foram colocadas em contato direto com os biofilmes pelo tempo de 2 minutos.

As análises foram realizadas em dois momentos:

a) Análise imediata: Após a aplicação dos tratamentos, foi aplicado também a solução neutralizadora (*Tween*) durante 2 minutos (MEDVEDEC-MIKIĆ et al., 2018), a fim de remover a substantividade das soluções, posteriormente, os grupos CONTROLE, PHMB (0,1% e 0,2%) e CHX (0,06% e 0,12%) foram analisados imediatamente quanto a UFC, Ácido lático e Confocal.

b) Análise mediata: Nos grupos CONTROLE, PHMB (0,1% e 0,2%) e CHX (0,06% e 0,12%) após o tratamento, foi realizada a renovação dos meios, incubados por mais 24 horas em estufa de microaerofilia, e posteriormente foram executadas as análises de UFC, Ácido lático e Confocal.

4.8 Determinação das Unidades Formadoras de Colônia (UFC)

O biofilme de microcosmo crescido em bloco de esmalte foi inserido no tubo Falcon em 2 mL de meio BPW, incubadas em microaerofilia a 37ºC por 3 horas, posteriormente disperso por sonicação no gelo a 40 mW, 1 pulso s-1 por 1 min (Single Ultra-Sonic Cell Disruptor, Merse, Campinas, Brasil) e homogeneizados no vórtex. Em seguida, foi realizada a microdiluição seriada (10^0 a 10^{-4}) em meio CPW. Alíquotas de 25 µL de cada diluição foram inoculadas em placas de Petri (90 x 15 mm) espalhados com auxílio de alças de Drigalski nas superfícies contendo os meios Ágar Soja Triptona Sangue, Ágar Mitis Salivarius, Ágar Mitis Salivarius contendo 0,2% de bacitracina e 20% de sacarose, Ágar Rogosa com 0,13% de ácido acético glacial, ou Ágar Saborou, para determinar as contagens de microrganismos totais, estreptococos totais, estreptococos mutans, lactobacilos totais e *Candida albicans*, respectivamente. Todas as placas foram incubadas pelo período de 48h em microaerofilia a 37 ° C. Em seguida, as UFCs dos microrganismos foram devidamente contadas com auxílio de um contador de colônias.

4.9 Análise da resazurina

A solução de resazurina (*Alamar Blue*®), baseando-se na detecção de atividade metabólica (AM) de bactérias, sofre uma reação de oxido-redução, na qual altera a coloração em resposta à redução química resultante do crescimento celular, foi utilizada para avaliar a viabilidade e contaminação do biofilme. A AM inata resulta na redução da resazurina à medida que o crescimento microbiano acontece, o que ocasiona a alteração de sua forma oxidada (coloração azul não fluorescente) para a forma reduzida, a resorufina rosa (coloração rosa fluorescente), processo que ocorre na mitocôndria celular (O'BRIEN et al., 2000; BORRA et al., 2009; DE SANTANA, 2019).

Os biofilmes foram cultivados nos momentos imediatos e mediatos após o tratamento. Dez amostras de biofilme de cada grupo (imediato e mediato) foram cultivadas conforme descrito anteriormente. Após cada tratamento, as amostras foram lavadas três vezes com 1 mL de água peptonada tamponada (PBS) (10 g peptona, 5 g NaCl, 3,5 g Na2PO4, 1,5 g KPO4perlitro, pH 7,0) para remover células bacterianas não aderentes. Em seguida, as amostras foram coradas com 1 mL de solução de resazurina 0,0016% e incubadas em microaerofilia por 2 horas. Após esse período, as densidades ópticas foram medidas em espectrofotômetro (BioTekInstruments Inc., Winooski, EUA) a 608 nm. Todos os procedimentos foram repetidos para cada amostra em ambos os grupos imediatos e mediatos, obtendo-se um total de 9 leituras para cada grupo (LI et al., 2013).

4.10 Análise da produção de ácido lático

A análise da produção de ácido lático, o lactato, como indicador de AM, foi utilizado para mensurar a viabilidade bacteriana no biofilme previamente tratado (DENG et al., 2009). Após os tratamentos, cada bloco de esmalte contendo biofilme foi transferido para um tubo Falcon com 2 mL do meio BPW [20 g de água-peptona tamponada diluída em água deionizada/L, pH 7,2], acrescentado com sacarose a 0,2% e foram incubados em microaerofilia a 37ºC por 3 horas. Posteriormente, alíquotas de 200 µL do meio BPW foram coletadas de cada amostra e transferidas para microtubos, que foram mantidos a 85°C por 5 min, a fim de estabilizar a produção de ácido lático. Em seguida, os microtubos foram armazenados em freezer a -20 ° C até o momento da análise. As concentrações de L-lactato foram determinadas pelo método espectrofotométrico enzimático, baseado na conversão de L-lactato em piruvato e a conversão concomitante de NAD em NADH, com aumento do valor de absorvância de acordo com a formação de NADH (DENG et al, 2009). As leituras de absorbância foram realizadas em um espectrofotômetro (BioTekInstruments Inc., Winooski, EUA) no comprimento de onda de 340 nm. Os valores obtidos foram convertidos em concentrações de ácido lático de acordo com os parâmetros estabelecidos por uma curva padrão, com valores variando entre 0 e 3mM L-lactato.

4.11 Análise da viabilidade do biofilme por microscopia Confocal (CSLM)

Após o crescimento do biofilme, as amostras foram lavadas com solução CPW e coradas com 20 µl pela solução LIFE and DEAD (Thermo Fisher Scientific - Brasil) mantidos em condições escuras por mais 7 min. Em sequência, foram lavadas em meio CPW e coradas com 20 µl da solução de calcoflúor e mantidas em condições escurar por mais 1 min (GONZÁLEZ-MACHADO et al., 2018). Finalmente, as amostras foram novamente lavadas em água desionizada. O kit utilizado foi o LIVE/DEAD (kit BacLightBacterialViability L-7012, Molecular Probes, Eugene, OR, EUA). Os comprimentos de onda de absorção e emissão foram 480 / 500 nm para o corante SYTO 9 e 490/635 nm para o iodeto de propídio (SHEN, STOJICIC, HAAPASALO, 2010). Além desses corantes, as amostras foram acrescidas de 20uL de alexafluor, 24 horas previamente a análise no microscópio confocal, a fim de corar os polissacarídeos extracelulares (SHAN, 2012).

Em cada amostra, três campos distintos foram visualizados no microscópio confocal de varredura laser invertido (CSLM Leica TCS-SPE, Microsystems GmbH, Mannheim, Alemanha), com excitação de 488 nm, dupla detecção BP520 para LIVE/DEAD, objetiva de 40x e NA 0,65. Os campos foram determinados pelo eixo horizontal das amostras de biofilme, a partir da borda dos blocos de vidro, com distanciamento de 100 µm entre cada um deles. Para comparar as imagens, a potência e abertura do laser foram mantidas constantes. Em cada sítio selecionado, toda a extensão em profundidade foi analisada e registrada, baseando-se na espessura do biofilme. As imagens foram corrigidas e sintetizadas no software Leica LAS AF Lite (Leica, Wetzlar, Alemanha) e analisadas para determinar a vitalidade de biofilmes intactos pela razão entre os sinais verdes e a soma dos sinais verde e vermelho (ZAURA-ARITE, VANMARLE, TEN CATE, 2001).

As imagens foram apresentadas individualmente em 2-D e reconstruídas em projeções 3-D. Secções verticais (xz) de 1 µm e visão lateral das imagens reconstruídas foram utilizadas para determinar a espessura e arquitetura do biofilme. A viabilidade de células bacterianas em diferentes profundidades do biofilme foi determinada pela média da intensidade de pixels dos sinais verdes (bactérias vivas) e vermelhos (bactérias mortas) calculada pelo software Leica QWIN Image Analysis (Leica, Wetzlar, Alemanha). A fluorescência emitida pela intensidade de pixels rosas e azuis determinaram a porcentagem de ME e PEC, respectivamente, calculados pelo software (SHAN, 2012; GONZÁLEZ-MACHADO et al., 2018). A razão entre sinais

verdes e a soma dos sinais verdes e vermelhos foi calculado e determinado como porcentagem de células viáveis.

4.12 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software SPSS Statistics 21.0 (IBM® SPSS® Statistics, Nova Iorque, E.U.A.). As contagens das UFCs foram transformadas na base log10 antes da aplicação dos testes estatísticos. A hipótese de distribuição normal dos dados obtidos foi rejeitada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Os testes não-paramétricos para amostras independentes de Kruskal-Wallis e post-hoc de Dunn foram utilizados para determinar as diferenças significativas entre os grupos específicos. Valores de $P < 0.05$ foram considerados significativos.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

Após os diferentes tratamentos com as soluções antimicrobianas, todos os resultados foram obtidos em dois momentos diferentes: 1) análise imediata; e 2) análise mediata.

5.1 Determinação das Unidades Formadoras de Colônia (UFC)

A efetividade antimicrobiana foi analisada a partir da quantificação das UFCs sobre a microbiota dos lactobacilos totais, estreptococos do grupo mutans, estreptococos totais, microrganismos totais e *Candida albicans*.

5.1.1 Análise imediata

Para os lactobacilos totais, os grupos CHX 0.06 e PHMB 0.2 apresentaram diferença estatística quando comparados ao grupo controle ($P < 0.05$), observando-se que a solução de CHX 0.06 apresentou maior efetividade antimicrobiana. Os grupos de tratamento com menor e maior concentração, CHX 0.06 e PHMB 0.1, CHX 0.12 e PHMB 0.2, respectivamente, apresentaram estatística não significativa (NS) (P = NS). A solução de PHMB 0.1 mostrou-se com resultados mais estáveis, uma vez que houve a menor variância entre seus resultados.

Para os estreptococos do grupo mutans, os grupos CHX 0.06, CHX 0.12 e PHMB 0.1 apresentaram diferença estatística quando comparados ao grupo controle ($P < 0.05$), sendo que a solução de CHX 0.06 mostrou-se com maior efetividade antimicrobiana, apesar da variação em seus resultados, além desse grupo, uma grande variação nos resultados também foi observada para ambos os grupos de PHMB. Por outro lado, as soluções CHX 0.06, CHX 0.12 e PHMB 0.1 apresentaram semelhança estatística entre si, assim como observado entre os grupos CHX 0.12, PHMB 0.1 e PHMB 0.2 (P = NS). Para os estreptococos totais, microrganismos totais e *Candida albicans*, houve tendência a redução da viabilidade dessa microbiota pela solução de CHX 0.06, porém os tratamentos não apresentaram diferença estatística em relação ao grupo controle (P = NS).

A solução de CHX 0.06 destacou-se por apresentar redução da viabilidade da microbiota estudada, ou seja, maior potencial antimicrobiano quando comparado aos demais tratamentos.

Observou-se ainda, que as soluções de tratamento em concentrações menores, CHX 0.06 e PHMB 0.1, apresentaram maior efetividade antimicrobiana em relação as soluções com maior concentração, CHX 0.12 e PHMB 0.2, respectivamente. Exceto para a solução de PHMB em relação aos lactobacilos totais, em que a solução de PHMB 0.2 apresentou redução da viabilidade discretamente mais favorável do que PHMB 0.1.

Os resultados obtidos através da contagem das UFCs dos diferentes grupos na análise imediata estão descritos na figura 1.

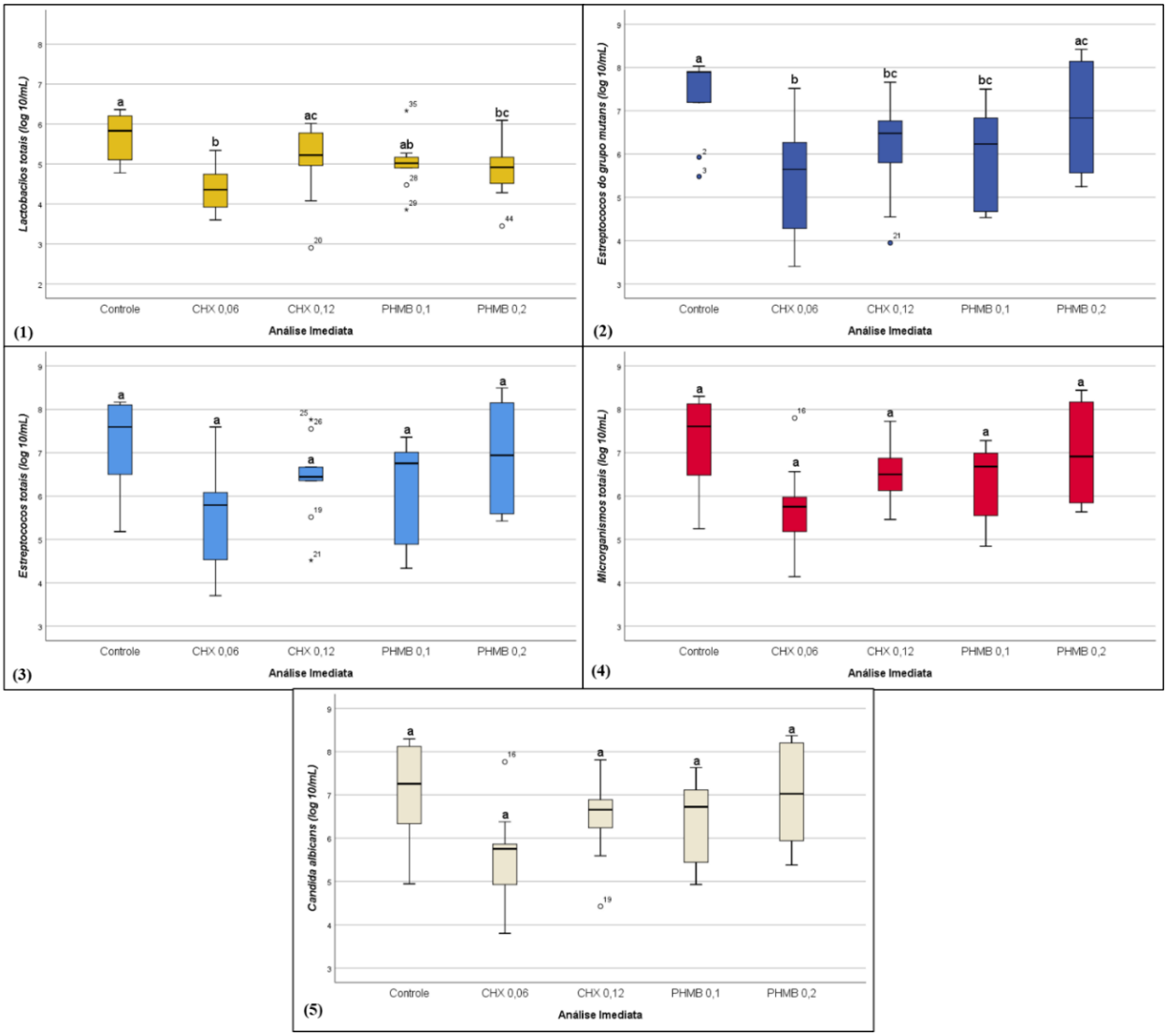

Figura 1. Viabilidade de lactobacilos totais (1), estreptococos do grupo mutans (2), estreptococos totais (3), microrganismos totais (4) e *Candida albicans* (5) após os diferentes tratamentos com as soluções antimicrobianas na análise imediata. Os diagramas de caixa representam os valores correspondentes às medianas, aos percentis 25 e 75 e aos limites inferiores e superiores do intervalo de confiança (95%) da contagem de UFC de cada um dos grupos. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas ($P < 0.05$).

