

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

DAYANNE SIMÕES FERREIRA SANTOS

**Análise *in vitro* da resposta bacteriana frente  
à enxagatários bucais**

BAURU  
2020



DAYANNE SIMÕES FERREIRA SANTOS

**Análise *in vitro* da resposta bacteriana frente  
à enxaguatórios bucais**

Dissertação apresentada a 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 Biologia Oral, Estomatologia, Radiologia e Imaginologia.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Sérgio da Silva Santos

Coorientadora: Profa. Dra. Flaviana Bombarda de Andrade

**Versão Corrigida**

BAURU

2020

Santos, Dayanne Simões Ferreira

Análise *in vitro* da resposta bacteriana frente à enxaguatórios bucais / Dayanne Simões Ferreira Santos -- Bauru, 2020.

80 p. : il. ; 31 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, 2020.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Sérgio da Silva Santos

**Nota:** A versão original desta dissertação encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP.

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

Assinatura:

Data:

## FOLHA DE APROVAÇÃO



---

---

## DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação a mim, que me empenhei com todo amor e dedicação para aprender o que a Universidade e a vida me ofereceram nesses dois últimos anos.

E a todos os que, de alguma forma, contribuíram para esta conquista.

---

---





---

---

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pela vida maravilhosa e cheia de aprendizados que tenho.

Aos meus pais **Azael José dos Santos** e **Maria Madalena Simões Ferreira dos Santos**, que me deram o dom da vida e me criaram com todo carinho e cuidado que puderam dar. Sempre apoiaram as minhas escolhas e se orgulham delas, tudo isso é graças à vocês. A minha querida e única irmã **Suellen Simões Ferreira Santos**, a quem admiro e me espelho por ser mulher guerreira e vencedora. Família, as palavras nunca serão suficientes para expressar a minha gratidão. Vocês são sagrados pra mim. Foi por todo seu apoio que cheguei até aqui e é com esse mesmo apoio que seguirei em frente, sempre.

A minha sobrinha amada **Luísa Simões Osse**, que com tanta doçura e beleza me encanta e me faz transbordar de amor a cada dia.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Paulo Sérgio da Silva Santos**, pessoa extraordinária, me faltam palavras para admirar e agradecer-lo. Me lembro das orações que fiz rogando pela oportunidade de fazer este mestrado e de ser orientada pelo senhor, minhas preces foram atendidas. Obrigada por acreditar em mim! Na grande maioria das vezes, quando conhecemos alguém prestigiado em alguma área, acabamos por nos decepcionar, pois a expectativa diante daquela pessoa é grande. Eu posso afirmar com toda certeza que não foi o que ocorreu com o senhor, a cada dia que passa eu fico surpresa com o quanto o senhor é íntegro. Palavra que eu nem tinha dimensão do significado. Com o senhor, pude ver que dá pra ser íntegro nas coisas mais corriqueiras. Pude perceber que nenhuma profissão é melhor que a outra, se você está feliz sendo eletricista, advogado, faxineiro, ministro, professor ou doula, você está sendo fiel a si mesmo. Consolidar o que meus pais me ensinaram que, apesar de estarmos no Brasil, não é motivo pra conseguir um lugar na fila com um conhecido. Aprendi que tratar as pessoas com cordialidade não quer dizer mostrar os dentes pra todo mundo, o meu sorriso é valioso e isso também é ser fiel a mim mesma. Aprendi a não me conformar com os “nãos”, sempre há uma alternativa, é só ir atrás. Aprendi a confiar mais em mim mesma, ainda que os outros não confiem. Aprendi a ouvir muito mais do que o paciente está falando. Que, muitas vezes, é um pedido de ajuda, um pedido de um olhar mais atencioso. O senhor é humano, com todos os

---

---



---

---

significados que essa palavra representa, fico embasbacada com a capacidade que o senhor tem de aprender e mudar de estratégia frente aos resultados que não saíram de acordo com o esperado e com a genialidade com que o senhor lê os seres humanos. Já disse ao senhor que eu o convenceria de que é um gênio até eu acabar o mestrado, creio que sua humildade não deixa, o importante é que eu não desisti (risos). O seu dom de decodificar as informações não verbais que as pessoas emitem faz com que o senhor enxergue além do que quase todos nós enxergamos e eu preciso dizer que esse presente de Deus está sendo muito bem usado pra fazer diferença na vida de todos os pacientes e alunos com quem o senhor tem contato. Também preciso dizer que o senhor não seria essa pessoa sem a esposa maravilhosa que tem ao seu lado, ela é parecida com um favo - tem aquela casquinha açucarada por fora, é toda estruturada para aguentar firme e por dentro é uma doçura - baiana, arretada, que tive o privilégio de conhecer. A Marcinha, também digna de muita admiração. Que Cristo conserve a sua saúde e a sua luz sempre. Gratidão, mestre!

A minha querida coorientadora professora **Flaviana Bombarda de Andrade** por todas as orientações, todas as vezes que me atendeu de última hora, final de tarde, véspera de final de semana, e que, pacientemente e com muita doçura, sentou comigo e me explicou os experimentos e as benditas contas (risos). Obrigada por disponibilizar seu tempo, o laboratório e sua orientada.

Às queridas companheiras de laboratório e experimento **Daniela e Maricel**, muito obrigada por toda sua dedicação, carinho, paciência e orientações. Vocês foram verdadeiros anjos em minha vida. Deus vos ilumine.

Ao professor **Lauris** e a **Maricel** pelas explicações e assistência estatística.

Ao **Marcelo** e à **Marcia**, funcionários do Centro Integrado de Pesquisa (CIP), que sempre estiveram disponíveis e dispostos pra o que eu precisei. E também à **Thelma** do Laboratório de Bioquímica, que, além de minha paciente, ajudou-me com muito carisma, todas as vezes que eu solicitei ajuda.

Aos professores do departamento de cirurgia, estomatologia e radiologia, **Izabel, Cássia, Ana, Renato, Osny, Eduardo Gonçales e Eduardo Sant'Ana** pelos ensinamentos depositados com tanta sabedoria e paciência conosco. A experiência com cada um de vocês será inesquecível. Ao novo professor substituto do

---

---



---

---

departamento, **Victor**, pela sua humildade, dedicação e humanidade com que trata a todos. Te admiro como profissional e como pessoa. Muito obrigada!

Aos funcionários do departamento **Alexandre, Fernanda, Roberto, Marco, Luciana, Josieli e Andreia**, por todo respeito e disponibilidade. Em especial à **Luciana** e à **Andreia**, que sempre me trataram com muito amor, me fazendo chás para as indisposições do dia-a-dia (risos). Também aos funcionários do centro de pesquisas clínicas (CPC) **Anderson, Sueli, Poliana e Marcelo**, obrigada pela disponibilidade sempre! Vocês fazem toda a diferença!

Aos companheiros de turma, nós conseguimos cumprir todas as etapas juntos, sempre nos ajudando, incentivando, acolhendo e nos divertindo. À **Raquel**, mama querida. Nunca vou esquecer como você é doce, divertida, humana e doida. Todo seu amor por mim vai ser levado dentro do meu coração por toda a vida. O quanto a gente se comunicava com os olhos durante as cirurgias, os casos mais difíceis no hospital e no CPC. Quando você pedia ou me oferecia ajuda apenas com um olhar, uma piscada ou um suspiro e depois de tudo... um abraço, lágrimas, um carinho. Não tenho palavras pra descrever esses dois anos com você. Você é sensa! Te amo muito minha amiga. À **Tamires**, psicóloga que resolveu se embrenhar na estomatologia. Bela escolha, a propósito. Minha amiga, muito obrigada pelo acolhimento, pelas horas e horas de conversas e por me apoiar, sempre. Tenho muito orgulho de você. À **Patricia**, barbie rambo do departamento. É muito bom ter uma amiga como você, toda lady, mas que corre atrás do que quer, está sempre disposta e de bem com a vida, topa qualquer parada! Se é pra sairmos... Vamos. Se é pra viajarmos... Vamos. Se é ajuda pra trocar o pneu... Vamos. Você é incrível. Te admiro! Ao **Gabriel**, o baiano mais gato do departamento. Sei que toda sua implicância com minhas compras, o jeito que seco meu cabelo e meu vocabulário é amor. Você é muito especial, amigo.

À **Natália**, que quando foi embora deixou uma enorme saudade e mesmo a distância me acompanhou, acolheu e compartilhou suas conquistas e “não tão conquistas assim” comigo. Te amo querida amiga!

À **Caroline** e ao **Guilherme**, que no último ano foram muito especiais pra mim. Me acolheram quando mais precisei em Bauru. Um eterno obrigada!

---

---



---

---

As minhas duplas de clínica **Aloizio** e **Reyna**, eu agradeço tanto aprendizado e por todas as vezes que me ajudaram quando precisei.

Aos colegas de pós graduação, em especial à **Gabriela, Aneliza, Brena, Silas** e **Rafael** pelo companheirismo, risadas, compartilhamento de experiências e acolhimento. Aprendi muito com cada um de vocês.

Aos amigos e colegas da equipe do Hospital Estadual de Bauru: **Gabriela, Reyna, Aloizio, Aneliza, Brena, Gabriel, Daniel, Raquel, Caroline** e **Guilherme**, sem a nossa parceria e disponibilidade, tudo teria sido bem difícil.

Aos pacientes, encarnados ou desencarnados, que me trouxeram tanta experiência como profissional e, mais ainda, aprendizado de vida. Poder fazer uma pequena diferença, que seja, é o motivo do meu enorme e sincero amor pelo que faço. Obrigada por essa oportunidade!

Enfim, a todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste tão sonhado mestrado pela FOB-USP, meu muito obrigada!

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

---

---





---

---

*“Não deixe o barulho da opinião dos outros abafar sua voz interior. E mais importante, tenha a coragem de seguir seu coração e sua intuição. Eles de alguma forma já sabem o que você realmente quer se tornar. Tudo o mais é secundário.”*

*Steven Paul Jobs*

---

---



---

---

## RESUMO

A busca por agentes antimicrobianos na forma de enxaguatórios bucais com menos efeitos colaterais mostra-se interessante como alternativa aos enxaguatórios já existentes. Os objetivos deste trabalho foram avaliar a resposta de microrganismos orais patogênicos, também associados a doenças sistêmicas, frente a soluções contendo clorexidina, Polihexanida e dióxido de cloro, comparar os efeitos dessas soluções entre si e visualizar o efeito antimicrobiano sobre o biofilme presente na superfície de um substrato de dentina. As concentrações iniciais das soluções utilizadas foram 0,12% de clorexidina, 0,2% de Polihexanida e 0,02% de dióxido de cloro. Os microrganismos selecionados para esse estudo foram *S. sanguinis*, *S. mutans* e *E. faecalis*. Foram realizadas microdiluições em microplacas de 96 poços para se determinar a concentração inibitória mínima e, após, obtivemos a concentração bactericida mínima. Discos de dentina de incisivos bovinos foram confeccionados e utilizados como substrato para o crescimento de um período de 6 dias de biofilmes das três bactérias. No 7º dia, concentrações correspondentes à concentração bactericida mínima para cada bactéria foram aplicadas por 60 segundos sobre cada microrganismo. Esses discos foram corados e lidos no microscópio confocal de varredura a laser. Para análise estatística foi aplicado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn e adotado um nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ). Sobre o controle do biofilme do *S. sanguinis*, a Polihexanida e o dióxido de cloro conseguiram reduzir em quase 50% a viabilidade desse microrganismo, o que é um resultado significativo. O *S. mutans* foi mais destruído pelo dióxido de cloro quando comparado ao controle e à clorexidina e todas as soluções tiveram efeito antimicrobiano significativo em comparação ao controle quando testadas em *E. faecalis*. As três soluções estudadas apresentaram efetividade antimicrobiana contra os microrganismos selecionados, porém o dióxido de cloro foi a solução que mais se destacou, inclusive em comparação à clorexidina quando aplicado ao *S. mutans*.