5.1.2 Análise mediata

Para os lactobacilos totais, apenas os grupos CHX 0.06 e CHX 0.12 apresentaram diferença estatística em relação ao grupo controle ($P < 0.05$), mostrando-se como as soluções com maior capacidade de redução da viabilidade dessa microbiota, isto é, maior efeito da substantividade, destacando-se com menor mediana a solução de CHX 0.12, a qual também apresentou diferença estatística quando comparada as soluções de PHMB 0.1 e PHMB 0.2 ($P < 0.05$). Observou-se menor variação de resultados para as soluções de CHX 0.06, CHX 0.12 e PHMB 0.2, enquanto a solução de PHMB 0.1 apresentou maior variância em seus resultados. Os grupos de CHX apresentaram semelhança estatística entre si, o mesmo observado entre os grupos de PHMB (P = NS).

Para os estreptococos do grupo mutans, houve ampla variância de resultados nos grupos controle, CHX 0.12, PHMB 0.1 e PHMB 0.2, fato que não se observou no grupo CHX 0.06, além disso, a menor mediana foi observada no grupo controle, enquanto os demais grupos apresentaram medianas maiores, assim, houve semelhança estatística entre os grupos (P = NS). Para os estreptococos totais, os grupos CHX 0.06 e PHMB 0.1 apresentaram menor variação nos resultados e, observou-se que a solução de PHMB 0.1 apresentou tendência a redução da viabilidade dessa microbiota, porém houve discreta variação entre as medianas dos grupos e semelhança estatística (P = NS). Para os microrganismos totais, cada grupo apresentou variação em seus resultados e semelhança em relação ao valor da mediana entre os grupos, isto é, o mesmo padrão de efetividade das soluções, assim, não houve diferença estatística (P = NS). Para a *Candida albicans*, houve mínima variação nos resultados para CHX 0.06 e PHMB 0.1, além de discreta variação das medianas entre os grupos, exceto para a solução de PHMB 0.2 que se mostrou com tendência mais favorável para o efeito da substantividade dessa microbiota, porém, os grupos não apresentaram diferença estatística entre si (P = NS).

A solução de CHX 0.12 destacou-se pela redução da viabilidade apenas para os lactobacilos totais, isto é, maior substantividade, enquanto a solução de PHMB 0.2 apresentou menor substantividade. A similaridade entre os valores das medianas observadas para estreptococos do grupo mutans, estreptococos totais, microrganismos totais e *Candida albicans* representa semelhança quanto ao efeito da substantividade entre todas as soluções de tratamento, ressaltando-se a menor eficácia da solução de PHMB 0.2 para *Candida albicans*. De forma geral, nesta análise mediata, a solução de CHX 0.12 apresentou maior eficácia da

substantividade quando comparada ao CHX 0.06, enquanto a PHMB 0.1 mostrou-se mais eficaz quando comparado ao PHMB 0.2.

Os resultados obtidos através da contagem das UFCs dos diferentes grupos na análise mediata estão descritos na figura 2.

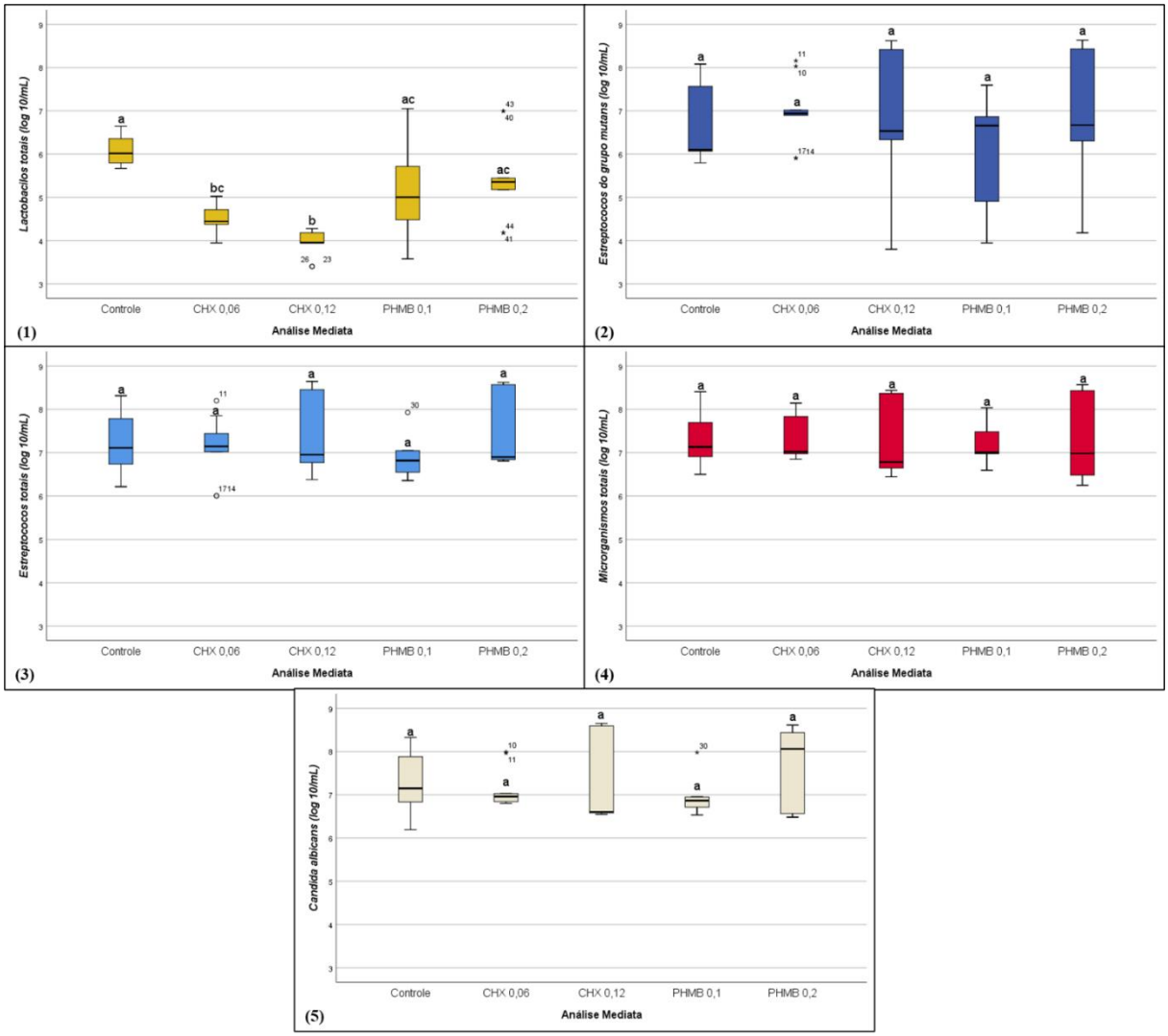

Figura 2. Viabilidade de lactobacilos totais (1), estreptococos do grupo mutans (2), estreptococos totais (3), microrganismos totais (4) e *Candida albicans* (5) após os diferentes tratamentos com as soluções antimicrobianas na análise mediata. Os diagramas de caixa representam os valores correspondentes às medianas, aos percentis 25 e 75 e aos limites inferiores e superiores do intervalo de confiança (95%) da contagem de UFC de cada um dos grupos. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas ($P < 0.05$).

5.2 Análise da resazurina

A AM do biofilme foi avaliada através dos valores de absorbância obtidos após a coloração com solução de resazurina 0,0016%.

5.2.1 Análise imediata

Na análise imediata, não foram observadas diferenças estatísticas dos valores de absorbância entre os grupos controle, CHX 0.12, PHMB 0.1 e PHMB 0.2 (P = NS). No entanto, os valores de absorbância para o grupo CHX 0.06 foram significantemente menores que os outros grupos de tratamento quando comparado ao grupo controle ($P< 0.05$), sendo a solução que apresentou maior efetividade antimicrobiana ao apresentar menor AM. O grupo PHMB 0.2 apresentou maior média da AM, quando comparado ao grupo PHMB 0.1, este se mostrou mais eficaz ao reduzir a AM, apesar dessa solução apresentar a menor concentração.

5.2.2 Análise mediata

Na análise mediata, observou-se diferença estatística nos valores de absorbância dos grupos CHX 0.06 e CHX 0.12, em que o grupo CHX 0.12 apresentou valor significativamente menor do que o grupo controle ($P < 0.05$), ou seja, a solução CHX 0.12 apresentou maior efeito da substantividade. Dentre as soluções de PHMB, a concentração 0.1 apresentou maior eficácia antimicrobiana e maior efeito da substantividade, enquanto a concentração 0.2 apresentou média da AM semelhante ao grupo controle. Apesar destes resultados, não foram observadas diferenças estatísticas dos valores de absorbância entre os grupos controle, PHMB 0.1 e PHMB 0.2 (P = NS).

De forma geral, as soluções com maior efetividade antimicrobiana foram a CHX 0.06 na análise imediata, e a CHX 0.12 na análise mediata com maior efeito da substantividade. Enquanto a solução com menor efetividade antimicrobiana foi o PHMB 0.2 na análise imediata e mediata, constatando que, dentre as duas concentrações dessa solução, o PHMB 0.1 se mostrou mais eficaz.

Os valores de absorbância dos diferentes grupos para a análise imediata e mediata estão descritos na tabela 1.

Tabela 1. Atividade metabólica representada pelos valores de absorbância a partir da coloração com resazurina pelos diferentes grupos de tratamento na análise imediata e mediata. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas (P < 0.05).

Análise imediata					**Análise mediata**				
Grupos	Média (± DP)	Mediana	IC (95%) Limite inferior	IC (95%) Limite superior	Grupos	Média (± DP)	Mediana	IC (95%) Limite inferior	IC (95%) Limite superior
Controle[a]	100±24,38	97,92	84,51	115,49	Controle[a]	100±16,07	99,6	89,79	110,2
CHX 0,06[b]	53,44±46,23	33,51	24,07	82,82	CHX 0,06[b]	50,65±67,83	26,92	7,56	93,75
CHX 0,12[ab]	74,15±31,38	78,43	54,21	94,09	CHX 0,12[b]	20,60±28,26	5,87	2,64	38,56
PHMB 0,1[ab]	79,76±23,45	81,51	64,85	94,66	PHMB 0,1[a]	89,64±37,57	81,81	65,77	113,51
PHMB 0,2[a]	88,48±26,93	81,42	71,36	105,59	PHMB 0,2[a]	95,97±51,08	87,8	63,52	128,42

5.3 Análise da produção de ácido lático

A AM do biofilme também foi avaliada através da produção de ácido lático (AL). Em ambas as análises, observou-se discreto aumento na média da concentração de AL com o aumento da concentração das soluções de tratamento, apesar disso, todos os grupos apresentaram concentração de AL similares entre si. Assim, não houve diferença estatística em relação as produções de AL entre os grupos (P = NS).

Os valores da concentração do AL em meio BPW dos diferentes grupos estão descritos na tabela 2.

Tabela 2. Atividade metabólica representada pelos valores da produção do ácido lático pelos diferentes grupos de tratamento na análise imediata e mediata. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas (P < 0.05).

Análise imediata					**Análise mediata**				
Grupos	Média (± DP)	Mediana	IC (95%) Limite inferior	IC (95%) Limite superior	Grupos	Média (± DP)	Mediana	IC (95%) Limite inferior	IC (95%) Limite superior
Controle[a]	1,36 ± 1,31	0,98	0,66	2,06	Controle[a]	2,52 ± 3,03	1,65	0,91	4,14
CHX 0,06[a]	1,20 ± 1,26	0,80	0,53	1,88	CHX 0,06[a]	1,73 ± 2,29	0,80	0,51	2,95
CHX 0,12[a]	1,39 ± 1,10	0,85	0,81	1,98	CHX 0,12[a]	2,04 ± 2,35	0,71	0,79	3,29
PHMB 0,1[a]	1,18 ± 1,36	0,70	0,45	1,91	PHMB 0,1[a]	2,19 ± 2,96	0,91	0,61	3,77
PHMB 0,2[a]	1,38 ± 1,33	0,81	0,68	2,09	PHMB 0,2[a]	2,56 ± 2,63	1,38	1,16	3,97

5.4 Análise da viabilidade do biofilme por microscopia Confocal (CSLM)

5.4.1 Viabilidade do biofilme inteiro e camadas externa, média e interna

A viabilidade do biofilme por CSLM após os tratamentos foi analisada para o biofilme inteiro e em três camadas diferentes: externa, média e interna, totalizando a análise em quatro aspectos diferentes.

5.4.1.1 Análise imediata

Observando-se o biofilme inteiro, não houve diferença estatística entre os grupos (P = NS), isto é, apresentaram o mesmo padrão antimicrobiano. Na camada externa, a solução de PHMB 0.1 apresentou tendência a redução microbiana, porém com semelhança estatística em relação ao grupo controle (P = NS). Na camada média e interna, apesar de tendência a redução de biofilme pela solução de CHX 0.06 e PHMB 0.1, respectivamente, não houve diferença estatística entre os grupos (P = NS).

5.4.1.2 Análise mediata

Os grupos de CHX apresentaram diferença estatística em relação ao grupo controle quando analisados o biofilme em sua totalidade ($P < 0.05$), ou seja, maior efeito da substantividade, observando-se menor mediana para o grupo CHX 0.12, e na camada externa, o grupo CHX 0.06 apresentou diferença estatística em relação ao grupo controle ($P < 0.05$). Na camada média e interna, ambos os grupos de CHX apresentaram diferença estatística em comparação ao grupo controle ($P < 0.05$), sendo a solução de CHX 0.12 com menor mediana. Assim, a solução que apresentou maior efeito da substantividade foi a CHX 0.12 para o biofilme inteiro e nas camadas médias e internas, enquanto a solução de CHX 0.06 na camada externa.

Os valores obtidos a partir da viabilidade do biofilme por CSLM diferentes grupos na análise imediata e medita estão descritos na tabela 3.

Tabela 3. Viabilidade do biofilme por CSLM no biofilme inteiro, camada externa, média e interna pelos diferentes grupos de tratamento na análise imediata e mediata. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas (P < 0.05).

Análise imediata						**Análise mediata**					
Grupos		Dados processados	Mediana	IC (95%)		Grupos		Dados processados	Mediana	IC (95%)	
				Limite inferior	Limite superior					Limite inferior	Limite superior
Biofilme inteiro	Controle[a]	31,74 ± 21,85	29,02	22,52	40,97	**Biofilme inteiro**	Controle[a]	32,17 ± 24,44	23,52	21,86	42,49
	CHX 0,06[a]	27,03 ± 20,08	23,52	18,55	35,51		CHX 0,06[ab]	20,50 ± 8,66	18,88	16,85	24,16
	CHX 0,12[a]	26,09 ± 24,12	18,57	15,91	36,29		CHX 0,12[b]	15,32 ± 10,40	14,06	10,93	19,71
	PHMB 0,1[a]	20,15 ± 24,19	9,05	9,94	30,37		PHMB 0,1[a]	24,65 ± 10,04	25,00	20,41	28,89
	PHMB 0,2[a]	21,21 ± 20,53	14,55	12,54	29,88		PHMB 0,2[a]	29,46 ± 18,50	24,26	21,65	37,28
Camada externa	Controle[ab]	20,04 ± 12,06	16,78	14,95	25,14	**Camada externa**	Controle[a]	30,60 ± 16,32	26,69	23,71	37,49
	CHX 0,06[ab]	19,36 ± 10,39	17,72	14,98	23,75		CHX 0,06[b]	20,95 ± 8,74	20,77	17,26	24,64
	CHX 0,12[ac]	26,84 ± 16,84	25,66	19,73	33,95		CHX 0,12[ab]	25,67 ± 14,37	23,49	19,60	31,74
	PHMB 0,1[b]	16,49 ± 16,83	12,45	9,39	23,60		PHMB 0,1[a]	30,04 ± 15,16	31,77	23,64	36,45
	PHMB 0,2[c]	40,61 ± 25,11	34,00	30,01	51,21		PHMB 0,2[a]	33,99 ± 18,46	30,80	26,20	41,78
Camada média	Controle[a]	27,03 ± 15,99	29,00	20,28	33,78	**Camada média**	Controle[a]	33,94 ± 20,94	26,01	25,10	42,79
	CHX 0,06[a]	19,74 ± 11,60	16,70	14,84	24,64		CHX 0,06[b]	22,21 ± 8,25	20,50	18,72	25,69
	CHX 0,12[a]	28,16 ± 16,57	25,35	21,16	35,15		CHX 0,12[b]	23,87 ± 16,86	16,15	16,76	30,99
	PHMB 0,1[a]	21,34 ± 16,75	14,93	14,27	28,41		PHMB 0,1[a]	30,70 ± 12,02	31,78	25,62	35,78
	PHMB 0,2[a]	22,91 ± 14,54	21,55	16,77	29,05		PHMB 0,2[a]	33,27 ± 15,40	36,97	26,77	39,77
Camada interna	Controle[a]	31,67 ± 17,76	29,42	24,17	39,17	**Camada interna**	Controle[a]	36,77 ± 19,53	34,73	28,52	45,02
	CHX 0,06[a]	21,61 ± 11,31	19,81	16,83	26,39		CHX 0,06[b]	22,60 ± 10,01	20,14	18,37	26,83
	CHX 0,12[a]	22,02 ± 17,99	16,77	14,43	29,62		CHX 0,12[c]	13,61 ± 8,60	13,57	9,98	17,25
	PHMB 0,1[a]	19,96 ± 17,75	14,73	12,46	27,45		PHMB 0,1[a]	32,44 ± 18,12	29,97	24,79	40,10
	PHMB 0,2[a]	29,36 ± 22,90	21,60	19,70	39,03		PHMB 0,2[ab]	25,17 ± 11,92	22,49	20,14	30,21

5.4.2 Viabilidade do biofilme para células vivas, mortas, matriz extracelular e polissacarídeos extracelulares

Observou-se também a viabilidade de células vivas, estrutura do biofilme pela presença de matriz extracelular (ME) e produção de metabólicos pela presença dos polissacarídeos extracelulares (PECs).

5.4.2.1 Análise imediata

Para as células vivas, ambos os grupos de PHMB apresentaram diferença estatística em relação ao grupo controle ($P < 0.05$), enquanto ambas as soluções apresentaram semelhança estatística entre si (P = NS), assim como, ao comparar os grupos CHX 0.12 e PHMB 0.2. Observou-se menor viabilidade das células vivas para o grupo de PHMB 0.1, incluindo resultados com mínima variação. Apesar da semelhança entre a mediana dos grupos, a solução de PHMB 0.1 apresentou a maior eficácia antimicrobiana, seguido da PHMB 0.2, enquanto o grupo que apresentou maior viabilidade dessas células foi o CHX 0.06.

Para a ME, os grupos de PHMB apresentaram diferença estatística quando comparados ao grupo controle ($P < 0.05$), sendo que o grupo PHMB 0.2 apresentou menor volume de ME e maior estabilidade nos seus resultados em decorrência do efeito dessa solução, ou seja, a solução de PHMB 0.2 proporcionou maior degradação da ME, seguido da solução de PHMB 0.1. Os grupos de CHX apresentaram resultados similares, porém sem diferença estatística (P = NS). Quanto a produção dos PECs, as soluções de PHMB apresentaram uma tendência a menores resultados com discreta variação em relação aos demais grupos, apesar disso, todos os grupos apresentaram o mesmo padrão para a quantidade de metabólitos, sem diferença estatística (P = NS).

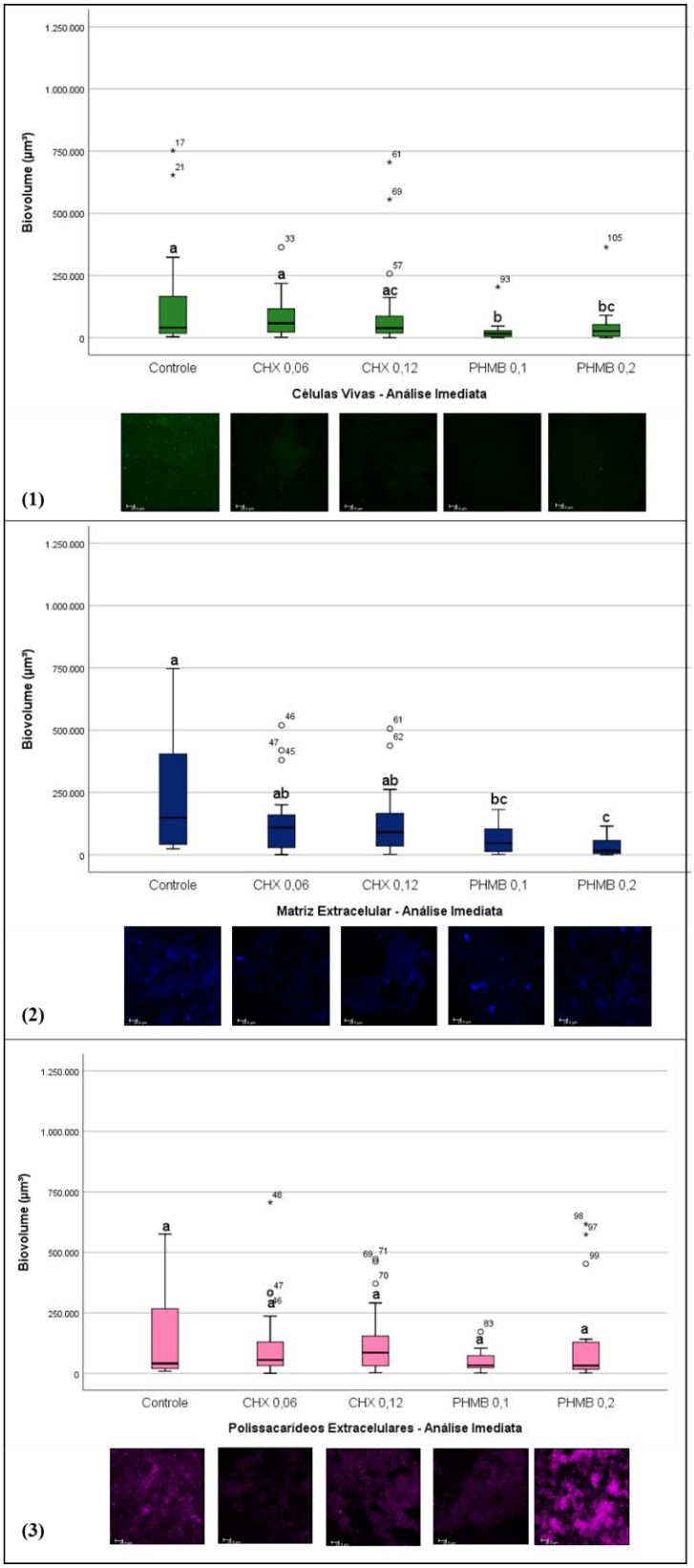

Figura 3. Viabilidade de células vivas (1), matriz extracelular (2) e polissacarídeos extracelulares (3) após os diferentes tratamentos com as soluções antimicrobianas na análise imediata. Os diagramas de caixa representam os valores correspondentes às medianas, aos percentis 25 e 75 e aos limites inferiores e superiores do intervalo de confiança (95%) da viabilidade celular de cada um dos grupos. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas ($P < 0.05$).

5.4.2.2 Análise mediata

Para o efeito da substantividade, observou-se semelhança entre a viabilidade das células vivas para os grupos controle e CHX 0.12 (P = NS), ambos com a menor mediana e resultados mais estáveis, notando-se maior substantividade da solução de CHX 0.12, porém, com mediana semelhante ao grupo controle. Enquanto os demais grupos apresentaram diferença estatística em relação ao grupo controle com medianas mais elevadas sobre a viabilidade de células vivas ($P < 0.05$).

Para a ME, os grupos de CHX 0.12 e PHMB 0.01 apresentaram tendência de redução devido menor mediana quando comparados aos demais grupos, porém não houve diferença estatística em comparação ao grupo controle, assim como os demais grupos foram semelhantes estatisticamente em relação ao grupo controle (P = NS), isto é, os grupos apresentaram semelhança quanto ao efeito da substantividade na degradação da ME. Quanto a produção dos PECs, os grupos CHX 0.06, CHX 0.12 e PHMB 0.1 apresentaram diferença estatística em relação ao grupo controle ($P < 0.05$), sendo que o grupo PHMB 0.1 apresentou menor quantidade de metabólitos em decorrência da solução apresentar maior efeito da substantividade.