**Palavras chave:** Clorexidina, Polihexanida, Dióxido de cloro, Resposta bacteriana

---

---



---

---

## ABSTRACT

The search for antimicrobial agents in the form of mouthwashes with fewer side effects is interesting as an alternative to existing mouthwashes. The aims of this work were to evaluate the response of oral pathogenic microorganisms, also associated with systemic diseases, against solutions containing chlorhexidine, polyhexanide and chlorine dioxide, to compare the effects of these solutions with each other and to visualize the antimicrobial effect on the biofilm present on the surface of a dentin substrate. The initial concentrations of the solutions used were 0.12% chlorhexidine, 0.2% polyhexanide and 0.02% chlorine dioxide. The microorganisms selected for this study were *S. sanguinis*, *S. mutans* and *E. faecalis*. Microdilutions were performed in 96-well microplates to determine the minimum inhibitory concentration and, after, we obtained the minimum bactericidal concentration. Dentin discs from bovine incisors were prepared and used as substrate for the growth of 6 days biofilms of the three bacteria. On the 7th day, concentrations corresponding to the minimum bactericidal concentration for each bacterium were applied for 60 seconds on each microorganism. These discs were stained and read in the laser scanning confocal microscope. For statistical analysis the Kruskal-Wallis followed by the Dunn non-parametric tests were applied, a significance level of 5% ( $p < 0.05$ ) was adopted. Regarding the control of the *S. sanguinis* biofilm, polyhexanide and chlorine dioxide managed to reduce the viability of this microorganism by almost 50%, which is a significant result. *S. mutans* was killed by chlorine dioxide when compared to the control and chlorhexidine and all solutions had a significant antimicrobial effect compared to the control when tested in *E. faecalis*. The three studied solutions showed antimicrobial effectiveness against the selected microorganisms, however chlorine dioxide was the solution that stood out, even when compared to chlorhexidine when applied to *S. mutans*.

**Keywords:** Chlorhexidine, Polyhexanide, Chlorine dioxide, Bacterial response

---

---



---

---

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Disposição das soluções antimicrobianas na microplaca de 96 poços..... 36
- Figura 2.** Esquema do plaqueamento das alíquotas retiradas das microplacas de 96 poços para determinação da concentração bactericida mínima..... 37
- Figura 3.** Tabela com a mediana, mínimo e máximo do efeito antimicrobiano de cada solução sobre a *S. sanguinis* e gráfico com a média da viabilidade de células de cada solução e controle..... 45
- Figura 4.** Tabela com a mediana, mínimo e máximo do efeito antimicrobiano de cada solução sobre a *S. mutans* e gráfico com a média de viabilidade de células de cada solução e controle..... 49
- Figura 5.** Tabela com a mediana, mínimo e máximo do efeito antimicrobiano de cada solução sobre a *E. faecalis* e gráfico com a média de viabilidade de cada solução e controle..... 53
- 
-





---

---

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Concentrações das soluções (mg/mL) utilizadas para a determinação da concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima. 35
- Tabela 2.** Concentração bactericida mínima (mg/mL) de cada solução utilizada para tratar os discos com biofilme a fim de determinar as atividades antimicrobianas ..... 43
- Tabela 3.** Comparação de efetividade entre as três soluções e o controle em cada bactéria..... 44
- Tabela 4.** Viabilidade de cada campo lido no microscópio confocal de varredura a laser no experimento com *S. sanguinis*..... 79
- Tabela 5.** Viabilidade de cada campo lido no microscópio confocal de varredura a laser no experimento com *S. mutans* ..... 80
- Tabela 6.** Viabilidade de cada campo lido no microscópio confocal de varredura a laser no experimento com *E. faecalis*..... 80
- 
-



---

---

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>%</b>	Porcentagem
<b>µL</b>	Microlitro
<b>µm<sup>3</sup></b>	Micrômetro Cúbico
<b>a.C.</b>	antes de Cristo
<b>ATCC</b>	<i>American Type Culture Collection</i>
<b>BHI</b>	Meio de Cultura Brain Heart Infusion (Infusão de Cérebro-coração)
<b>CBM</b>	Concentração Bactericida Mínima
<b>CEUA</b>	Comissão de Ética no Uso de Animais
<b>CHX</b>	Clorexidina
<b>CIM</b>	Concentração Inibitória Mínima
<b>CIP</b>	Centro Integrado de Pesquisa
<b>ClO<sub>2</sub></b>	Dióxido de Cloro
<b>CO<sub>2</sub></b>	Gás Carbônico
<b>CPW</b>	Cell and Protoplast Washing
<b><i>E. faecalis</i></b>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<b>EDTA</b>	Ácido Etilenodiaminotetracético
<b>FCFRP-USP</b>	Farmácia Bioquímica pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo
<b>FOB-USP</b>	Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo
<b>g</b>	Gramma
<b>H<sub>2</sub></b>	Gás Hidrogênio
<b>HCl</b>	Ácido clorídrico
<b>L</b>	Litro
<b>Ltda</b>	Limitada
<b>mg/mL</b>	Miligramas por Mililitro
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mm</b>	Milímetro
<b>N<sub>2</sub></b>	Gás Nitrogênio
<b>NaCl</b>	Cloreto de Sódio
<b>NaClO</b>	Hipoclorito de Sódio
<b>nm</b>	Nanômetro

---

---



---

---

<b>n°</b>	Número
<b>ns</b>	Não Significativo
<b>°C</b>	Grau Celsius
<b>pH</b>	Potencial Hidrogeniônico
<b>PHMB</b>	Polihexanida
<b>s</b>	Segundos
<b><i>S. mutans</i></b>	<i>Streptococcus mutans</i>
<b><i>S. sanguinis</i></b>	<i>Streptococcus sanguinis</i>
<b>SiC</b>	Carbeto de Silício
<b>UFC/mL</b>	Unidade Formadora de Colônia por Mililitro
<b>µm</b>	Micrômetro

---

---



---

---

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>21</b>
2.1	Controle de biofilme bacteriano dentário .....	21
2.2	Enxaguatórios Bucais .....	21
2.3	Bactérias orais .....	23
<b>3</b>	<b>PROPOSIÇÃO</b> .....	<b>29</b>
3.1	Objetivo geral.....	29
3.2	Objetivos específicos .....	29
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>33</b>
4.1	Soluções .....	33
4.2	Atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> , para obtenção das concentrações inibitórias e bactericidas.....	33
4.3	Atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> sobre biofilmes .....	37
4.4	Análise Estatística.....	39
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>43</b>
5.1	Resultados da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM).....	43
5.2	Resultados da viabilidade do biofilme .....	43
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>59</b>
6.1	Limitações do estudo .....	61
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>65</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>69</b>
	<b>APÊNDICE</b> .....	<b>79</b>

---

---





# 1 INTRODUÇÃO

---



## 1 INTRODUÇÃO

A resistência microbiana é uma preocupação global para a área da saúde (SEPTIMUS, 2018), por isso diversos estudos têm tentado encontrar agentes com atividade antimicrobiana eficiente contra o crescimento dos microrganismos, a fim de estabelecer saúde (JOSEPH et al., 2017; MAIA FILHO et al., 2008; MATHARU; CIRIC; EDIRISINGHE, 2018; SAKKAS; PAPADOPOULOU, 2017). Equipamentos modernos permitem-nos a visualização da ação antimicrobiana no biofilme oral presente na superfície de um substrato (*in situ*) o que agrega informações valiosas ao conhecimento existente sobre os efeitos do tratamento (ZAURA-ARITE; VAN MARLE; TEN CATE, 2001).

A microbiota da cavidade oral desempenha importante papel no desenvolvimento e patogênese tanto de doenças orais quanto sistêmicas (ZHANG et al., 2018). As evidências do uso de enxaguatórios bucais como controle químico de biofilme são milenares, sendo datadas desde 4000 a.C. e uma gama de fórmulas pode ser atribuída ao escritor e cientista Hipócrates (480 a.C.) (ASKITOPPOULOU et al., 2017; LINDHE, 2010).

O antisséptico local ideal deve satisfazer critérios como: ser um produto seguro, que age apenas localmente, pouco absorvido e não citotóxico, caso seja acidentalmente ingerido (LANG; BRECX, 1986). Dentre a variedade de agentes químicos para controle de biofilme, a clorexidina (CHX) é considerada a solução padrão-ouro devido a sua excelente bacteriostase em baixa concentração e substantividade por 8-12 horas, entre outras propriedades (HARATI et al., 2015). No entanto, os efeitos colaterais associados a sua utilização enfatizam a necessidade de outro agente de controle de biofilme que seja tão eficiente quanto ela, mas sem seus efeitos adversos (LOE; RINDOM SCHIOTT, 1970).

A polihexametileno biguanida ou Polihexanida (PHMB), também considerada uma biguanida polimérica, distingue-se da CHX entre outras características, por não possuir as substituições terminais de clorobenzeno, um potencial carcinógeno humano (CHHABRA et al., 1991). É utilizada na medicina como antisséptico, sendo

---

---

comumente estudada na oftalmologia (CHOY; CHO; BOOST, 2012; ILLINGWORTH; COOK, 1998).

Um outro agente antimicrobiano, que não da família das biguanidas, é o dióxido de cloro ( $\text{ClO}_2$ ). Foi originalmente desenvolvido para aplicações de desinfecção de águas (BANG et al., 2014; THORN; ROBINSON; REYNOLDS, 2013), e os estudos sobre sua ação têm sido sobre biofilme bacteriano da saburra lingual para controle da halitose (EROVIC ADEMOVSKI; LINGSTRÖM; RENVERT, 2016; MA et al., 2017). Após uma busca na literatura científica, sem limites de tempo, verificamos que ainda não há nenhum estudo que compare os efeitos antimicrobianos dessas três soluções em patógenos orais ou sistêmicos. O que torna, assim, nosso trabalho inédito.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

---

---



## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Controle de biofilme bacteriano dentário

O controle de biofilme bacteriano dentário dá-se de forma mecânica mediante o uso de escovas dentais e dentifrícios e o controle químico através do uso de enxaguatórios bucais (LOE; RINDOM SCHIOTT, 1970; NEEDLEMAN; NIBALI; DI IORIO, 2015; SERRANO et al., 2015). Existe uma série de situações nas quais o indivíduo (ou cuidador) tem dificuldade em realizar o controle mecânico, logo o uso do antisséptico ou antimicrobiano em forma de enxaguatório torna-se uma alternativa válida, especialmente na prevenção da formação e no aumento do volume do biofilme (HUA et al., 2016; LOE; RINDOM SCHIOTT, 1970; MAIYA et al., 2015; WALDRON et al., 2019).