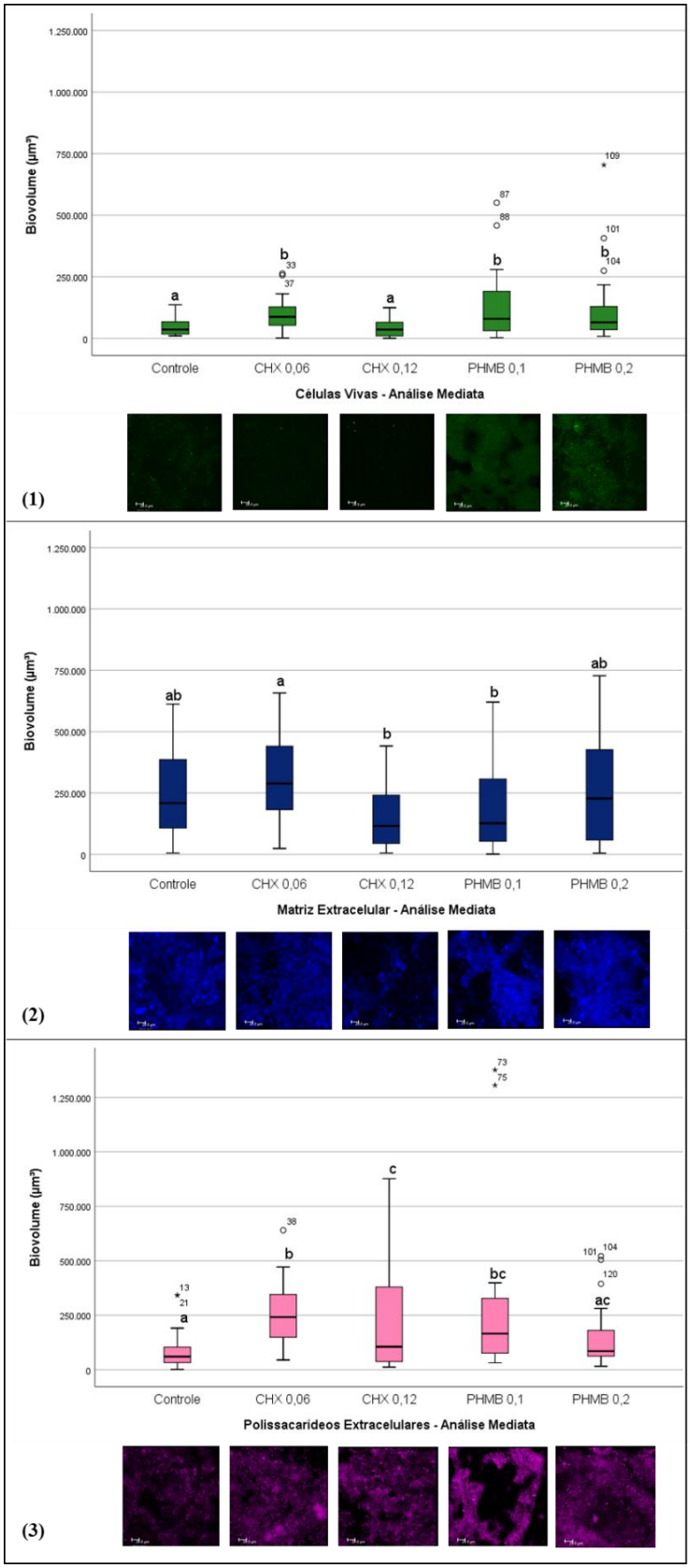

Figura 4. Viabilidade de células vivas (1), matriz extracelular (2) e polissacarídeos extracelulares (3) após os diferentes tratamentos com as soluções antimicrobianas na análise mediata. Os diagramas de caixa representam os valores correspondentes às medianas, aos percentis 25 e 75 e aos limites inferiores e superiores do intervalo de confiança (95%) da viabilidade celular de cada um dos grupos. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas ($P < 0.05$).

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Os enxaguatórios bucais de PHMB e CHX apresentaram atividade antimicrobiana sobre os microrganismos do biofilme de microcosmos de saliva, permitindo avaliar a eficácia dessas soluções em dois momentos distintos: 1) análise imediata; e 2) análise mediata. Ambas as soluções foram testadas nas concentrações comerciais (PHMB 0.2 e CHX 0.12) e não comerciais (PHMB 0.1 e CHX 0.06).

Os enxaguatórios bucais em concentrações não comerciais (CHX 0.06 e PHMB 0.1) apresentaram maior potencial antimicrobiano no momento da aplicação dessas soluções sobre as cepas de microrganismos estudados, em que a solução de CHX 0.06 se sobressaiu em relação ao PHMB 0.1. Por outro lado, quanto ao efeito da substantividade, a concentração disponível comercialmente da CHX (0.12%), destacou-se com maior eficácia, fato que pode justificar seu uso corriqueiro na prática clínica, uma vez que o pico da ação da substância não é alcançado imediatamente, mas sim no decorrer do período de 24 horas pós-aplicação. Enquanto, dentre as soluções de PHMB, a concentração não comercial – PHMB 0.1 - apresentou maior substantividade em relação àquela disponibilizada comercialmente – PHMB 0.2.

1. Atuação das soluções de PHMB e CHX em lactobacilos totais e estreptococos do grupo mutans

Dentre a microbiota estudada, os enxaguatórios bucais de PHMB e CHX apresentaram resultados relevantes em relação aos lactobacilos totais e estreptococos do grupo mutans, ambos os microrganismos responsáveis pelo início do processo cariogênico, destacando-se os estreptococos do grupo mutans como espécie primária associada a esse processo.

Ao avaliar a efetividade dos enxaguatórios bucais sobre a ação imediata, isto é, no momento de aplicação dos tratamentos, a utilização da CHX não comercial (0.06%) apresentou resultado antimicrobiano favorável contra bactérias iniciadoras da cárie dentária, como os lactobacilos totais e estreptococos do grupo mutans. Em relação a PHMB, a solução comercial (0.2%) se mostrou mais eficaz contra lactobacilos totais, por outro lado, a solução não comercial (0.1%) destacou-se contra estreptococos do grupo mutans. Ao avaliar a substantividade, a solução comercial de CHX (0.12%) se destacou contra lactobacilos totais, seguido das soluções não comerciais de CHX (0.06%) e a PHMB (0.1%), mostrando que, mesmo após 24 horas da

aplicação dos tratamentos, as soluções apresentaram alcance antimicrobiano e podem atingir um pico de ação mais amplo.

Diante desses resultados, o uso da solução de PHMB é promissor contra esses microrganismos cariogênicos, desde que analisados de forma específica quanto a sua aplicabilidade, tendo em vista que a solução comercial (0.2%) apresentou melhores resultados contra lactobacilos totais no momento da aplicação da solução, sendo que a mesma não se mostrou eficaz para a microbiota cariogênica mais predominante, os estreptococos do grupo mutans. Diferentemente de outros estudos (ROHRER et al., 2010; UZER-CELIK et al. 2016), em que a PHMB (0.2%) foi eficaz contra lactobacilos e *S. mutans,* em concentrações mais baixas ou igual a solução de CHX (0.2% e 0.12%) (UZER-CELIK et al. 2016), e comparável a CHX contra *S. mutans* e *S. sanguinis* (ROHRER et al., 2010). Em contrapartida, no presente estudo, a solução não comercial de PHMB (0.1%) se mostrou eficaz contra lactobacilos totais, apresentando maior substantividade para esse microrganismo quando comparado a CHX.

Para a solução de CHX, estudos iniciais (LUNDSTROM, KRASSE, 1987; KOHLER et al., 1982) apresentaram resultados distintos, ambos utilizando-se do gel de CHX 1.0%. A CHX foi capaz de reduzir a microbiota iniciadora da cárie dentária (KOHLER et al., 1982), por outro lado, não foi favorável sobre os lactobacilos em pacientes ortodônticos (LUNDSTROM, KRASSE, 1987). Por serem estudos iniciais, utilizando-se da formulação em gel, o qual apresenta forma de adesão ao substrato diferente do que os enxaguatórios bucais aquosos, além de concentração superior a utilizada comercialmente, possuem diferentes parâmetros de delineamento quando comparados ao presente estudo e outros mais recentes. Ao analisar o efeito da CHX (0.2% e 0.06%) contra bactérias iniciadoras da cárie dentária, constatou-se não somente a redução de bactérias patogênicas, fato que o presente estudo também constatou, mas também, sobre não danificar as bactérias concorrentes do *S. mutans* cariogênico (ARDIZZONI et al., 2018), condição que também pode proporcionar menor viabilidade desse microrganismo e favorecer adequação da homeostase saudável e natural desses microrganismos (MARSH, 2012). Ao comparar diferentes concentração da CHX, a CHX 0.12% foi mais eficaz contra *S. mutans* quando comparado a CHX 0.2% e 0.06% (JAYAPRAKASH, SHARMA, MOSES, 2010), diferentemente dos achados por Sharma et al. (2018), em que a concentração maior (CHX 0.2%) que se mostrou favorável na redução da microbiota de *S. mutans.* Diferentemente também do presente estudo, em que a CHX 0.12% se destacou sobre lactobacilos totais, enquanto o uso da solução de CHX 0.2% não foi testada.

Neste estudo, a ação imediata das concentrações não comerciais da PHMB (0.1%) e CHX (0.06%) também apresentaram efetividade antimicrobiana para demais microrganismos da cárie dentária, doença periodontal e infecção fúngica, como estreptococos totais, microrganismos totais e *Candida albicans,* no entanto, para essa microbiota não apresentaram relevância clínica. Assim como, para a ação mediata das concentrações de PHMB 0.1% e CHX 0.12% que também apresentaram efetividade antimicrobiana para demais microrganismos da cárie dentária, doença periodontal e infecção fúngica, como estreptococos do grupo mutans, estreptococos totais, microrganismos totais e *Candida albicans,* no entanto, também não apresentaram relevância clínica.

Ao comparar a efetividade da PHMB 0.2% com NaOCl 2.5% e CHX 0.2% em substrato de canal radicular, a solução de PHMB reduziu o número de células microbianas viáveis (bactérias endodônticas: *E. faecalis* e *S. epidermidis*), assim como para *Candida albicans,* porém as amostras fúngicas foram insuficientes para concluir sobre essa eficácia antimicrobiana (MEDVEDEC-MIKIĆ et al. 2018). Assim como no presente estudo, em que os resultados da ação das soluções de PHMB sobre a *Candida albicans* não apresentaram relevância clínica. Ressalta-se ainda que a aderência de hifas e células de levedura são diferentes em substrato de canal radicular, dificultando também a remoção desses microrganismos, e apesar disso, a PHMB apresentou-se como uma alternativa promissora ao NaOCl (MEDVEDEC-MIKIĆ et al. 2018).

Ainda sobre *Candida albicans,* vários estudos avaliaram a eficácia de diferentes concentrações de CHX (GIULIANA et al., 1997; MEILLER et al., 2001; FU et al., 2014; PAULONE et al., 2017; ARDIZZONI et al., 2018). As soluções de CHX 0.2%, CHX 0.06% com 250 ppm de fluoreto de sódio e enxaguatórios com moléculas de flúor apresentaram atividade antifúngica para *Candida albicans,* no entanto, este fato, além de depender de sua composição química, apresenta influência também pela morfologia e metabolismo fúngico, uma vez que o crescimento de células de levedura, formação de hifas e do biofilme fúngico, e sobrevivência de células de *Candida albicans* incorporadas no biofilme são afetados diferencialmente (PAULONE et al., 2017). Alguns estudos iniciais mostraram que enxaguatórios contendo CHX são mais eficazes contra células fúngicas planctônicas (GIULIANA et al., 1997; MEILLER et al., 2001) e sésseis (FU et al., 2014). Além disso, enxaguatórios bucais podem apresentar função relevante quanto a modulação da virulência de *Candida albicans,* devido ao fato dessas substâncias alterarem a resposta secretora das células epiteliais inflamatórias, especificamente IL-1α e IL-1β, as quais são secretadas em níveis

elevados após a infecção fúngica, e diminuem significativamente em epitélios infectados com *Candida albicans* previamente tratados com enxaguatórios (ARDIZZONI et al., 2018).

De acordo com os resultados do presente estudo, tratando-se de combater bactérias iniciadoras da cárie dentária (lactobacilos totais e estreptococos do grupo mutans), prefere-se utilizar a solução de CHX. Por outro lado, tratando-se de alteração periodontal (estreptococos totais), ambas soluções são aceitáveis; e para infecção fúngica, específico para infecção por *Candida albicans*, prefere-se utilizar a CHX, uma vez que a eficácia para a PHMB não foi favorável.

2. Influência das soluções de PHMB e CHX sobre a atividade metabólica do biofilme de microcosmos

A ação das soluções de tratamento sobre a AM do biofilme de microcosmos de saliva foi analisada através da coloração com solução de resazurina 0,0016% e a partir da produção do ácido lático. A presença de células vivas permite a redução do corante de resazurina para resorufina, processo este que não se sabe se ocorre a partir da atividade enzimática intracelular ou por meio de reação química (O'BRIEN et al., 2000), é um método simples, reprodutível, custo-efetivo, não tóxico utilizado para detectar atividade microbiana (PALOMINO et al., 2002; PETTIT et al., 2005). Em relação a produção de ácido lático, as amostras não apresentaram resultados relevantes.

Ambas as soluções apresentam mecanismo de ação semelhantes através do mau funcionamento metabólico bacteriano (KAEHN, 2010). Diante disso, a CHX não comercial (0.06%) e comercial (0.12%) apresentaram maior capacidade de provocar danos na funcionalidade metabólica das bactérias, ou seja, diminuição da AM do biofilme de microcosmos durante ação imediata e mediata em até 24h após aplicação dos tratamentos, respectivamente. Em outro estudo, a CHX também foi capaz de alterar a composição e metabolismo bacteriano, além disso, os autores ressaltaram ainda sobre a importância de pesquisar não apenas a capacidade antimicrobiana, mas também o efeito dos enxaguatórios bucais sobre a composição bacteriana e AM (FERNANDEZ-Y-MOSTAJO et al., 2017).

Sobre a PHMB, a concentração não comercial (0.1%) provocou maiores danos na funcionalidade metabólica bacteriana em ambos os momentos, imediato e mediato, consequentemente, maior capacidade antimicrobiana, porém, esses achados não se sobressaíram aos efeitos da CHX. Diante disso, ressalta-se que o critério de prescrição dos

enxaguatórios bucais depende da pontualidade da ação, tempo de uso e indicação, tendo em vista que, para obter pico de ação no momento da aplicação do enxaguatório bucal, o uso da CHX 0.06% e PHMB 0.1% são elegíveis. Por outro lado, ao necessitar de ação prolongada e progressiva, CHX 0.12% e PHMB 0.1% são indicados.

Ao analisar a AM em microrganismos específicos, em um biofilme de *S. mutans,* a CHX 0.2% foi mais eficaz do que 0.12% (CARDOSO et al., 2011), diferentemente do presente estudo que foi realizado em microcosmos de saliva. Além disso, a análise foi realizada em diferentes momentos dentro do período menor de 24 horas, fato que pode interferir nos resultados por conta da substantividade da solução, ou seja, quanto maior o intervalo de tempo pós-tratamento, maior a ação da substantividade das soluções estudadas (CARDOSO et al., 2011).

3. Efetividade das soluções de PHMB e CHX sobre diferentes camadas do biofilme de microcosmos

A estrutura do biofilme fornece proteção para as bactérias, tornando-as menos suscetíveis a agentes antimicrobianos do que suas contrapartes planctônicas (WILSON, 1996). Microrganismos localizados em camadas mais internas do biofilme apresentam maior resistência às soluções antimicrobianas, devido à escassez de espaço intercelular, matriz extracelular (DIGE, GRONKJAER, NYVAD, 2014) e baixas concentrações de oxigênio e nutrientes (ANDERSON, O'TOOLE, 2008; TARASZKIEWICZ et al., 2013;), o que proporciona a diminuição do perfil metabólico das células viáveis (MÉNDEZ, 2017). Sabendo-se que o biofilme é uma estrutura tridimensional que apresenta volume distinto em diferentes camadas, a ação dos enxaguatórios bucais foi analisada considerando o biofilme inteiro e suas camadas externa, média e interna.

A atividade antimicrobiana dos enxaguatórios testados não apresentou relevância clínica no momento imediato após a aplicação dos tratamentos sobre as diferentes camadas do biofilme. Em contrapartida, para o momento mediato, considerando a substantividade, a CHX comercial (0.12%) mostrou maior efetividade antimicrobiana no biofilme inteiro e nas camadas média e interna, desta forma, maior potencial para atingir os microrganismos considerados resistentes presentes nas camadas mais internas do biofilme. Enquanto a concentração não comercial (0.06%) apresentou-se favorável para a camada mais superficial do biofilme.

Tratando-se da PHMB, a concentração não comercial (0.1%) apresentou maior substantividade quando comparada a concentração comercial (0.2%) para o biofilme inteiro e

nas camadas externa e média, enquanto a PHMB 0.2% apresentou melhor efetividade na camada interna do biofilme. Assim como a CHX, a concentração comercial da PHMB (0.2%) também se mostrou favorável contra os microrganismos considerados resistentes da camada interna do biofilme. Ambas as soluções de PHMB 0.1% e CHX 0.12% apresentaram atividade antimicrobiana e substantividade favorável ao analisar o biofilme inteiro. Por outro lado, as solução não comerciais de PHMB (0.1%) e CHX (0.06%) apresentaram maior substantividade aos microrganismos da camada superficial do biofilme.

Em nossa busca em bases de dados não foram encontrados estudos científicos sobre a efetividade antimicrobiana dessas soluções em diferentes camadas do biofilme. No entanto, sobre a substantividade, diferentemente do presente estudo, Chandki, Nikhil e Kalyan (2020) relataram maior substantividade da PHMB 0.2% do que CHX 0.2% em substrato de dentina humana, mostrando que a PHMB pode ser uma alternativa para CHX na irrigação de canais radiculares. Em contrapartida, ao analisar diferentes concentrações da CHX como irrigante de canal radicular, a maior concentração apresentou maior substantividade (2.0%>1.0%>0.1%) (MAHENDRA et al., 2014), corroborando com o presente estudo, em que a CHX 0.12% apresentou maior substantividade do que CHX 0.06%.

A importância de inibir a formação do biofilme inicial, torna-se favorável por evitar a formação do biofilme maduro (WEI, CAMPAGNA, BOBEK, 2006), assim, a escolha de um enxaguatório bucal, ao analisar o biofilme estruturalmente, deve considerar sua característica antimicrobiana. Desta forma, a presença de um biofilme inicial, com estruturas planctônicas localizadas mais superficialmente, os enxaguatórios de PHMB e CHX em concentrações não comerciais (0.1% e 0.06%, respectivamente) são elegíveis, enquanto, para um biofilme maduro com estruturação já estabelecida e presença de camadas mais robustas, as soluções de PHMB e CHX em concentrações comerciais (0.2% e 0.12%, respectivamente) são favoráveis.

4. Efetividade das soluções de PHMB e CHX sobre a viabilidade de células vivas, matriz extracelular e polissacarídeos extracelulares

A efetividade da soluções testadas foi mensurada quantitativamente com base na viabilidade de células vivas do biofilme de microcosmos. Ambas as concentrações de PHMB proporcionaram a menor viabilidade dessas células, ou seja, maior efetividade antimicrobiana pontual no momento pós-tratamento, sobressaindo-se a solução não comercial (0.1%), seguida da comercial (PHMB 0.2%), enquanto a CHX não comercial (0.06%) se mostrou menos eficaz.

Diferentemente de outros estudos (ROSIN, et al. 2002; NASCIMENTO et al., 2008), nos quais os enxaguatórios à base de PHMB não foram tão eficazes quanto aqueles à base de CHX (ROSIN, et al. 2002; NASCIMENTO et al., 2008), sendo que a CHX 0.12% mostrou melhor desempenho na redução de bactérias intraorais (NASCIMENTO et al., 2008). A solução de PHMB (0.35%) testada por Nascimento et al. (2008), apresentava concentração acima da solução comercial (0.2%) testada no presente estudo, sendo que a PHMB 0.35% apresentou valores de diluição inibitória máxima mais baixos do que os enxaguatórios à base de CHX 0,12% (NASCIMENTO et al., 2008), o que torna a PHMB uma alternativa a CHX, uma vez que devido a toxicidade baixa e boa compatibilidade tecidual, o uso em concentrações maiores é possível (KALLENBERGER, KALLENBERGER, WILLENEGGER, 1991, KRAMER, ADRIAN, ADAM, 1993; KUHL, KRAMER, MOLL, 1994; WELK et al., 2005;).

Ao avaliar a substantividade sobre a viabilidade de células vivas, a CHX comercial (0.12%) se destacou, enquanto a concentração não comercial (0.06%) apresentou menor desempenho e maior viabilidade de células vivas. As soluções de PHMB apresentaram parâmetros de viabilidade celular mais elevados do que o grupo controle, supondo-se contaminação dessas amostras. Não foram encontrados estudos que abordassem a viabilidade de células vivas sobre a substantividade das duas soluções testadas.

A ME possui importante papel no comportamento microbiano coletivo e virulência, assim como na tolerância aos antimicrobianos (HOBLEY et al., 2015; LEBEAUX, GHIGO, BELOIN, 2014; FLEMMING et al., 2016). As propriedades estruturais e bioquímicas da matriz do biofilme podem fornecer proteção as bactérias, à medida que interferem nos mecanismos de adesão de superfície, heterogeneidades espaciais e químicas, interações sinérgicas / competitivas, fatores que podem prejudicar o alcance dos enxaguatórios bucais na estrutura do biofilme, desencadeando maior tolerância aos antimicrobianos (XIAO et al., 2012; FLEMMING et al., 2016; LIU et al., 2016). Em biofilmes associados a cárie dentária, os principais componentes da matriz são polissacarídeos, particularmente glucanos derivados de *S. mutans* (BOWEN, KOO, 2011).

A efetividade dos enxaguatórios bucais mediada quantitativamente pela ME é observada de acordo com o volume dessa ME, sendo que, a solução que proporciona a degradação da estrutura do biofilme, permite maior alcance das soluções no biofilme, torna-o menos tolerante aos antimicrobianos e, consequentemente, maior efetividade antimicrobiana (XIAO et al., 2012; FLEMMING et al., 2016; LIU et al., 2016). No momento imediato pós-tratamentos, a solução de PHMB comercial (0.2%), seguida da não comercial (0.1%), proporcionaram maior

degradação da ME, permitindo maior penetração no biofilme, a fim de exercer efetivamente sua função antimicrobiana, enquanto a solução de CHX não comercial (0.06%) se mostrou menos eficaz na degradação dessa estrutura do biofilme. Quanto a substantividade, os enxaguatórios testados não apresentaram relevância clínica sobre a degradação da ME do biofilme. Não foram encontrados estudos científicos avaliando a degradação da ME pelas soluções de PHMB e CHX.

Os PECs são metabólitos processados pelas bactérias do biofilme e sua produção depende da disponibilidade de substrato, a síntese e secreção de materiais extracelulares, cisalhamento, dentre outros (BOWEN, KOO, 2011). Interferem diretamente na adesão-coesão bacteriana, pela aderência microbiana a superfície, e adesão célula-célula, à medida que forma uma matriz polimérica que proporciona maior estabilidade mecânica do biofilme (FLEMMING et al., 2016; BOWEN et al., 2018). Desta forma, permite que as células se organizem em ecossistemas multicelulares coesos com interações que cooperam ou divergem dentro de um meio químico-físico heterogêneo, favorecendo um ambiente com diferentes potenciais patogênicos (FLEMMING et al., 2016). Apesar do biofilme da cárie dentária apresentar características acidogênicas e espécies acidúricas, os *S. mutans* são os principais produtores dos PECs, sendo esses microrganismos produtores de ácidos metabólitos, além de acumular estoques de glicogênio e sintetizar PEC, favorecendo a formação de um biofilme de difícil controle (FORSSTEN, BJÖRKLUND, OUWEHAND, 2010).

A efetividade dos enxaguatórios bucais testados não apresentaram resultados relevantes no momento imediato após a aplicação das soluções sobre os metabólitos produzidos pelo biofilme de microcosmos. Por outro lado, a PHMB não comercial (0.1%) apresentou maior substantividade sobre os PECs produzidos pelo biofilme, ou seja, proporcionando menor estabilidade mecânica do biofilme, fato que favorece maior efetividade antimicrobiana, enquanto a CHX não comercial (0.06%) se mostrou menos eficaz. É importante ressaltar que ocorre uma ligação entre os PEC e os antimicrobianos catiônicos, como clorexidina e peptídeos antimicrobianos, o que evita a penetração nas camadas mais internas do biofilme (XIAO et al., 2012; LIU et al., 2016), sendo a PHMB também classificada como um antimicrobiano catiônico.

As soluções de PHMB são alternativas quanto a aplicabilidade de enxaguatórios bucais com ações pontuais e imediatas, dependendo do foco da aplicabilidade, opta-se pela concentração comercial (0.2%) ou não comercial (0.1%). Como a solução de PHMB apresenta baixa toxicidade e boa compatibilidade tecidual, em comparação com a clorexidina

(KALLENBERGER, KALLENBERGER, WILLENEGGER, 1991; KRAMER, ADRIAN, ADAM, 1993; KUHL, KRAMER, MOLL, 1994), é possível a utilização da PHMB em concentrações ainda maiores. Parece promissor combinar a PHMB com outros agentes, a fim de testar os efeitos antimicrobianos sinérgicos (WELK et al., 2005). Sobre a substantividade, a efetividade da CHX em concentração comercial (0.12%) se sobressai, em contrapartida, sua concentração não comercial (0.06%) não se apresentou favorável em ambos os momentos, tanto para substantividade, quanto para ação pontual e imediata.

O presente estudo apresentou limitações sobre o momento de avaliação, o qual apenas dois momentos após os tratamentos com os enxaguatórios bucais testados foram mensurados, não apresentando parâmetros de comparação progressivo ao longo do período pós-tratamentos a fim de acompanhar esses resultados. Além disso, estudos *in vivo* são necessários para elucidar os achados deste estudo.

7 CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

As soluções de PHMB apresentaram efeito antimicrobiano promissores no momento pontual e imediato após o tratamento sobre microrganismos cariogênicos, os estreptococos do grupo mutans e os lactobacilos totais; e sobre a estrutura do biofilme de microcosmos de saliva, proporcionando a degradação da matriz extracelular e redução dos polissacarídeos extracelulares. No entanto, o enxaguatório de CHX se sobressaiu quanto ao efeito da substantividade sobre a ecologia de biofilmes de microcosmos salivares. Diante disso, a caracterização da ação desses enxaguatórios bucais torna-se importante para avaliar sua aplicabilidade, considerando o mecanismo e período de ação de cada substância, com base no diagnóstico prévio e finalidade de tratamento no uso dessas soluções.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ABAD-VILLAR, E.M. et al. Determination of chlorhexidine digluconate and polyhexamethylene biguanide in eye drops by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. **Anal Chim Acta.** V. 561, n. 1-2, p. 133–137, 2006.

ADAMS, D.; ADDY, M. Mouthrinses. **Adv Dent Res.** V. 8, n. 2, p. 291-301, 1994.

ADDY, M.; MORAN, J.; WADE, W. Chemical plaque control in the prevention of gingivitis and periodontitis. *In*: Lang, N. P.; Karring, T. (eds). **Proceedings of the first European Workshop on Periodontology.** Quintessence, London. 1994. p. 244–257.

ADDY, M.; WILLIS, L.; MORAN, J. Effect of tooth paste rinses compared with chlorhexidine on plaque formation during a 4-day period. **J Clin Periodontol**. V. 10, p. 89–99, 1983.

AFONSO, F. R. **PHMB como desinfectante e anti-séptico.** 2013. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas) - EM - IUEM - Ciências Farmacêuticas. 2013.

AMPAWONG, S.; ARAMWIT, P. A study of long-term stability and antimicrobial activity of chlorhexidine, polyhexamethylene biguanide, and silver nanoparticle incorporated in sericin-based wound dressing. **J Biomater Sci Polym Ed**. V. 28, n. 13, p. 1286-1302, 2017.

ANDERSON, G.G; O'TOOLE, G.A. Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms. **Curr Top Microbiol Immunol**. V. 322, p. 85-105, 2008.

ARDIZZONI, A. et al. In vitro effects of commercial mouthwashes on several virulence traits of Candida albicans, viridans streptococci and Enterococcus faecalis colonizing the oral cavity. **PloS one.** V. 13, n. 11, Article ID e0207262, 2018.

ARDUINO, P.G. et al. Effect of two different alcohol-free chlorhexidine formulations in mouthrinses on the immediate postoperative period for oral mucosal biopsies. **J Oral Sci**. V. 62, n. 2, p . 202–205, 2020.

ARWEILER, N.B. et al. Differences in efficacy of two commercial 0.2% chlorhexidine mouthrinse solutions: a 4-day plaque re-growth study. **J Clin Periodontol.** V. 33, p. 334-339, 2006.

AZEVEDO, M.S. et al. Microcosm Biofilms Originating from Children with Different Caries Experience Have Similar Cariogenicity under Successive Sucrose Challenges. **Caries Res.** V. 45, p. 510–517, 2011.

BASCONES, A. et al. Influence of additional active ingredients on the effectiveness of non-alcoholic chlorhexidine mouthwashes: a randomized controlled trial. **J Periodontol**. V. 76, n. 9, p. 1469–1475, 2005.