### 2.2 Enxaguatórios Bucais

#### - *Clorexidina*

No final da década de 1940, os cientistas buscavam desenvolver agentes antimaláricos e acabaram por formular um grupo de compostos chamados polibiguanidas, que demonstram um amplo espectro antimicrobiano (MATHUR et al., 2011). Dentre esses agentes, a *1,6-di-4-Chloro-phenyldiguanidohexane*, mais comumente conhecida como CHX, foi desenvolvida na Inglaterra. Inicialmente usada em feridas da pele, passou a ser utilizada como antisséptico em ginecologia, dermatologia, urologia e pré-operatório na medicina (DAROUICHE et al., 2010; HAAS et al., 2018; NOEL; TEMPLE; LAYCOCK, 2012). Em 1969, Schroeder foi o primeiro a investigar sua ação inibitória no biofilme bacteriano, já na odontologia (LANG; BRECX, 1986; MATHUR et al., 2011). Disponível em três formas, digluconato, acetato e sais de hidrocloreto, a CHX é um importante antisséptico, considerada um agente não específico e de amplo espectro. É o agente antibiofilme e antisséptico mais amplamente estudado das últimas décadas (MATHUR et al., 2011; RUSSELL, 1986; VITT et al., 2015). Bastante eficiente contra patógenos do biofilme bacteriano dentário, da gengivite, periodontite e cárie dentária, tem baixa toxicidade, sendo considerada

---

---

antisséptico padrão ouro na odontologia (LANG; BRECX, 1986; LOE; RINDOM SCHIOTT, 1970; MATHUR et al., 2011; ROSIN et al., 2001). Por outro lado, o uso prolongado da CHX exibe efeitos colaterais, como resistência bacteriana, descamação da mucosa, pigmentação extrínseca de esmalte, dentina e restaurações dentárias e alteração do paladar, o que a torna bastante restrita a casos específicos, na odontologia. Somado a isso, o pH do meio influencia em sua atividade, o que é um problema, pois temos variação de pH na boca e sua efetividade torna-se bastante reduzida na presença de matéria orgânica (LANG; BRECX, 1986; MATHUR et al., 2011; MCDONNELL; RUSSELL, 1999; RUSSEL; DAY, 1993; YETURU et al., 2016).

### **- Polihexanida**

Com menos destaque clínico que a CHX, porém também com amplo espectro antimicrobiano, baixo risco de hipersensibilidade por contato, boa tolerabilidade de células e tecidos, inclusive comparado à CHX (HARATI et al., 2015), a PHMB tem capacidade de se ligar à matriz orgânica e possui efeito promotor de cicatrização de feridas (EBERLEIN; ASSADIAN, 2010; KRAMER et al., 2018). Usada por muitos anos como um antisséptico em várias aplicações na medicina, seu uso mostra-se efetivo em colírio (LARKIN; KILVINGTON; DART, 1992), feridas com risco iminente de contaminação, feridas crônicas ou agudas e feridas já colonizadas, incluindo queimaduras (HURLOW, 2017; KRAMER et al., 2018). Até o presente momento, não foi detectado qualquer desenvolvimento de resistência a microrganismos durante o seu uso (EBERLEIN; ASSADIAN, 2010; KRAMER et al., 2018) e não há evidência de antagonismo contra antimicrobianos, como a penicilina G, ampicilina, gentamicina, eritromicina, levofloxacina, vancomicina, entre outros. A PHMB está disponível em solução, hidrogel e em curativos embebidos (MCDONNELL; RUSSELL, 1999). Em um estudo clínico realizado com enxaguatório contendo PHMB associado à tosilcloramida sódica, foi sugerido que esse produto pode ser utilizado por idosos em uso de próteses dentárias removíveis, pois seus efeitos persistem na boca por até 60 minutos. Os autores, ainda, sugerem o uso alternativo à CHX em paciente com mucosite oral quimioinduzida pois, devido à citotoxicidade da CHX, pode-se agravar o quadro de mucosite oral (GÖHRING et al., 2014). Existem duas principais contra-indicações quanto ao uso da PHMB, que são em paciente com histórico de hipersensibilidade à PHMB e o uso durante o primeiro trimestre de gravidez (KRAMER et al., 2018).

---



### - *Dióxido de Cloro*

O ClO<sub>2</sub>, importante desinfetante de águas e alimentos (BANG et al., 2014; THORN; ROBINSON; REYNOLDS, 2013), apresenta algumas propriedades interessantes como a alta solubilidade em água, mesmo em baixas temperaturas e sua atividade de desinfecção é pouco influenciada pelo pH do meio em que se encontra (TZANAVARAS; THEMELIS; KIKA, 2007) o que o torna bastante relevante para estudos mais aprofundados na odontologia. Devido a sua alta solubilidade, o ClO<sub>2</sub> tem a capacidade de penetrar no biofilme rapidamente e exercer sua ação antimicrobiana (YADAV; KINI; PADHYE, 2015) já estabelecida e com ação contra bactérias, vírus e fungos. Através da inibição do transporte de nutrientes pela membrana celular, essa solução impede o crescimento de tais microorganismos (YADAV; KINI; PADHYE, 2015). As propriedades de inibição de biofilme, antibacteriana e substantividade do enxaguatório bucal com ClO<sub>2</sub>, são comparáveis ao enxaguatório bucal com gluconato de CHX a 0,2% (YADAV; KINI; PADHYE, 2015).

## 2.3 Bactérias orais

### - *Streptococcus sanguinis*

O *Streptococcus sanguinis* é uma bactéria comensal, amplamente encontrada na cavidade bucal e seu estabelecimento é dependente da presença de dentes. Normalmente associada ao início de biofilmes dentários saudáveis, é encontrada tanto no biofilme supra quanto subgengival, presente em superfícies de tecido duro, mole e na saliva humana (ABUSLEME et al., 2013; CARLSSON, 1971; HINTAO et al., 2007; KRETH et al., 2017; ZHU et al., 2018). Como colonizador pioneiro da superfície dentária, *S. sanguinis* facilita a colonização de outras espécies, o que não é uma habilidade exclusiva dessa bactéria (KOLENBRANDER et al., 2006). Carlsson (1971) realizou alguns dos primeiros estudos nos quais encontrou associação de *S. sanguinis* e *Streptococcus mutans*, sendo a *S. mutans* estreitamente associada à cárie (CARLSSON, 1971).

---

Além da presença na boca, a *S. sanguinis* também é conhecida por ser o agente etiológico de várias doenças extraorais, como endocardite infecciosa, meningite, bacteremia grave e até mesmo o câncer (BIJLSMA et al., 2016; MACALUSO; SIMMANG; ANTHONY, 1998; MOON et al., 2010).

- ***Streptococcus mutans***

O *S. mutans* é frequentemente localizado na superfície dos dentes e tem importante papel na iniciação da cárie, porque produz ácidos na presença de carboidratos simples e suportam ambiente com baixo pH. Essas características tornam-no um microrganismo com alto poder cariogênico, sendo encontrado em abundância no biofilme, tanto em lesões superficiais, quanto profundas (GOMAR-VERCHER et al., 2014; TANZER; LIVINGSTON; THOMPSON, 2001; WALTER J. LOESCHE, 1986). O gênero *Streptococcus* é o mais prevalente nas vias aéreas superiores dos seres humanos (WHILEY et al., 1990). No Brasil, mais da metade das crianças até 5 anos tem cárie e esse número é ainda maior (76,1%) em indivíduos de 15 a 19 anos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).

- ***Enterococcus faecalis***

*Enterococcus faecalis*, que é outro microrganismo da flora oral, também é um importante agente patógeno bucal, uma vez que é associado a falhas nos tratamentos endodônticos e à peri-implantite (ANTUNES et al., 2015; RAKIC; GRUSOVIN; CANULLO, 2016). Estudos demonstram que, após exodontia de um dente com falha endodôntica para reabilitação com implante, há grandes chances de haver peri-implantite devido à presença de bactérias no osso ao redor do dente (FLANAGAN, 2016; LÓPEZ-MARTÍNEZ et al., 2015). Ainda que cuidados com o alvéolo de recém extração sejam tomados, como a curetagem rigorosa, enxertia óssea e espera para neoformação óssea, estes não garantem a saúde do tecido peri-implantar ou a manutenção do implante (FLANAGAN, 2016, 2017).

Localizada nos canais dentinários dos dentes desvitalizados, o *E. faecalis* normalmente é resistente a antissépticos comuns e irrigantes endodônticos e alguns antibióticos sistêmicos como eritromicina e azitromicina (ENDO et al., 2015). Os *E.*

---

---

*faecalis* são anaeróbios facultativos e podem sobreviver a pH alcalino (pH 11,5) e, altas concentrações de sal, resistir à privação nutricional, invadir túbulos dentinários e é capaz de ser colonizador único, isto é, sobrevive sem a associação de outras bactérias (BYSTROM; CLAESSON; SUNDQVIST, 1985; ENDO et al., 2015; FLANAGAN, 2017).

A boca é um ambiente que sofre diversas influências, como, por exemplo, da alimentação, fala, salivação, do uso de medicamentos (LAMONT; KOO; HAJISHENGALLIS, 2018; SAMARANAYAKE; MATSUBARA, 2017). A manutenção da homeostasia muitas vezes é feita por agentes antimicrobianos no intuito de se conter a proliferação dos microrganismos patogênicos. Porém, os agentes já consagrados podem provocar inúmeros efeitos adversos. Nesse sentido, estudos científicos que objetivem buscar alternativas viáveis aos agentes antimicrobianos (enxaguantes bucais) já estabelecidos são necessários.



# **3 PROPOSIÇÃO**

---

---



## 3 PROPOSIÇÃO

### 3.1 Objetivo geral

Avaliar a resposta bacteriana de importantes espécies orais patogênicas frente a soluções contendo CHX, PHMB e ClO<sub>2</sub>.

### 3.2 Objetivos específicos

- Avaliar *in vitro* a ação antimicrobiana de soluções contendo CHX, PHMB e ClO<sub>2</sub>, nas concentrações iniciais de 0,12%, 0,2% e 0,02% respectivamente, contra microrganismos orais (*S. sanguinis*, *S. mutans* e *E. faecalis*), para determinar a concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima;
  - Visualizar a ação das soluções sobre o biofilme monoespécie de *S. sanguinis*, *S. mutans* e *E. faecalis* presente na superfície de discos de dentina.
-





# **4 MATERIAL E MÉTODOS**

---

---



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Soluções

As soluções utilizados nesta pesquisa foram a PHMB 0,2%, o ClO<sub>2</sub> 0,02%, clorexidina 0,12% e água destilada para controle. A PHMB e o ClO<sub>2</sub> foram gentilmente doados pelas empresas Walkmed Produtos Medicos Ltda. R Joao Pessoa, 60 Cj 56 - 11013-000 – Santos/SP CNPJ: 00.165.012/0001-76 e Embatek Tecnologia em Cosméticos Ltda. Rua Dr. Moisés Kahan, 75 – Barra Funda – 01139-040 – São Paulo/SP CNPJ: 05.4444.482/0001-92, respectivamente. A CHX foi adquirida por manipulação na 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.