BERNARDI, F. et al. Chlorhexidine with an Anti Discoloration System. A comparative study. **Int J Dent Hyg**. V. 2, n. 3, p. 122-6, 2004.

BIZZARRO, S. et al. Microbial profiles at baseline and not the use of antibiotics determine the clinical outcome of the treatment of chronic periodontitis. **Sci Rep**. V. 6, p. 20205, 2016.

BONEZ, P.C. et al. Chlorhexidine activity against bacterial biofilms. **Am J Infect Control.** V. 41, p. e119-e122, 2013.

BORRA, R.C. et al. A simple method to measure cell viability in proliferation and cytotoxicity assays. **Braz Oral Res.** V. 23, n. 3, p. 255-262, 2009.

BOWEN, W.H., et al. Oral Biofilms: Pathogens, Matrix, and Polymicrobial Interactions in Microenvironments. **Trends Microbiol.** V. 26, n. 3, p. 229–242, 2018.

BOWEN, W.H.; KOO, H. Biology of Streptococcus mutans-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. **Caries Res.** V. 45, n. 1, p. 69–86, 2011.

CARDOSO, T.R. et al. Metabolic activity of Streptococcus mutans biofilms after treatment with different mouthwash formulations. **Braz J Oral Sci.** V. 10, n. 1, p. 74–78, 2011.

CHANDKI, R.; NIKHIL, V.; KALYAN, S.S. Comparative evaluation of substantivity of two biguanides - 0.2% polyhexanide and 2% chlorhexidine on human dentin. **J Conserv Dent.** V. 23, n. 1, p. 46–50, 2020.

CHARLES, C.H. et al. Comparative antiplaque and antigingivitis effectiveness of a chlorhexidine and an essential oil mouthrinse: 6-month clinical trial. **J Clin Periodontol.** V. 31, n. 10, p. 878–884, 2004.

CHINDERA, K. et al. The antimicrobial polymer phmb enters cells and selectively condenses bacterial chromosomes. **Sci. Rep.** V. 6, p. 23121, 2016.

CHITSAZI, M.; SHIRMOHAMMADI, A.; BALAYI E. Effect of herbal and chemical mouth-rinses on periodontal indices; comparison of matrica, persica and chlorhexidine. **J Dent Shiraz Univ Med Sci.** V. 8, n. 4, p. 54–60, 2008.

CORTELLINI, P. et al. Chlorhexidine with an anti discoloration system after periodontal flap surgery: a cross-over, randomized, triple-blind clinical trial. **J Clin Periodontol**. V. 35, n. 7, p. 614-20, 2008.

COUSIDO, M.C. et al. In vivo substantivity of 0.12% and 0.2% chlorhexidine mouthrinses on salivary bacteria. **Clin Oral Investig.** V. 14, p. 397-402, 2010.

CUMMINS, D. Mechanisms of actions of clinical lyprovenanti-plaqueagents**.** *In*: Embery, G.; Rolla, G. (eds). **Clinical and biological aspects of dentifrices**. Oxford United Press, Oxford. 1992. p. 205–228.

DE SANTANA, P.C. **Desenvolvimento de método colorimétrico para determinação de sulfato de neomicina empregando os conceitos de qualidade por design analítico (AQbD)**. 2019. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

DENG, D.M. et al. Novel metabolic activity indicator in Streptococcus mutans biofilms. **J Microbiol Methods**. V. 77, n. 1, p. 67–71, 2009.

DIGE, I.; GRONKJAER. L.; NYVAD, B. Molecular studies of the structural ecology of natural occlusal caries. **Caries Res.** V. 48, n. 5, p. 451-460, 2014.

DOGAN, A.A. et al. Short-term relative antibacterial effect of octenidine dihydrochloride on the oral microflora in orthodontically treated patients. **Int J Infect Dis.** V. 12, n. 6, p. 19-25, 2008.

DURBAKULA, K.; PRABHU, V.; JOSE, M. Genotoxicity of non-alcoholic mouthrinses: A micronucleus and nuclear abnormalities study with fluorescent microscopy. **J Invest Clin Dent.** Article ID e12309, 2017.

EDLUND, A. et al. An in vitro biofilm model system maintaining a highly reproducible species and metabolic diversity approaching that of the human oral microbiome. **Microbiome.** V. 1, p. 25, 2013.

EGLI-GANY, D. et al. Evaluation of the Antiseptic Efficacy and Local Tolerability of a Polihexanide-Based Antisepticon Resident Skin Flora. **Adv Skin Wound Care**.V. 25, p. 404–8, 2012.

ELSZTEIN, C.; DE LUCENA, R.M.; DE MORAIS, M.A. The resistance of the yeast Saccharomyces cerevisiae to the biocide polyhexamethylene biguanide: involvement of cell wall integrity pathway and emerging role for YAP1. **BMC Mol Biol.** V. 12, n. 1, p. 38, 2011.

Environmental protection Agency (EPA). **Reregistration Eligibility Decision (RED) for PHMB Reregistration Eligibility Decision for PHMB.** 2004.

ERIKSEN, H.M. et al. Chemical plaque control and extrinsic tooth discoloration. **J Clin Periodontol.** V. 12, p. 345–350, 1985.

EXTERKATE, R.A.; CRIELAARD, W.; TEN CATE, J.M. Different response to amine fluoride by Streptococcus mutans and polymicrobial biofilms in a novel high-through put active attachment model. **Caries Res.** V. 44, p. 372–379, 2010.

FERNANDEZ-Y-MOSTAJO, M. et al. A reproducible microcosm biofilm model of subgingival microbial communities. **J Periodont Res.** V. 52, p. 1021–1031, 2017.

FILOCHE, S.K.; SOMA, K.J.; SISSONS, C.H. Caries-related plaque microcosm biofilms developed in microplates. **Oral Microbiol Immunol.** V. 22, p. 73–79, 2007.

FLEMMING, H.C. et al. Biofilms: an emergent form of bacterial life. **Nat Rev Microbiol**. V. 14,n. 9, p. 563–75, 2016.

FLÖTRA, L. et al. Side effects of chlorhexidine mouthwashes. **Scand J Dent Res.** V. 79, p. 119–125, 1971.

FORSSTEN, S.D.; BJÖRKLUND, M.; OUWEHAND, A.C. Streptococcus mutans, Caries and Simulation Models. **Nutrients.** V. 2, p. 290–298, 2010.

FRANZIN, A.M. Biguanida Polimérica Versatilidade e Diversificação em um só Produto. **Arch Química Brasil Ltda**. p. 1–11, 2010.

FU, J. et al. In vitro antifungal effect and inhibitory activity on biofilm formation of seven comercial mouthwashes. **Oral Dis.** V. 20, p. 815-820, 2014.

FUMAROLA, S. Polyhexamethylene biguanide dressings in wound management. **Nurs Stand.** V. 25, n. 46, p. 63–67, 2011.

GAO, Y., et al. A simultaneous antimicrobial and shrink resistance treatment of wool woven fabrics using the polymeric biocide polyhexamethylene biguanide. **J Mater Sci.** V. 46, n. 9, p. 3020–3026, 2011.

GILLIVER, S. PHMB: a well-tolerated antiseptic with no reported toxic effects. **J Wound Care.** p. 10–13, 2009.

GIULIANA, G. et al. In vitro antifungal properties of mouthrinses containing antimicrobial agents. **J Periodontol.** V. 68, p. 729-733, 1997.

GJERMO, P. Chlorhexidine and related compounds. **J Dent Res.** V. 68, p. 1602–1608, 1989.

GONZÁLEZ-MACHADO, C. et al. Visualization and quantification of the cellular and extracellular components of Salmonella Agona biofilms at different stages of development. **PloS One.** V. 13, n. 7, Article ID e0200011, 2018.

HARDY, K. et al. Increased Usage of Antiseptics Is Associated with Reduced Susceptibility in Clinical Isolates of Staphylococcus aureus. **mBio.** V. 9, n. 3, Article ID e00894-18, 2018.

HOBLEY, L. et al. Giving structure to the biofilm matrix: an overview of individual strategies and emerging common themes. **FEMS Microbiol Rev.** V. 39, n. 5, p. 649–69, 2015.

HOFFMANN, T. et al. Clinical controlled study on plaque and gingivitis reduction under long-term use of low-dose chlorhexidine solutions in a population exhibiting good oral hygiene. **Clin Oral Invest.** V. 5, p. 89-95, 2001.

HÜBNER N-O; KRAMER, A. Review on the Efficacy, Safety and Clinical Applications of Polihexanide, a Modern Wound Antiseptic. **Skin Pharmacol Physiol.** V. 23, n. 1, p.17-27, 2010.

IKEDA, T. et al. Spectroscopic studies on the interaction of polymeric in-chain biguanide biocide with phospholipid membranes as probed by 8-anilinonaphthalenel-sulfonate. **Bull Chem Soc Jpn.** V. 58, p. 705–709, 1985.

JAYAPRAKASH, R.; SHARMA, A.; MOSES, J. Comparative evaluation of the efficacy of diferent concentrations of chlorhexidine mouth rinses in reducing the mutants streptococci in saliva: an in vivo study. **J Indian Soc Pedo Prev Dent.** V. 28, n. 3, p. 162–166, 2010.

JOHN, G.; BECKER, J.; SCHWARZ, F. Effects of taurolidine and chlorhexidine on SaOS-2 cells and human gingival fibroblasts grown on implant surfaces. **Int J Oral Maxillofac Implants.** V. 29, n. 3, p. 728–734, 2014.

JONES, C.G. Chlorhexidine: is it still the gold standard? **Periodontol.** V. 15, p. 55-62, 2000.

KAEHN, K. Polihexanide: A Safe and Highly Effective Biocide. **Skin Pharmacol Physiol.** V. 23, n. 1, p. 7–16, 2010.

KAEHN, K.; EBERLEIN, T. Polyhexanide (PHMB) and betaine in wound care management. **EWMA J.** V. 8, p. 13-17, 2008.

KALLENBERGER, A.; KALLENBERGER, C.; WILLENEGGER, H. Experimental investigations on tissue compatibilty of antiseptics. **Hyg Medizin.** V. 16, p. 383–395, 1991.

KOHLER, B. et al. Effect of caries pre¬ventive measures on Streptococcus mutans and lactobacilli in selected mothers. **Scand J Dent Res.** V. 90, n. 2, p. 102–8, 1982.

KOLAHI, J.; SOOLARI, A. Rinsing with chlorhexidine gluconate solution after brushing and flossing teeth: A systematic review of effectiveness. **Quintessence Int.** V. 37, p. 605–612, 2006.

KRAMER, A.; ADRIAN, V.; ADAM, C. Comparison of the toxicity of Lavasept and selected antiseptic agents. **Hyg Medizin.** V. 18, p. 9–16, 1993.

KREBS, F.C., et al. Polybiguanides, particularly polyethylene hexamethylene biguanide, have activity against human immunodeficiency virus type 1. **Biomed Pharmacother.** V. 59, n. 8, p. 438–45, 2005.

KUHL, H.; KRAMER, A.; MOLL, E. Alternative toxicity testing of polihexanide and povidone-iodine in the cress test. **Hyg Medizin.** V. 19, p. 190–197, 1994.

KUO, L.-C.; POLSON, A.M.; KANG, T. Associations between periodontal diseases and systemic diseases: A review of the inter-relationships and interactions with diabetes, respiratory diseases, cardiovascular diseases and osteoporosis. **Public Health.** V. 122, p. 417–433, 2008.

LANG, N.P. et al. Effects of supervised chlorhexidine mouthrinses in children. A longitudinal clinical trial. **J Periodontal Res**. V. 17, p. 101–111, 1982.

LANG, N.P. et al. Plaque formation and gingivitis after supervised mouthrinsing with 0.2% delmopinol hydrochloride, 0.2% chlorhexidine digluconate and placebo for 6 months. **Oral Dis.** V. 4, p. 105–113, 1998.

LANG, N.P.; BRECX, M.C. Chlorhexidine digiuconate - an agent for chemicai plaque control and prevention of gingival inflammation. **J Periodontal Res**. V. 21, s16, p. 74-89, 1986.

LEBEAUX, D.; GHIGO, J.M.; BELOIN, C. Biofilm-related infections: bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics. **Microbiol Mol Biol Rev**. V. 78, n. 3 p. 510–43, 2014.

LI, X. et al. Diversity of Streptococcus mutans strains in bacterial interspecies interactions. **J Basic Microbiol**. V. 53, p. 1-7, 2013.

LIU, Y. et al**.** Topical delivery of low-cost protein drug candidates made in chloroplasts for biofilm disruption and uptake by oral epithelial cells. **Biomaterials.** V. 105, p.156–66, 2016.

LLORENS, E. et al. Polybiguanide (PHMB) loaded in PLA scaffolds displaying high hydrophobic, biocompatibility and antibacterial properties. **Mater Sci Eng C.** V. 50, p. 74–84, 2015.

LUCAS, A.D. Environmental fate of polyhexamethylene biguanide. **Bull Environ Contam Toxicol.** V. 88, n. 3, p. 322–5, 2012.

LUNDSTROM, F.; KRASSE, B. Streptococcus mutans and lactobacilli frequency in orthodontic patients; the effect of chlorhexidine treatments. **Eur J Orthod.** V. 9, n. 2, p. 109–16, 1987.

MAHENDRA, A. et al. Comparative evaluation of antimicrobial substantivity ofdifferent concentrations of chlorhexidine as a root canal irrigant: An in vitro study. **J Oral Biol Craniofac Res.** V. 4, p. 181-5, 2014.

MALHOTRA, N. et al. Comparative in vitro evaluation of efficacy of mouthrinses against Streptococcus mutans, Lactobacilli and Candida albicans. **Oral Health Prev Dent.** V. 9, p. 261-68, 2011.

MARIN, V. et al. Bactericidal and bacteriostatic action of mouthwashes used in oral hygiene. **Minerva Stomatol.** V. 31, n. 5, p. 583–90, 1982.

MARSH, P.D. Contemporary perspective on plaque control. **Br Dent J.** V. 212, n. 12, p. 601–606, 2012.