As soluções foram filtradas por meio de filtro de Seringa (Millex-HP®, 0,45 µm, polieteersulfona, 33 mm, esterilizada por raios gama) e a água destilada foi autoclavada à 121°C por 15 min, todas mantidas em tubos fálcon esterilizados em local fresco (21°C) e escuro.

### 4.2 Atividade antimicrobiana *in vitro*, para obtenção das concentrações inibitórias e bactericidas

Os estudos para determinação da ação antimicrobiana das soluções, *in vitro*, foram realizados no Centro Integrado de Pesquisa – CIP e no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo (FOB-USP).

#### - *Microrganismos*

As cepas bacterianas utilizadas no presente estudo foram adquiridas da coleção americana *American Type Culture Collection* - ATCC (Manassas, Virginia, EUA). A atividade antimicrobiana das soluções foi avaliada frente aos microrganismos

---

---

da microbiota oral *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) e *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556) que foram gentilmente cedidos pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Flaviana Bombarda Andrade (FOB-USP) e pelo Prof. Dr. Evandro Watanabe (Farmácia Bioquímica pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo / FCFRP-USP).

#### **- Obtenção do inóculo**

A câmara de fluxo laminar (Esco, Arstream, classe II A2 , Jacari, São Paulo) foi usada para garantir as condições assépticas onde foram conduzidos os procedimentos microbiológicos e a manipulação das soluções. O inóculo bacteriano foi obtido por meio de culturas sucessivas das bactérias supracitadas. O crescimento bacteriano foi obtido em fase exponencial no período de 48 horas. Para *S. sanguinis*, o meio para cultivo de anaeróbios foi: BHI (brain heart infusion) (Kasvi® - São José dos Pinhais, Paraná, Brasil) + TSB (tryptic soy broth) (Kasvi® - São José dos Pinhais, Paraná, Brasil) + extrato de levedura (Kasvi® - São José dos Pinhais, Paraná, Brasil) + solução de menadiona + solução de hemina - adicionado a 1% de sacarose e mantido em cabine de anaerobiose (80% N<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, 10% H<sub>2</sub>) a 37°C. Para *S. mutans*, foi utilizado caldo BHI esterilizado adicionado de 1% de sacarose para *S. mutans* mantido em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C, para *E. faecalis*, BHI esterilizado adicionado de 1% de glicose mantido em estufa microbiológica a 37°C. Após o desenvolvimento dos microrganismos, os inóculos foram padronizados por meio de espectrofotometria a 540nm (Espectrofotômetro AJX 1000, Micronal S.A, São Paulo, Brazil) (STALONS; THORNSBERRY; DOWELL JR, 1974), comparados com o padrão 1 McFarland (3 x 10<sup>8</sup> UFC/mL) e diluídos à concentração de 5x10<sup>5</sup> UFC/mL (Jones and Fuchs, 1976; Ferreira, 2007; RODRIGUES et al., 2018) com o objetivo de determinar a quantidade de caldo em cada poço para obtenção da concentração inibitória mínima (CIM). As suspensões dos microrganismos foram ajustadas até atingir a densidade óptica equivalente a 3 x 10<sup>8</sup> UFC/mL para a elaboração do biofilme (RODRIGUES et al., 2018).

#### **- Diluição dos antimicrobianos**

Para a microdiluição em caldo, utilizada para avaliação da CIM, foram utilizados

---

tubos para centrifugação do tipo falcon esterilizados, onde foram distribuídos 05 mL de água destilada esterilizada. Com auxílio de micropipetas, os antimicrobianos foram distribuídos nos tubos, em volumes de 05 mL para totalizar 10 mL em 12 concentrações (Tabela 1). Após as diluições, os tubos foram agitados no vortex (Vortex-mix VX200, Edison, NJ, EUA) por 1 minuto.

**Tabela 1.** Concentrações das soluções (mg/mL) utilizadas para a determinação da concentração inibitória mínima e concentração bacteriana mínima

Diluições	CHX	PHMB	ClO <sub>2</sub>
1	1,2	2,0	0,2
2	0,6	1,0	0,1
3	0,3	0,5	0,05
4	0,15	0,25	0,025
5	0,075	0,125	0,0125
6	0,0375	0,0625	0,00625
7	0,01875	0,03125	0,003125
8	0,009375	0,015625	0,0015625
9	0,00046875	0,0078125	0,00078125
10	0,00234375	0,00390625	0,000390625
11	0,001171875	0,001953125	0,0001953125
12	0,0005859375	0,0009765625	0,00009765625

CHX: clorexidina; PHMB: Polihexanida; ClO<sub>2</sub>: Dióxido de Cloro.

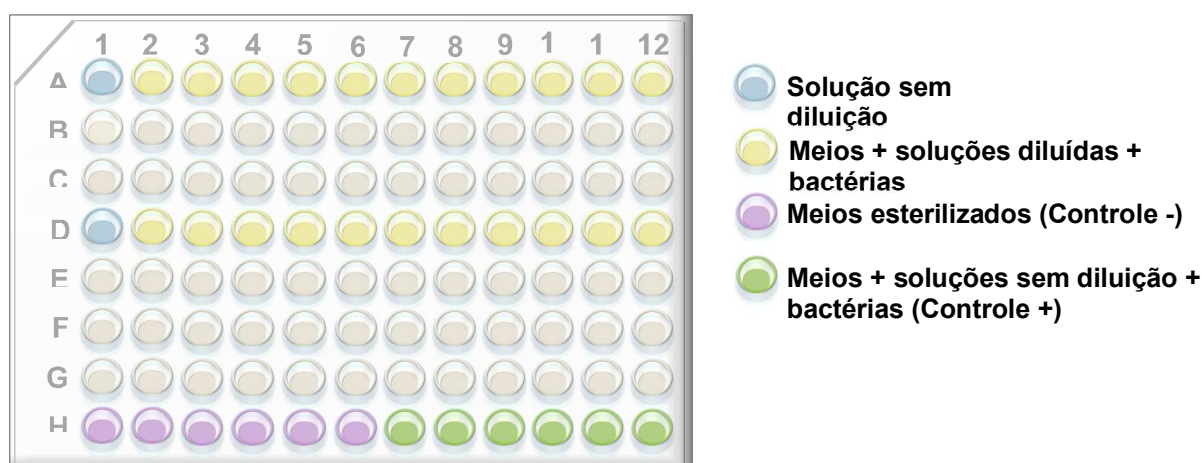
### ***-Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)***

De acordo com JONES et al., (1987), a CIM é a menor quantidade do antimicrobiano que produziu uma inibição completa do crescimento. A determinação da CIM das soluções foi realizada pela técnica de microdiluição em caldo BHI, utilizando microplacas de cultivo de 96 poços de fundo chato (PLACA DE CULTURA / EIA Corning® e Costar®), de acordo com o preconizado por ELOFF (1998). A CIM das soluções sobre as diferentes bactérias foi definida como a menor concentração que inibiu 100% do crescimento bacteriano, de acordo com os níveis de absorbância (ANDREWS, 2001). Para cada solução, foi inserido um blank, permitindo o desconto da absorbância intrínseca ao meio e às soluções. A absorbância foi mensurada após

incubação de 24 horas, nas condições ideais para cada microrganismo, em espectrofotômetro de microplacas (Synergy Mx acoplado a Software Gen 5, Biotek, EUA) a 540nm.

Como controle positivo foram utilizadas cepas para comprovar a viabilidade dos microrganismos testados e como controle de esterilidade foram utilizados os meios instituídos para cada bactéria e as soluções selecionadas no estudo, que se encontravam esterilizados excluindo qualquer possibilidade de contaminação por outros tipos de microrganismos. Nos poços com as soluções foram adicionados os meios para dar condições de possível crescimento bacteriano, devido aos nutrientes.

Sob fluxo laminar, foram dispostas 9 microplacas, referentes ao teste de cada solução frente a cada microrganismo, realizados em duplicata. A composição de cada poço está ilustrada na Figura 1.



**Figura 1.** Disposição das soluções antimicrobianas na microplaca de 96 poços

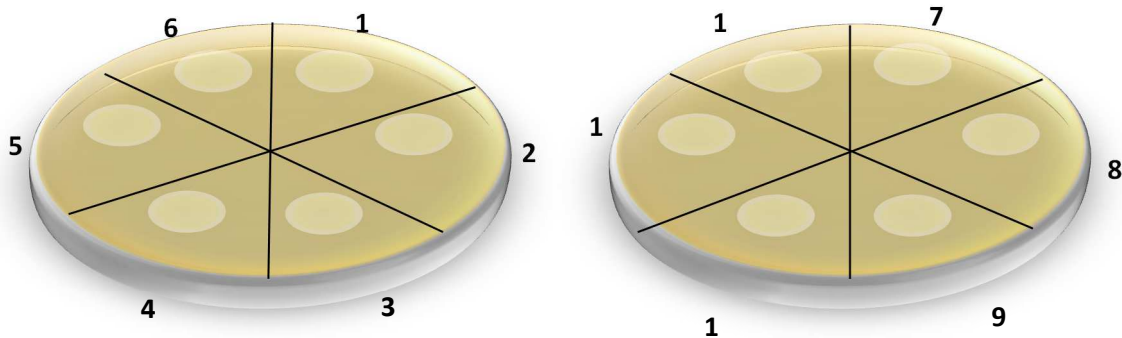
Fonte: O Autor

### **- Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)**

A concentração bactericida mínima (CBM) das soluções sobre diferentes microrganismos orais foi definida como a menor concentração de antimicrobiano que causou a morte do inóculo bacteriano utilizado.

Após a incubação de 24 horas das microplacas de 96 poços, foi realizada a determinação da CBM em duplicata. Alíquotas de 20 µL foram retiradas de cada um dos poços da fila A e D (Figura 1), contendo as soluções - e suas respectivas

concentrações - e transferidas por meio de pipetas para as placas de Petri (90x15 mm) contendo ágar com BHI (Figura 2). A leitura foi realizada após a incubação das placas a 37°C por 24 horas, nas devidas condições. O surgimento de colônia bacteriana para uma determinada concentração indicou que esta não foi capaz de matar 99,9% ou mais do inóculo bacteriano utilizado.



**Figura 2.** Esquema do plaqueamento das alíquotas retiradas das microplacas de 96 poços para determinação da concentração bactericida mínima

Fonte: O Autor

### 4.3 Atividade antimicrobiana *in vitro* sobre biofilmes

#### - Preparo do Substrato

Discos de dentina (4 mm de diâmetro e 1,5 mm de espessura) foram preparados a partir de dentes incisivos bovinos. O uso de dentina bovina foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FOB-USP registro número: 024/2018. Os discos foram confeccionados através de corte com micromotor e broca trefina para osso sem coletor sob irrigação abundante afim de se evitar superaquecimento. Após, os discos de dentina tiveram suas superfícies planificadas e polidas na Politriz lixadeira metalográfica (PLF DV, Fortel, São Paulo, SP, Brasil) utilizando-se lixas SiC d' água de granulações 600, 900 e 1200. Durante a preparação de espécimes de dentina, ocorre a formação de uma camada de debris, a qual foi removida tratando os discos em cuba ultrassônica (2,5 L Cristófoli, Campo Mourão, PR, Brasil) com hipoclorito de sódio a 1% (NaOCl) (Rioquímica, São José do Rio Preto, SP, Brasil), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) a 17% (Biodinâmica,

Ibiporã, PR, Brasil) e soro fisiológico por 10 minutos em cada solução. Em um frasco contendo água destilada, os discos de dentina foram esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos.

#### **- Crescimento do biofilme**

Os discos de dentina foram dispostos nos poços de uma placa para cultivo de 24 poços de fundo chato (Kasvi® - São José dos Pinhais, Paraná, Brasil). Um volume de 400 µL de suspensão de inóculo foi adicionado a 10 mL de meio e incubado de maneira ideal para cada microrganismo a 37°C, durante a noite. Após, alíquotas de 1,0 mL foram distribuídas em cada poço da placa na concentração desejada. O conjunto foi incubado sob as condições já citadas a 37°C durante 6 dias.

#### **- Viabilidade do biofilme intacto**

As amostras foram lavadas uma vez em 1,0 mL de água peptonada CPW (cell and protoplast washing – 5g de extrato de levedura, 1g de peptona, 8,5g de NaCl e 0,5g de HCl de l-cisteína, água deionizada/L, pH 7,3), a fim de remover bactérias fracamente aderidas. Em seguida, os discos foram imersos nas soluções estudadas durante 60s para tratamento, como é feito normalmente com enxaguantes bucais e, em seguida, lavados novamente uma única vez, em água peptonada CPW. Após os tratamentos, as amostras foram coradas com 20 µL de corante LIVE/DEAD® (BacLight™ Bacterial Viability Kit, Invitrogen™ Califórnia, EUA) por 15 minutos em condições escuras.

Quatro campos representativos de cada disco foram visualizados em um microscópio confocal de varredura a laser Leica TCS-SPE (Leica Microsystems Engineering GmbH, Mannheim, Alemanha). Para comparar as imagens, as configurações de aquisição foram mantidas constantes. As imagens foram adquiridas com objetivas de 40x – óleo de imersão, com tamanho de 512 x 512 pixels, com passos de 1 µm no eixo Z. As imagens foram analisadas com o software Leica LAS X (Leica, Wetzlar, Alemanha) para quantificar o volume de bactérias vivas (em verde) e mortas (em vermelho) e determinar a viabilidade celular (ZAURA-ARITE; VAN MARLE; TEN CATE, 2001).A viabilidade é um importante instrumento de medida

---



quantitativa em estudos sobre respostas de microrganismos, que, por definição, é tida como a capacidade de infecção ou patogenicidade de um microrganismo (BUNTHOF et al., 2001; KELL et al., 1998). Para determiná-la, tem-se a fórmula:

$$\text{Viabilidade celular (\% de células vivas)} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ de células vivas} \times 100}{\text{n}^{\circ} \text{ de células vivas e mortas}}$$

#### **4.4 Análise Estatística**

Os dados coletados foram devidamente tabulados e analisados estatisticamente pelo programa GraphPad Prism - Prism 5 e, a fórmula de viabilidade foi aplicada para determinar a porcentagem. Os testes não paramétricos de Kruskal-Wallis seguido de teste de Dunn foram realizados para a comparação entre as soluções nos microrganismos testados, pois os dados não apresentaram distribuição normal. Para todos os casos foi adotado um nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

---

---



# **5 RESULTADOS**

---

---



## 5 RESULTADOS

### 5.1 Resultados da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM)

Os resultados dos ensaios para determinar a CIM *in vitro* não se mostraram homogêneos devido à turbidez inerente às soluções, portanto, no momento da leitura das microdiluições nas microplacas, o aparelho não pôde diferenciar os poços em contaminados ou não. Por outro lado, os resultados da CBM foram claros, com presença ou ausência de colônias nas placas e estão apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Concentração bactericida mínima (mg/mL) de cada solução utilizada sobre cada espécie bacteriana.

	CHX	PHMB	ClO <sub>2</sub>
<i>S. sanguinis</i>	8 - 0,009375	7 - 0,03125	5 - 0,0125
<i>S. mutans</i>	9 - 0,00046875	4 - 0,25	8 - 0,0015625
<i>E. faecalis</i>	8 - 0,009375	10 - 0,00390625	6 - 0,00625

CHX: clorexidina; PHMB: Polihexanida; ClO<sub>2</sub>: Dióxido de Cloro.

Os resultados expostos na Tabela 2 foram utilizados como parâmetro para o experimento seguinte, em que as soluções foram testadas nos biofilmes das bactérias selecionadas neste estudo.

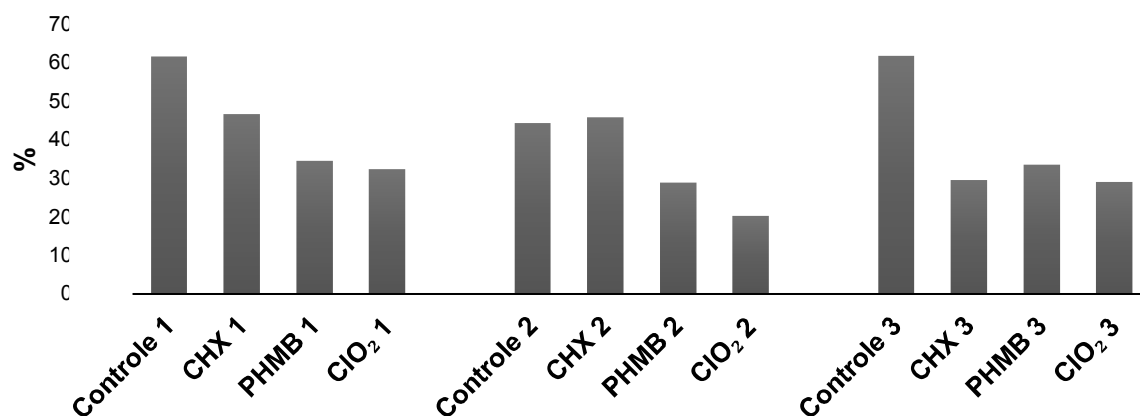
### 5.2 Resultados da viabilidade do biofilme

Após a condução do experimento em que expusemos as bactérias às soluções para tratamento e à água destilada como controle, a fim de determinarmos a efetividade antimicrobiana de cada uma, observamos que todas as soluções exerceram atividade antimicrobiana contra os microrganismos estudados (Tabela 3 e Gráfico 1).

**Tabela 3.** Comparação de efetividade entre as três soluções e o controle em cada bactéria

<i>S. sanguinis</i>		<i>S. mutans</i>		<i>E. faecalis</i>	
Controle x CHX	ns	Controle x CHX	ns	Controle x CHX	p<0,05
Controle x PHMB	p<0,05	Controle x PHMB	ns	Controle x PHMB	p<0,05
Controle x ClO <sub>2</sub>	p<0,05	Controle x ClO <sub>2</sub>	p<0,05	Controle x ClO <sub>2</sub>	p<0,05
CHX x PHMB	ns	CHX x PHMB	ns	CHX x PHMB	ns
CHX x ClO <sub>2</sub>	ns	CHX x ClO <sub>2</sub>	p<0,05	CHX x ClO <sub>2</sub>	ns
PHMB x ClO <sub>2</sub>	ns	PHMB x ClO <sub>2</sub>	ns	PHMB x ClO <sub>2</sub>	ns

CHX: Clorexidina; PHMB: Polihexanida; ClO<sub>2</sub>: Dióxido de cloro; ns: Não Significativo



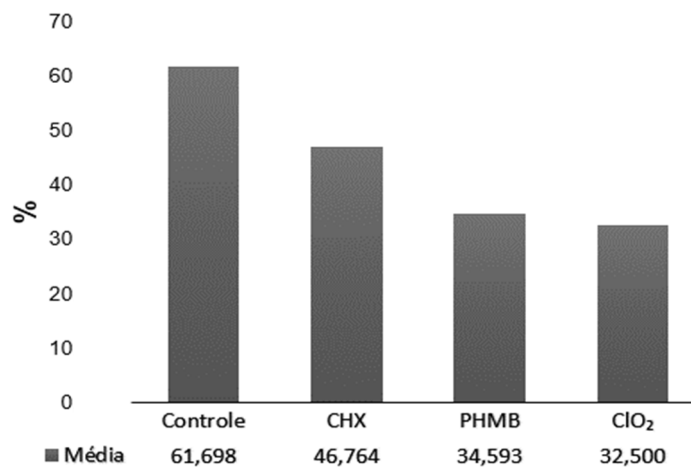
CHX: Clorexidina; PHMB: Polihexanida; ClO<sub>2</sub>: Dióxido de cloro; 1: *Streptococcus sanguinis*; 2: *Streptococcus mutans*; 3: *Enterococcus faecalis*

**Gráfico 1.** Viabilidade média de cada bactéria frente à todas as soluções e controle

### - Efeito das soluções sobre o biofilme de *S. sanguinis*

A Figura 3 mostra o gráfico de comparação de efetividade das soluções aplicadas ao *S. sanguinis* e a tabela com as medianas de cada solução, as letras indicam se houve diferença estatística entre as soluções. Os grupos que compartilham as mesmas letras não obtiveram diferença estatística entre si. O Painel 1 exibe as imagens da viabilidade do biofilme - obtidas através do microscópio confocal de varredura a laser - correspondentes ao gráfico da Figura 3. De acordo com a análise estatística, a CHX não apresentou diferença de efetividade antimicrobiana em comparação ao controle e nem às outras soluções. A PHMB e o ClO<sub>2</sub>, porém, obtiveram maior ação antimicrobiana quando comparados ao controle (p<0,05). Entre si, nenhuma solução foi estatisticamente mais efetiva no efeito antimicrobiano do que a outra.