MATHUR, S. et al. Chlorhexidine: The Gold Standard in Chemical Plaque Control. **Natl J Physiol Pharm Pharmacol.** V. 1, n. 2, p. 45-50, 2011.

MCBAIN, A.J. et al., Development and characterization of a simple perfused oral microcosm, **J. Appl. Microbiol**. V. 98, n. 3, p. 624-634, 2005.

MCBAIN, A.J. The role of biofilms in wound management: composition, recalcitrance and in vitro modelling. **Int J Antimicrob Agents**. V. 42, S21, 2013.

MEDVEDEC-MIKIĆ, I. et al. Antimicrobial effectiveness of polyhexamethylene biguanide on Enterococcus faecalis, Staphylococcus epidermidis and Candida albicans. **Med Glas (Zenica).** V. 15, n. 2, p. 132–138, 2018.

MEILLER, T.F. et al. In vitro studies of the efficacy of antimicrobials against fungi. Oral **Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** V. 91, p. 663-670, 2001.

MÉNDEZ, D.A.C. **Efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana sobre grupos específicos de microrganismos provenientes de microcosmos de lesões de cárie em dentina.** Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

MÜLLER, H.D. et al. Cytotoxicity and Antimicrobial Activity of Oral Rinses In Vitro. **Biomed Res Int**. Article ID 4019723, 2017.

NASCIMENTO, A.P., et al. Maximum inhibitory dilution of mouthwashes containing chlorhexidine and polyhexamethylene biguanide against salivary Staphylococcus aureus. **J Appl Oral Sci.** V. 16, n. 5, p. 336–339, 2008.

O'BRIEN, J. et al. Investigation of the alamar blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **Eur J Biochem.** V. 267, p. 5421-5426, 2000.

ORTIZ-RUIZ, A.J. et al. Structural differences in enamel and dentin in human, bovine, porcine, and ovine teeth. **Ann Anat.** V. 218, p. 7-17, 2018.

PALOMINO J.C. et al. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. **Antimicrob Agents Chemother,** V. 46, p. 2720-2722, 2002.

PAULA, G.F.; NETTO, G.I.; MATTOSO, L.H.C. Physical and Chemical Characterization of Poly (hexamethylene biguanide) Hydrochloride. **Polymers.** V. 3, n. 4, p. 928–941, 2011.

PAULONE, S., et al. Candida albicans survival, growth and biofilm formation are differently affected by mouthwashes: an in vitro study. **New Microbiol**. V. 40, n. 1, p. 45–52, 2017.

PETTIT R.K., et al. Microplate alamar blue assay for Staphylococcus epidermidis biofilm susceptibility testing. **Antimicrob Agents Chemother.** V. 49, p. 2612-2617, 2005.

PINTO, F.; MAILLARD, J.-Y.; DENYER, S. P. Effect of surfactants, temperature, and sonication on the virucidal activity of polyhexamethylene biguanide against the bacteriophage MS2. **Am J Infect Control.** V. 38, n. 5, p. 393–8, 2010.

POLIZZI, E., et al. Antibacterial properties and side effects of chlorhexidine-based mouthwashes. A prospective, randomized clinical study. **J Osseointegr.** V. 12, n. 1, p. 2-7, 2020.

RENZONI, A. et al. Impact of exposure of methicillin-resistant Staphylococcus aureus to polyhexanide in vitro and in vivo. **Antimicrob Agents Chemother.** V. 61, Article ID e00272-17, 2017.

ROHRER, N. et al. Antimicrobial efficacy of 3 oral antiseptics containing octenidine, polyhexamethylene biguanide, or Citroxx: can chlorhexidine be replaced? I**nfect Control Hosp Epidemiol.** V. 31, n. 7, p. 733-9, 2010.

ROODE, G.J.; BUTOW, K.W. A Descriptive Study of Chlorhexidine as a Disinfectantin Cleft Palate Surgery. **Clin Med Res.** V. 1, n. 1-2, p. 9-15, 2018.

ROSIN, M. et al. Effect of a polyhexamethylene biguanide mouth rinse on bacterial counts and plaque. **J Clin Periodontol**. V. 28, p. 1121–1126, 2001.

ROSIN, M. et al. The effect of a polyhexamethylene biguanide mouthrinse compared to an essential oil rinse and a chlorhexidine rinse on bacterial counts and 4-day plaque regrowth. **J Clin Periodontol.** V. 29, n. 5, p. 392–399, 2002.

ROWHANI, T.; LAGALANTE, A.F. A colorimetric assay for the determination of polyhexamethylene biguanide in pool and spa water using nickel-nioxime. **Talanta.** V. 71, n. 2, p. 964–70, 2007.

RUDNEY, J.D. et al. A reproducible oral microcosm biofilm model for testing dental materials. **J Appl Microbiol.** V. 113, p. 1540–1553, 2012.

SAJJAN, P. et al. Chlorhexidine as an antimicrobial agent in dentistry – a review. **OHDM.** V. 15, n. 2, p. 93–100, 2016.

SCHNUCH, A. et al. The biocide polyhexamethylene biguanide remains an uncommon contact allergen. **Multicenter Study.** V. 4, p. 235–239, 2007.

SEGRETO, V.A. et al. A comparison of mouth rinses containing two concentrations of chlorhexidine. **J Periodontal Res.** V. 21, n. 16, p. 23–3, 1986.

SHARMA, A., et al. To compare the effectiveness of different mouthrinses on Streptococcus mutans count in caries active children. **J Oral Biol Craniofac Res**. V. 8, n. 2, p. 113–117, 2018.

SHAN, L. AlexaFluor 700–Labeled regioselectively addressable functionalized template-[cyclo-(Arg-Gly-Asp-d-Phe-Lys)]4. 2012 Jul 17 [updated 2012 Aug 29]. *In*: **Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD)** [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2004–2013.

SHEN, Y.; STOJICIC, S.; HAAPASALO, M. Bacterial Viability in Starved and Revitalized Biofilms: Comparison of Viability Staining and Direct Culture. **J Endod**. V. 36, p. 1820–1823, 2010.

SIGNORI, C. et al. Influence of the Inoculum Source on the Cariogenicity of in vitro Microcosm Biofilms. **Caries Res.** V. 50, p. 97–103, 2016.

SILVA, T.C. et al. Application of an active attachment model as a high-throughput demineralization biofilm model. **J Dent.** V. 40, n. 1, p. 41-47, 2012.

SILVA, T.C. et al. Diverse outcomes of Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy on five Enterococcus faecalis strains. **Photodiagnosis Photodyn Ther.** V. 11, n. 3, p. 283–289, 2014.

SISSONS, C.H. Artificial dental plaque biofilm model systems. **Adv Dent Res**. V. 11, p. 110–126, 1997.

TANG, G. et al. Artificial mouth model systems and their contribution to caries research: a review. **J Dent.**V. 31, p. 161–171, 2003.

TARASZKIEWICZ, A. et al., Innovative strategies to overcome biofilm resistance. **Biomed Res Int.** , n. 5, Article ID 150653, 2013.

TERUEL, J.D. et al. Comparison of chemical composition of enamel and dentine in human, bovine, porcine and ovine teeth. **Arch Oral Biol.** V. 60, p. 768-775, 2015.

ULMER, M., et al. In vivo investigation of the efficiency of a nanoparticle-emulsion containing polihexanide on the human skin. **Eur J Pharm Biopharm**. V, 84, n. 2, p. 325–9, 2013.

UZER-CELIK, E., et al. Antimicrobial activity of different disinfectants against cariogenic microorganisms. **Braz Oral Res.**V. 30, n. 1, p. e125, 2016.

VAN SWAAIJ, B. et al. Does chlorhexidine mouthwash, with an anti-discoloration system, reduce tooth surface discoloration without losing its efficacy? A systematic review and meta-analysis. **Int J Dent Hyg.** V. 18, n. 1, p. 27–43, 2020.

WALSH, T.; OLIVEIRA-NETO, J.M.; MOORE, D. Chlorhexidine treatment for the prevention of dental caries in children and adolescents. **Cochrane Database Syst Rev**. V. 13, n. 4, Article ID CD008457, 2015.

WEI, G.X.; CAMPAGNA, A.N.; BOBEK, L.A. Effect of MUC7 peptides on the growth of bacteria and on Streptococcus mutans biofilm. **J Antimicrob Chemother**. V. 57, p. 1100-1109, 2006.

WELK, A., et al. The effectof a polyhexamethylene biguanide mouth rinse compared with a triclosan rinse and a chlorhexidine rinse on bacterial counts and 4-day plaque re-growth. **J Clin Periodontol**. V. 32, p. 499–505, 2005.

WERNER, H.-P. Microbicidal effectiveness of selected antiseptics. **Hyg Medizin.** V. 17, p. 51–59, 1992.

WILSON, M. Susceptibility of oral bacterial biofilms to antimicrobial agents. **J Med Microbiol.** V. 44, p. 79–87, 1996.

WIMPENNY, J.W.T. Introduction, models and microcosms. *In* BOCA RATON, F.L. **Handbook of laboratory model systems for microbial ecosystems.** CRC Press Inc. 1988. p. 1–17.

WIMPENNY, J.W.T. The validity of models. **Adv Dent Res.** V. 11, p. 150–159, 1997.

XIAO, J. et al. The exopolysaccharide matrix modulates the interaction between 3D architecture and virulence of a mixed-species oral biofilm. **PLoS Pathog.** V. 8, n.4, Article ID e1002623, 2012.

YANAI, R. et al. Effects of ionic and surfactant agents on the antimicrobial activity of polyhexamethylene biguanide. **Eye Contact Lens**. V. 37, p.85-9, 2011.

YOUSEFIMANESH, H. et al. Comparison of the Antibacterial Properties of Three Mouthwashes Containing Chlorhexidine Against Oral Microbial Plaques: An in vitro Study. **Jundishapur J Microbiol**. V. 8, n. 2, e17341, 2015.

ZAURA-ARITE, E.; VANMARLE, J.; TEN CATE, J.M. Confocal microscopy study of undisturbed and chlorhexidine-treated dental biofilm. **J Dent Res**. V. 80, n. 5, p. 1436–1440, 2001.

ZHENG, X. et al. Ecological Effect of Arginine on Oral Microbiota. **Sci Rep.** V. 7, p. 7206, 2017.

ANEXOS

ANEXO I – Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos

USP - FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU DA USP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação do efeito antimicrobiano da biguanida de polihexametileno (PHMB) comparada com digluconato de clorexidina (CHX) sobre um biofilme de microcosmos de saliva

Pesquisador: PAULO SÉRGIO DA SILVA SANTOS

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 24525419.4.0000.5417

Instituição Proponente: Universidade de Sao Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.769.245

Apresentação do Projeto:

Diversos enxaguatórios bucais têm sido estudado, dentre eles, a clorexidina (CHX) foi estabelecida como padrão-ouro, apesar dos seus efeitos adversos locais. Como alternativa, a biguanida de polihemetileno (PHMB) a 0,2% tem demonstrado capacidade antimicrobiana comparável a CHX em estudos in vivo e in vitro em modelo de biofilme monoespécie. No entanto, esse efeito antimicrobiano da PHMB a 0,2% em um modelo de biofilme de microcosmos de saliva, nunca foi estudado. Portanto, o objetivo desta pesquisa será analisar e comparar o efeito de diferentes concentrações da solução antimicrobiana de PHMB com a CHX sobre biofilme de microcosmos. Para a formação do inóculo, será coletada a saliva de 3 indivíduos saudáveis, que após filtrada serão utilizadas para preparar um POOL microbiológico e misturada com glicerol a 60% para estocagem. Posteriormente, a saliva artificial de McBain modificada com sacarose será utilizada como meio de crescimento do inóculo para formação do biofilme. Amostras (4 mm x 4 mm) de esmalte bovino (n=90) serão preparadas para a formação do biofilme microcosmo com 5 dias de crescimento, para posteriormente ser tratado com as concentrações de PHMB a 0,2% e 0,1%, e CHX a0,12% e 0,06% (controle positivo) e água destilada (controle negativo). Os valores de pH dos

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9
Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA **CEP:** 17.012-901
UF: SP **Município:** BAURU
Telefone: (14)3235-8356 **Fax:** (14)3235-8356 **E-mail:** cep@fob.usp.br

meios serão mensurados, prévia e tardiamente à aplicação das soluções antimicrobianas. Após o tratamento, a avaliação será imediata e tardia (24h após o tratamento) quanto ao perfil do biofilme(Unidades Formadoras de Colônias), as concentrações de L-lactato determinadas pelo método espectrofotométrico enzimático e as bactérias vivas e mortas em biofilme intacto serão evidenciadas por microscopia confocal de varredura a laser. Os dados serão submetidos à análise estatística apropriada (teste paramétrico ou não paramétrico, $p<0,05$).

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar e comparar o efeito antimicrobiano da solução de polihexidina (PHMB) com à do digluconato de clorexidina (CHX) sobre a viabilidade de biofilme de microcosmos formado sobre dente bovino.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos e benefícios foram revisados apropriadamente.

Riscos:

A participação nesta pesquisa acarretará em risco mínimo, que acontecerá caso apresente leve desconforto devido ao cansaço no momento da coleta. O dispositivo de parafina irá facilitar produção salivar e acelerar o tempo de coleta, promovendo conforto físico e psicológico ao participante. O fato de não realizar a higiene bucal por 24 horas não aumentará o risco à carie dentária ou gengivite. Toda saliva que não for utilizada será descartada no lixo contaminado do laboratório.

Benefícios:

A pesquisa gerará benefício com maior conhecimento científico sobre o efeito antimicrobiano das soluções em teste em biofilme de microcosmos, o que poderá gerar novas opções na prevenção de infecções bucais, assim como fomentar pesquisas clínicas sobre a ação das soluções em cavidade bucal.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

não há nenhum impedimento ético na realização da pesquisa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de aquiescência do CIP, de anuência da CPG assim como a carta de encaminhamento do Departamento foram corretamente preparados e anexados à PB. O nome do professor responsável foi adicionado aos documentos requisitados (termo de compromisso e TCLE). Os riscos da pesquisa foram revisados.