	Controle	CHX	PHMB	ClO <sub>2</sub>
<b>Mediana (<math>\mu\text{m}^3</math>)</b>	0,69 <sup>a</sup>	0,43 <sup>a,b</sup>	0,33 <sup>b</sup>	0,39 <sup>b</sup>
<b>Minimum (<math>\mu\text{m}^3</math>)</b>	0,11	0,01	0,00	0,00
<b>Maximum (<math>\mu\text{m}^3</math>)</b>	0,86	0,96	0,93	0,53



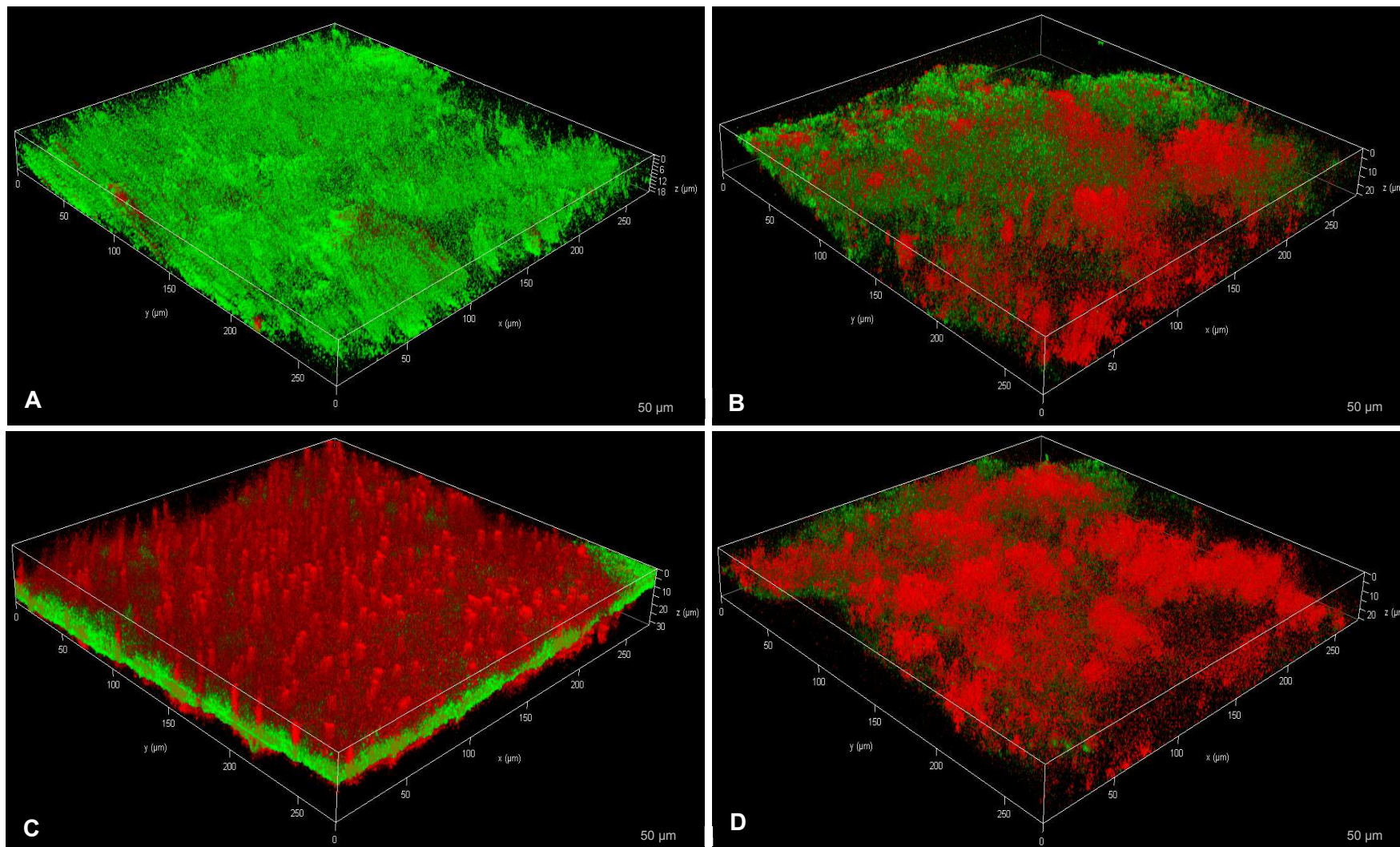
Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos CHX: Clorexidina; PHMB: Polihexanida; ClO<sub>2</sub>: Dióxido de cloro

**Figura 1.** Tabela com a mediana, mínimo e máximo do efeito antimicrobiano de cada solução sobre o *S. sanguinis* e gráfico com a média da viabilidade de células de cada solução e controle





Painel 1. Imagens da viabilidade do biofilme de *S. sanguinis* obtidas no microscópio confocal de varredura a laser de cada solução para tratamento e o controle aplicados à bactéria.



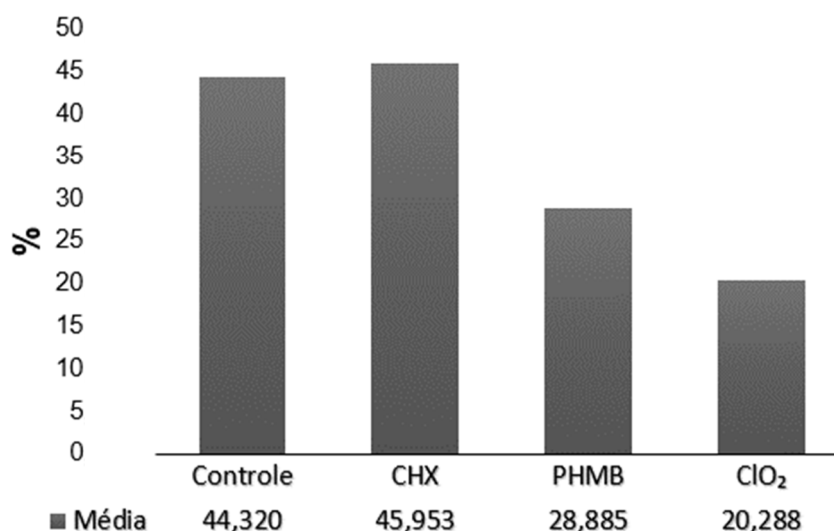
Verde: Volume de bactérias viáveis; Vermelho: Volume de bactérias mortas; A- Imagem do controle aplicado em *S. sanguinis*; B- Imagem da Clorexidina aplicada em *S. sanguinis*; C - Imagem da PHMB aplicada em *S. sanguinis*; D- Imagem da ClO<sub>2</sub> aplicada em *S. Sanguinis*



### - Efeito das soluções sobre o biofilme de *S. mutans*

O resultado apresentado pelo tratamento em *S. mutans*, exposto na Figura 4, mostra que a CHX não foi estatisticamente mais efetiva em destruir o *S. mutans* do que o controle e que a PHMB. A PHMB não obteve efeito antimicrobiano significativamente melhor em comparação ao controle e a nenhuma das outras soluções, porém em relação à média de destruição do biofilme, a PHMB se revelou melhor do que a CHX, pois destruiu quase 50% a mais de bactérias, o  $\text{ClO}_2$  também apresentou diferença estatística em comparação ao controle ( $p < 0,05$ ) (Tabela 3) e a sua média de viabilidade de biofilme foi a menor encontrada sobre o *S. mutans* em comparação às outras soluções (Figura 4). As imagens obtidas com o auxílio do microscópio confocal de varredura a laser sobre a viabilidade do biofilme de *S. mutans* estão expostas no Painel 2.

	Controle	CHX	PHMB	$\text{ClO}_2$
<b>Mediana (<math>\mu\text{m}^3</math>)</b>	0,41 <sup>a</sup>	0,39 <sup>a</sup>	0,26 <sup>a,b</sup>	0,20 <sup>b</sup>
<b>Minimum (<math>\mu\text{m}^3</math>)</b>	0,26	0,25	0,00	0,00
<b>Maximum (<math>\mu\text{m}^3</math>)</b>	0,69	0,98	0,57	0,44

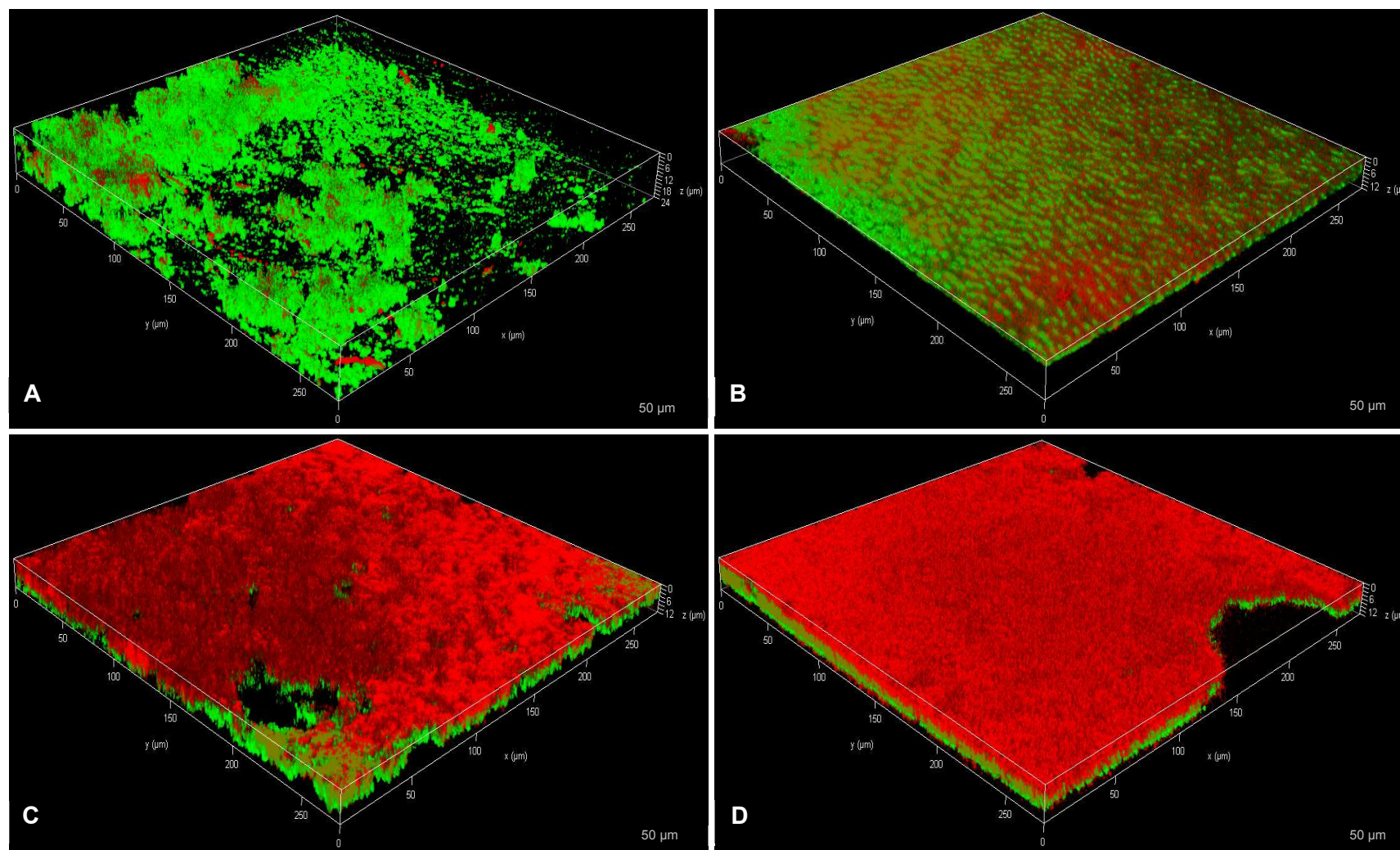


Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos CHX: Clorexidina; PHMB: Polihexanida;

**Figura 4.** Tabela com a mediana, mínimo e máximo do efeito antimicrobiano de cada solução sobre o *S. mutans* e gráfico com a média de viabilidade de células de cada solução e controle



Painel 2. Imagens da viabilidade do biofilme de *S. mutans* obtidas no microscópio confocal de varredura a laser de cada solução para tratamento e o controle aplicados à bactéria.



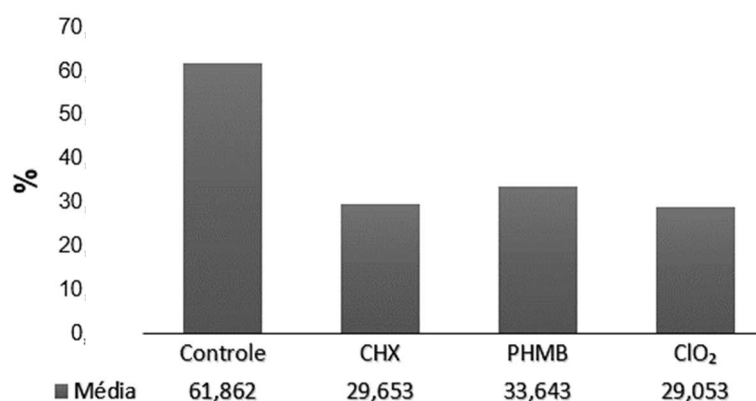
Verde: Volume de bactérias viáveis; Vermelho: Volume de bactérias mortas; A- Imagem do controle aplicado em *S. mutans*; B- Imagem da Clorexidina aplicada em *S. mutans*; C - Imagem da PHMB aplicada em *S. mutans*; D- Imagem da ClO<sub>2</sub> aplicado em *S. Mutans*



### - Efeito das soluções sobre o biofilme de *E. faecalis*

A média de viabilidade sobre o *E. faecalis* apresentou-se mais homogênea em comparação aos outros microrganismos, o que pode ser observado no Painel 3, que exibe as imagens da viabilidade do biofilme obtidas com o auxílio do microscópio confocal de varredura a laser. Todas as soluções (CHX, PHMB e ClO<sub>2</sub>) aplicadas como tratamento mostraram-se estatisticamente mais capazes de destruir *E. faecalis* do que o controle ( $p < 0,05$ ). Apesar da PHMB demonstrar média e mediana ligeiramente maior do que as outras soluções, não houve diferença estatística significativa no seu efeito antimicrobiano. (Figura 5 e Tabela 3).

	Controle	CHX	PHMB	ClO <sub>2</sub>
<b>Mediana (<math>\mu\text{m}^3</math>)</b>	0,63 <sup>a</sup>	0,21 <sup>b</sup>	0,43 <sup>b</sup>	0,23 <sup>b</sup>
<b>Minimum (<math>\mu\text{m}^3</math>)</b>	0,30	0,01	0,01	0,07
<b>Maximum (<math>\mu\text{m}^3</math>)</b>	0,86	0,58	0,74	0,61



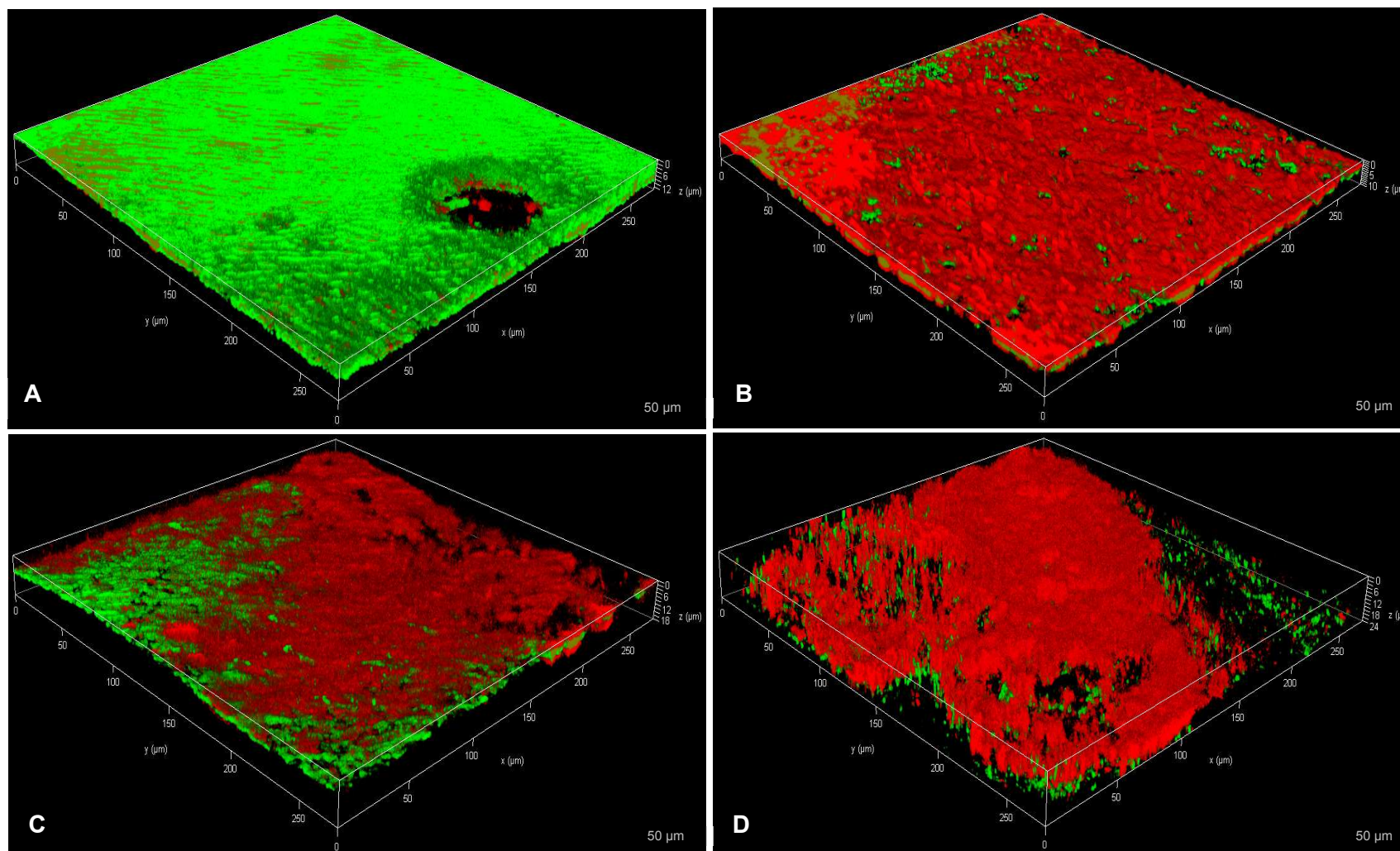
Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos CHX: Clorexidina; PHMB: Polihexanida; ClO<sub>2</sub>: Dióxido de cloro

**Figura 5.** Tabela com a mediana, mínimo e máximo do efeito antimicrobiano de cada solução sobre o *E. faecalis* e gráfico com a média de viabilidade de cada solução e controle





Painel 3. Imagens da viabilidade do biofilme de *E. faecalis* obtidas no microscópio confocal de varredura a laser de cada solução para tratamento e o controle aplicados à bactéria.



Verde: Volume de bactérias viáveis; Vermelho: Volume de bactérias mortas; A- Imagem do controle aplicado em *E. faecalis*; B- Imagem da Clorexidina aplicada em *E. faecalis*; C - Imagem da PHMB aplicada em *E. faecalis*; D- Imagem da  $\text{ClO}_2$  aplicado em *E. faecalis*



## **6 DISCUSSÃO**

---

---



## 6 DISCUSSÃO

O enxaguatório bucal ideal com baixa toxicidade e efeito residual, que possua amplo espectro de ação, que não provoque resistência bacteriana e seja livre de efeitos colaterais não existe. Com o propósito de encontrar produtos que tenham o melhor dessas características é que esta pesquisa foi conduzida. Demonstramos, por meio da CBM e da viabilidade do biofilme que as soluções estudadas têm efeito bactericida contra todos os microrganismos selecionados para este estudo.

Para o desenvolvimento do biofilme, o primeiro passo é a fixação, seguida pela formação de microcolônia de células recém-ligadas. Esse processo leva a uma série de eventos, dentre eles a adesão de outros microrganismos (que podem ser ou não da mesma espécie), resultando finalmente na formação de um biofilme maduro. A bactéria oral capaz de promover essa fixação é o *S. sanguinis* e, portanto, é a bactéria que inicia o biofilme oral, pois está presente na superfície dentária, mucosa oral e saliva humana (Nobbs and Kreth, 2019; Zhu, 2018), biofilme esse que pode ser saudável ou patogênico. Apesar de ser atrelado ao biofilme saudável na boca, o *S. sanguinis* tem sido associado à endocardite infecciosa, o que cria um alerta para a prevenção contra esse microrganismo. Um estudo recente demonstrou que, em termos de infecção sistêmica, o *S. sanguinis* é mais patogênico do que na boca, causa inflamação no tecido aórtico e induz progressão da aterosclerose, o que o tornou uma bactéria de interesse para o nosso estudo (HASHIZUME-TAKIZAWA et al., 2019). As três soluções analisadas nesta pesquisa já tiveram seus efeitos antimicrobianos estudados, porém contra a *S. sanguinis* os trabalhos com a PHMB e  $\text{ClO}_2$  são *in vitro* e escassos (LUNDSTROM et al., 2010; ROHRER et al., 2010; UZER CELIK et al., 2016; WIRTHLIN; CHEN; HOOVER, 2005). Um dos estudos não encontrou efeito antimicrobiano significativo do  $\text{ClO}_2$  contra o *S. sanguinis* (WIRTHLIN; CHEN; HOOVER, 2005) e, em termos de viabilidade de biofilme, nosso estudo demonstrou que o  $\text{ClO}_2$  foi mais efetivo do que a CHX, apesar de não ter apresentado diferença estatística. Em biofilme multiespécie, o  $\text{ClO}_2$  é mais efetivo do que a água destilada contra *S. sanguinis* (LUNDSTROM et al., 2010), assim como demonstramos neste estudo em nosso controle, porém Lundstrom et al. (2010) mostraram que a CHX tem mais efetividade do que o  $\text{ClO}_2$ , resultado que não foi

---

confirmado no presente estudo. Quanto ao PHMB, já foi descrito que há eficácia maior do que a da CHX contra o *S. sanguinis* (ROHRER et al., 2010; UZER CELIK et al., 2016) e, apesar de não encontrarmos diferença estatística entre tais soluções em nosso estudo, em termos de viabilidade de biofilme a PHMB demonstrou ser mais efetiva do que a CHX. Ainda observamos que a PHMB demonstrou viabilidade de biofilme ligeiramente melhor do que a do ClO<sub>2</sub>, porém sem diferença estatística.

Além de estar estreitamente ligados à cárie, os grupos de estreptococos mais comumente isolados de pacientes com endocardite infecciosa continuam sendo *S. sanguinis*, *S. bovis*, *S. mutans* e *S. Mitis*. (MYLONAKIS; CALDERWOOD, 2001), sendo *S. mutans* encontrado em mais de 60% de paredes de aneurismas e colonizando indivíduos com doenças cardiovasculares, doença inflamatória intestinal, câncer colorretal e resultados adversos da gravidez como parto pretermo, pré-eclâmpsia, aborto espontâneo, sepse neonatal, entre outros (HAN; WANG, 2013; NAKANO et al., 2009). Além disso, é um dos microrganismos mais estudados dos últimos 40 anos (HÖFLING et al., 1999) devido ao seu perfil altamente cariogênico. No presente estudo, constatamos que o *S. mutans* foi mais resistente à PHMB e à CHX do que *S. sanguinis* e que a CBM da PHMB foi maior do que a CBM da CHX aplicadas ao *S. mutans*, ao contrário do observado em outros estudos, que demonstraram que a PHMB teve efetividade em concentrações menores ou iguais à CHX (ROHRER et al., 2010; UZER CELIK et al., 2016). Encontramos apenas um estudo *in vitro* que comparou ClO<sub>2</sub> e CHX em biofilme. Tal estudo demonstra que, após 1 minuto da exposição de *S. mutans* ao ClO<sub>2</sub> e à CHX, a CHX mostra-se mais efetiva, porém aos 5 minutos ambas as soluções haviam destruído 100% das bactérias (DRAKE, 2011), ao passo que nós demonstramos que o ClO<sub>2</sub> foi significativamente mais efetivo que a CHX contra *S. mutans*.