USP - FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU DA USP

Continuação do Parecer: 3.769.245

Recomendações:

Nenhuma

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Nenhuma

Considerações Finais a critério do CEP:

Esse projeto foi considerado APROVADO na reunião ordinária do CEP de 13/11/2019, com base nas normas éticas da Resolução CNS 466/12. Ao término da pesquisa o CEP-FOB/USP exige a apresentação de relatório final. Os relatórios parciais deverão estar de acordo com o cronograma e/ou parecer emitido pelo CEP. Alterações na metodologia, título, inclusão ou exclusão de autores, cronograma e quaisquer outras mudanças que sejam significativas deverão ser previamente comunicadas a este CEP sob risco de não aprovação do relatório final. Quando da apresentação deste, deverão ser incluídos todos os TCLEs e/ou termos de doação assinados e rubricados, se pertinentes.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1448857.pdf	28/11/2019 17:18:20		Aceito
Outros	CartaRespostaParecer.pdf	28/11/2019 17:17:14	CAROLINE GOMES CARVALHO	Aceito
Outros	AposParecerTermoAnuenciaComissaoPG.pdf	28/11/2019 16:54:08	CAROLINE GOMES CARVALHO	Aceito
Outros	AposParecerCartaEncaminhamentoDeptO.pdf	28/11/2019 16:49:30	CAROLINE GOMES CARVALHO	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	AposParecerTermoAquiescenciaCIP.pdf	28/11/2019 16:45:19	CAROLINE GOMES CARVALHO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	AposParecerProjetoPesquisa.pdf	28/11/2019 16:33:07	CAROLINE GOMES CARVALHO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	AposParecerDeclaracaoCompromissoPesq.pdf	28/11/2019 16:30:33	CAROLINE GOMES CARVALHO	Aceito
Cronograma	AposParecerCRONOGRAMA.pdf	28/11/2019 16:27:20	CAROLINE GOMES CARVALHO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	AposParecerTCLE.pdf	28/11/2019 16:25:49	CAROLINE GOMES CARVALHO	Aceito

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9
Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA **CEP:** 17.012-901
UF: SP **Município:** BAURU
Telefone: (14)3235-8356 **Fax:** (14)3235-8356 **E-mail:** cep@fob.usp.br

USP - FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU DA USP

Continuação do Parecer: 3.769.245

Outros	Checklist_Caroline.pdf	23/10/2019 17:28:07	CAROLINE GOMES CARVALHO	Aceito
Folha de Rosto	Folha_rosto_Caroline.pdf	23/10/2019 17:26:40	CAROLINE GOMES CARVALHO	Aceito
Outros	DOCUMENTO_CEUA.pdf	15/10/2019 16:16:18	CAROLINE GOMES CARVALHO	Aceito
Orçamento	ORCAMENTO.pdf	08/10/2019 10:17:04	CAROLINE GOMES CARVALHO	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

BAURU, 13 de Dezembro de 2019

Assinado por:
Ana Lúcia Pompéia Fraga de Almeida
(Coordenador(a))

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9
Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA **CEP:** 17.012-901
UF: SP **Município:** BAURU
Telefone: (14)3235-8356 **Fax:** (14)3235-8356 **E-mail:** cep@fob.usp.br

ANEXO II – Comissão de Ética no Uso de Animais

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru

Comissão de Ética no Uso de Animais

Uso exclusivo da CEUA/FOB/USP
Reg. Nº **023/2019**
Recebido em: **15/10/2019**
Maristela Petenuci Ferrari
Secretária da CEUA – SRTE 53052

PROTOCOLO DE RECEBIMENTO DO FORMULÁRIO PARA REGISTRO DE PROTOCOLOS EFETUADOS COM CADÁVERES, OU PARTE DELES, EM ENSINO E/OU PESQUISA

Finalidade: Pesquisa

Período: Dez/2019 a Mar/2021

Título da pesquisa: Avaliação do efeito antimicrobiano da biguanida de polihexametileno (PHMB) comparada com digluconato de clorexidina (CHX) sobre um biofilme de microcosmos de saliva: Estudo in vitro

Pesquisador Responsável: Profa. Dr. Paulo Sérgio da Silva Filho

Pesquisador Executor: Caroline Gomes Carvalho

Colaboradores: Prof. Dr. Thiado Cruvinel da Silva, Daniela Alejandra Cusicanqui Méndez

Nota Fiscal/Termo de Doação Dental Brasil Produtos Odontológicos Eireli - NF-e Nº 000.028.734 Série 001 (15 dentes) / NF-e Nº 000.029.081 Série 001 (10 dentes) / NF-e Nº 000.000.012 Série 1 (20 dentes)

Total adquirido: (15 + 10 + 20) 45

Nº Lote / Data do Abate NF-e Nº 000.028.734 Série 001 - lotes nºs 01, 02, 03, 04 e 05 / abate em: 15/04/2019 / NF-e Nº 000.029.081 Série 001 - lotes nº 01, 02, 03, 04 e 05 / abate em: 15/04/2019 / NF-e Nº 000.000.012 Série 1 - lotes 01, 02, 03 e 04 / abate em: 19/08/2019

Nº utilizados / Nº de grupos: 45 / 10 grupos (9 blocos de esmalte)

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-101 – C.P. 73
e-mail: ceepa@fob.usp.br – Fone/FAX (0xx14) 3235-8356
http://www.fob.usp.br

Anexo III - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru

Departamento de Cirurgia, Estomatologia,
Patologia e Radiologia

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Caro aluno(a) da Pós-graduação em Ciências Odontológicas Aplicadas da Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB-USP), através deste termo, convido-lhe a participar do projeto de pesquisa intitulado "Avaliação do efeito antimicrobiano da biguanida de polihexametileno (PHMB) comparada com digluconato de clorexidina (CHX) sobre um biofilme de microcosmos de saliva: Estudo *in vitro*". Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, caso aceite o convite, assine no final do documento, que está escrito em duas vias, sendo uma via sua e a outra via do pesquisador responsável. Você poderá se recusar a participar da pesquisa ou retirar seu Consentimento Livre e Esclarecido em qualquer fase da pesquisa, sem nenhum prejuízo para o(a) senhor(a).

A pesquisa tem o objetivo de avaliar o efeito de diferentes soluções antimicrobianas sobre a viabilidade de um biofilme com bactérias o qual será conduzido no laboratório do Centro Integrado de Pesquisa da FOB-USP. Esta pesquisa será realizada por mim (Caroline Gomes Carvalho) e Prof. Paulo Sérgio da Silva Santos (FOB-USP). É importante destacar que de acordo com o item IV.6.b da resolução 466/12 você terá garantida a liberdade do consentimento para a participação ou não na pesquisa, sem qualquer represália. Portanto, garantimos que não será coagido e nem sofrerá restrições de suas atividades usuais.

Para essa pesquisa, será necessária a coleta de saliva. O período de coleta será no turno matutino, em data a ser agendada. Você será orientado a não escovar os dentes, nem fazer uso de nenhum tipo de bochecho com flúor ou agente antiplaca por um período de 24h anteriores à coleta, sendo que 2h antes da coleta, você não poderá fazer a ingestão de nenhum tipo de alimento. E então será coletada a saliva, de forma que você irá expectorar 25 mL em um recipiente plástico no prazo máximo de 30 minutos. A saliva coletada será guardada em um frasco de plástico, transportado em gelo e estocado em um congelador. Todo o procedimento deve demorar aproximadamente 20 minutos. Em seguida, você receberá uma escova e um dentifrício para realizar a higiene bucal orientada pelos pesquisadores. No laboratório, os micróbios da sua saliva serão colocados sobre dentes de boi, com a intenção de estudarmos a eficácia de soluções antimicrobianas em microrganismos. Todo o material coletado que não for utilizado será descartado no lixo contaminado do laboratório.

A participação nesta pesquisa acarretará em risco mínimo, que acontecerá no caso de você apresentar desconforto devido ao cansaço durante a coleta e sensação de falta de limpeza nos dentes pelo curto período em que não fará higiene oral. Os riscos serão minimizados pela mastigação de parafina para facilitar produção e acelerar a coleta de saliva, e assim promover conforto físico e psicológico para você. Destaca-se ainda que o fato de ficar 24h sem escovar os dentes também não aumenta o risco à cárie dentária ou gengivite, e que ao final da coleta será fornecido material para sua higiene oral. Toda saliva coletada que não for utilizada será descartada no lixo contaminado do laboratório.

Os benefícios para você estão relacionados ao diagnóstico da presença e quantidade de micróbios dentro da sua cavidade bucal, acompanhamento das condições de saúde bucal e orientação da técnica correta de escovação, baseado na qualidade e quantidade de microrganismos encontrados. A coleta da saliva será auxiliada por mim.

Os gastos gerados por este estudo ficarão a cargo do pesquisador responsável pelo projeto. Ressalta-se que não está sendo considerado nenhum pagamento ou recompensa material pela sua participação nesse estudo. Você terá garantido o direito à indenização compensatória caso fique comprovado que a sua participação acarretou algum problema. Se você for convocado a vir à FOB/USP exclusivamente para a realização da pesquisa, você terá direito a custeio do custo de

Rubrica do Pesquisador Responsável:

Rubrica do Participante da Pesquisa:

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
e-mail: **luciana@fob.usp.br** – Fone/FAX (0xx14) 3235-8258
http://www.fob.usp.br

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru

Departamento de Cirurgia, Estomatologia,
Patologia e Radiologia

transporte. Você não precisará passar por nenhum outro tipo de procedimento adicional. Irá ser utilizado apenas saliva. Sua participação é totalmente voluntária, deixando claro a não obrigatoriedade quanto a doação do material.

A pesquisa gerará benefício com maior conhecimento científico sobre o efeito antimicrobianos das soluções em teste em um meio que apresenta maior proximidade com a cavidade bucal, o que poderá gerar novas opções na prevenção de infecções bucais, assim como fomentar pesquisas clínicas sobre o assunto.

Você poderá se recusar a assinar este termo para a não participação na pesquisa e mesmo após assinar este termo, caso mude de idéia e queira retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, poderá fazê-lo sem nenhuma represália. Toda a pesquisa será realizada com sua identificação completamente preservada. O direito à indenização lhe será permitido, caso ocorra algum dano decorrente da sua participação nesta pesquisa. Caso necessite de ajuda financeira para participar desta pesquisa (no caso, transporte da sua residência à FOB e vice-versa, para a coleta de saliva) ela poderá ser ressarcida pelo pesquisador.

Qualquer dúvida ou maiores esclarecimentos você poderá recorrer a qualquer um dos membros da equipe do projeto (Departamento de Cirurgia, Estomatologia, Patologia e Radiologia - 14 3235-8258) ou o pesquisador responsável Paulo Sérgio da Silva Santos (e-mail paulosss@fob.usp.br). Caso possua preocupações quanto aos seus direitos como participante deste estudo, ou queira fazer denúncias e/ou reclamações quanto à condução do mesmo, sinta-se a vontade para procurar *o Comitê de Ética em Pesquisa, da Faculdade de Odontologia de Bauru/USP, Alameda Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75, telefone (14)3235-8356 ou e-mail:* cep@fob.usp.br e a forma de contato com CONEP – Endereço: Esplanada dos Ministérios, Bloco G, Anexo B. Sala 104B, telefone: (61) 3315-5878, e-mail: cns@saude.gov.br.

Rubrica do Pesquisador Responsável:

Rubrica do Participante da Pesquisa:

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
e-mail: **luciana@fob.usp.br** – Fone/FAX (0xx14) 3235-8258
http://www.fob.usp.br

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru

Departamento de Cirurgia, Estomatologia,
Patologia e Radiologia

Pelo presente instrumento que atende às exigências legais, o Sr. (a) _____, portador da cédula de identidade _____, após leitura minuciosa das informações constantes neste TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO, devidamente explicada pelos profissionais em seus mínimos detalhes, ciente dos serviços e procedimentos aos quais será submetido, não restando quaisquer dúvidas a respeito do lido e explicado, DECLARA e FIRMA seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO concordando em participar da pesquisa proposta. Fica claro que o participante da pesquisa, pode a qualquer momento retirar seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO e deixar de participar desta pesquisa e ciente de que todas as informações prestadas tornar-se-ão confidenciais e guardadas por força de sigilo profissional (Cap. III, Art. 9º do Código de Ética Odontológica (Res. CFO-118/2012).

Por fim, como pesquisador(a) responsável pela pesquisa, DECLARO o cumprimento do disposto na Resolução CNS nº 466 de 2012, contidos nos itens IV.3 e IV.5.a e na íntegra com a resolução CNS nº 466 de dezembro de 2012.

Por estarmos de acordo com o presente termo o firmamos em duas vias igualmente válidas (uma via para o participante da pesquisa e outra para o pesquisador) que serão rubricadas em todas as suas páginas e assinadas ao seu término, conforme o disposto pela Resolução CNS nº 466 de 2012, itens IV.3.f e IV.5.d.

Bauru, SP, _____ de _____ de _____.

_____	_____
Assinatura do Participante da Pesquisa	Prof. Paulo Sérgio da Silva Santos Responsável Principal

O **Comitê de Ética em Pesquisa – CEP**, organizado e criado pela **FOB-USP**, em 29/06/98 (**Portaria GD/0698/FOB**), previsto no item VII da Resolução CNS nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde (publicada no DOU de 13/06/2013), é um Colegiado interdisciplinar e independente, de relevância pública, de caráter consultivo, deliberativo e educativo, criado para defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos.

Qualquer denúncia e/ou reclamação sobre sua participação na pesquisa poderá ser reportada a este CEP:

Horário e local de funcionamento:
Comitê de Ética em Pesquisa
Faculdade de Odontologia de Bauru-USP - Prédio da Pós-Graduação (bloco E - pavimento superior), de segunda à sexta-feira (em dias úteis), no horário das **14hs às 17h30**.
Alameda Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75
Vila Universitária – Bauru – SP – CEP 17012-901
Telefone/FAX(14)3235-8356
e-mail: cep@fob.usp.br