A maioria dos microrganismos presentes no canal de um dente infectado é eliminada durante o tratamento endodôntico de forma mecânica, porém o *E. faecalis* tem a capacidade de penetrar nos túbulos dentinários (MOLANDER et al., 1998) e colonizar esses canais em profundidade. Esse microrganismo está fortemente relacionado a lesões endodônticas persistentes, ou seja, quando há o insucesso no primeiro tratamento e quando em presença de periimplantite (FLANAGAN, 2016, 2017; PIRANI et al., 2008). Encontrado em todo o trato gastrintestinal (BARNES et al., 2017) o *Enterococcus* também está ligado a casos de pneumonia nosocomial e

---

bacteremia (LUZZARO et al., 2011; WISPLINGHOFF et al., 2004; ZHANG et al., 2017). Na busca de um agente antimicrobiano que tenha mais capacidade de eliminação, há um estudo que mostra diminuição da contagem de *E. faecalis* na presença de ClO<sub>2</sub> (DRAKE, 2011). Observamos, em nosso estudo que todas as soluções estudadas tiveram eficiência contra esse microrganismo e houve diferença estatisticamente significativa em comparação à água destilada (controle). Em um estudo com biofilme maduro de 3 dias, foi mostrado que a PHMB é uma potente solução contra o *E. faecalis*, gerando diferença estatística em relação à CHX, tendo mais efetividade (MEDVEDEC MIKIĆ et al., 2018). Quando houve comparação entre as três soluções antimicrobianas, nosso estudo não mostrou diferença estatística sobre esta bactéria.

### **6.1 Limitações do estudo**

Devido à turbidez inerente às concentrações mais altas das soluções, a microdiluição em microplacas mostrou-se incapaz de produzir resultados confiáveis. No momento da leitura, o aparelho não pôde diferenciar se a turbidez era devido a maiores concentrações das soluções ou a crescimento bacteriano, portanto sugerimos que esse experimento seja realizado via macrodiluição.

---

---





# **7 CONCLUSÕES**

---

---



## 7 CONCLUSÕES

Todas as soluções possuem efeito antimicrobiano sobre o *S. sanguinis*, o *S. mutans* e o *E. faecalis*. Quando comparado à clorexidina, o dióxido de cloro foi mais efetivo contra *S. mutans*, o que evidencia que este pode ser um antimicrobiano viável para a prática clínica, uma vez que foi a solução mais efetiva contra os microrganismos estudados. Sugerimos que estudos posteriores sejam conduzidos utilizando esse agente.

---

---



# REFERÊNCIAS

---

---



## REFERÊNCIAS

ABUSLEME, L. et al. The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation. **The ISME journal**, v. 7, n. 5, p. 1016–25, maio 2013.

ANDREWS, J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, n. suppl\_1, p. 5–16, jul. 2001.

ANTUNES, H. S. et al. Total and Specific Bacterial Levels in the Apical Root Canal System of Teeth with Post-treatment Apical Periodontitis. **Journal of Endodontics**, v. 41, n. 7, p. 1037–1042, jul. 2015.

ASKITOPOULOU, H. et al. The origins of oral medicine in the Hippocratic collected works. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 46, n. 9, p. 689–694, out. 2017.

BANG, J. et al. Inactivation of Escherichia coli O157: H7 in biofilm on food-contact surfaces by sequential treatments of aqueous chlorine dioxide and drying. **International Journal of Food Microbiology**, v. 191, p. 129–134, 2014.

BARNES, A. M. T. et al. Enterococcus faecalis readily colonizes the entire gastrointestinal tract and forms biofilms in a germ-free mouse model. **Virulence**, v. 8, n. 3, p. 282–296, 3 abr. 2017.

BIJLSMA, M. W. et al. Community-acquired bacterial meningitis in adults in the Netherlands, 2006–14: a prospective cohort study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 3, p. 339–347, mar. 2016.

BUNTHOF, C. J. et al. Flow Cytometric Assessment of Viability of Lactic Acid Bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 5, p. 2326–2335, 1 maio 2001.

BYSTROM, A.; CLAEISSON, R.; SUNDQVIST, G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. **Dental Traumatology**, v. 1, n. 5, p. 170–175, out. 1985.

CARLSSON, J. Growth Of Streptococcus mutans And Streptococcus sanguis in Mixed Culture. **Archives of Oral Biology**, v. 16, p. 963–965, 1971.

---

CHHABRA, R. S. et al. CARCINOGENICITY OF p-CHLOROANILINE IN RATS AND MICE. **Food and Chemical Toxicology**, v. 29, n. 2, p. 119–124, 1991.

CHOY, C. K. M.; CHO, P.; BOOST, M. V. Cytotoxicity and effects on metabolism of contact lens care solutions on human corneal epithelium cells. **Clinical and Experimental Optometry**, v. 95, n. 2, p. 198–206, 2012.

DAROUCHE, R. O. et al. Chlorhexidine–Alcohol versus Povidone–Iodine for Surgical-Site Antisepsis. **New England Journal of Medicine**, v. 362, n. 1, p. 18–26, 7 jan. 2010.

DRAKE, D. An in vitro comparative study determining bactericidal activity of stabilized chlorine dioxide and other oral rinses. **Journal of Clinical Dentistry**, v. 22, n. 1, p. 1–5, 2011.

EBERLEIN, T.; ASSADIAN, O. Clinical use of polihexanide on acute and chronic wounds for antisepsis and decontamination. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 23, n. SUPPL. 1, p. 45–51, 2010.

ELOFF, J. N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Medica**, v. 64, n. 8, p. 711–3, 1998.

ENDO, M. S. et al. Investigation in vivo of *Enterococcus faecalis* in endodontic retreatment by phenotypic and genotypic methods. **Acta Scientiarum. Health Sciences**, v. 37, n. 1, p. 95, 22 jun. 2015.

EROVIC ADEMOVSKI, S.; LINGSTRÖM, P.; RENVERT, S. The effect of different mouth rinse products on intra-oral halitosis. **International Journal of Dental Hygiene**, v. 14, n. 2, p. 117–123, maio 2016.

FLANAGAN, D. Implant placement in failed endodontic sites: A review. **Journal of Oral Implantology**, v. 42, n. 2, p. 224–230, 2016.

FLANAGAN, D. *Enterococcus faecalis* and Dental Implants. **Journal of Oral Implantology**, v. 43, n. 1, p. 8–11, 1 fev. 2017.

GÖHRING, J. et al. Impact of the cosmetic mouthwash “Jack Pro Spülung plus” (“rheodol-Spülung plus”) on the oral cavity flora, tested in a monocentric, controlled, randomized, blind, cross-over comparative study. **GMS hygiene and infection control**, v. 9, n. 1, p. Doc08, 2014.

---

---



- GOMAR-VERCHER, S. et al. Relationship of children's salivary microbiota with their caries status: a pyrosequencing study. **Clinical Oral Investigations**, v. 18, n. 9, p. 2087–2094, 15 dez. 2014.
- HAAS, D. M. et al. Vaginal preparation with antiseptic solution before cesarean section for preventing postoperative infections. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 7, n. 7, p. CD007892, 17 jul. 2018.
- HAN, Y. W.; WANG, X. Mobile Microbiome: Oral Bacteria in Extra-oral Infections and Inflammation. **Journal of Dental Research**, v. 92, n. 6, p. 485–491, 26 jun. 2013.
- HARATI, K. et al. THE USE OF PRONTOSAN® WOUND GEL X IN PARTIAL AND FULL THICKNESS BURNS REQUIRING SPLIT THICKNESS SKIN GRAFTS - AN INTERIM ANALYSIS ( 174 ). **Annals of Burns and Fire Disasters**, v. XXVIII, n. September, p. 2015, 2015.
- HASHIZUME-TAKIZAWA, T. et al. Oral challenge with *Streptococcus sanguinis* induces aortic inflammation and accelerates atherosclerosis in spontaneously hyperlipidemic mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 520, n. 3, p. 507–513, dez. 2019.
- HINTAO, J. et al. The microbiological profiles of saliva, supragingival and subgingival plaque and dental caries in adults with and without type 2 diabetes mellitus. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 22, n. 3, p. 175–181, jun. 2007.
- HÖFLING, J. F. et al. Presença de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* associado a *Streptococcus sobrinus* em escolares de diferentes classes sócio-econômicas e sua relação com a atividade cariogênica dessas populações. **Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo**, v. 13, n. 2, p. 173–180, abr. 1999.
- HUA, F. et al. Oral hygiene care for critically ill patients to prevent ventilator-associated pneumonia. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, 25 out. 2016.
- HURLLOW, J. The benefits of using polyhexamethylene biguanide in wound care. **British Journal of Community Nursing**, v. 22, n. Sup3, p. S16–S18, mar. 2017.
- ILLINGWORTH, C. D.; COOK, S. D. *Acanthamoeba keratitis*. **Survey of ophthalmology**, v. 42, n. 6, p. 493–508, 1998.
- JONES, R. N. et al. **Manual de Microbiologia Clínica**. 4. ed. Buenos Aires: Panamericana, 1987.
- 
-

JOSEPH, B. et al. Is Antimicrobial Photodynamic Therapy Effective as an Adjunct to Scaling and Root Planing in Patients with Chronic Periodontitis? A Systematic Review. **Biomolecules**, v. 7, n. 4, p. 79, 24 nov. 2017.

KELL, D. B. et al. Viability and activity in readily culturable bacteria: a review and discussion of the practical issues. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 73, n. 2, p. 169–87, fev. 1998.

KOLENBRANDER, P. E. et al. Bacterial interactions and successions during plaque development. **Periodontology 2000**, v. 42, n. 1, p. 47–79, out. 2006.

KRAMER, A. et al. Consensus on Wound Antisepsis: Update 2018. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 31, n. 1, p. 28–58, 2018.

KRETH, J. et al. The road less traveled - defining molecular commensalism with *Streptococcus sanguinis*. **Molecular Oral Microbiology**, v. 32, n. 3, p. 181–196, jun. 2017.

LAMONT, R. J.; KOO, H.; HAJISHENGALLIS, G. **The oral microbiota: dynamic communities and host interactions**. [s.l.: s.n.]. v. 16

LANG, N.; BRECX, M. Chlorhexidine digluconate - an agent for chemical plaque control and prevention of gingival inflammation. **Journal of Periodontal Research Supplement**, n. Kornman, p. 74–89, 1986.

LARKIN, D. F. P.; KILVINGTON, S.; DART, J. K. G. Treatment of *Acanthamoeba* Keratitis with Polyhexamethylene Biguanide. **Ophthalmology**, v. 99, n. 2, p. 185–191, 1992.

LINDHE, J. **Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

LOE, H.; RINDOM SCHIOTT, C. The effect of mouthrinses and topical application of chlorhexidine on the development of dental plaque and gingivitis in man. **Journal of Periodontal Research**, v. 5, n. 2, p. 79–83, abr. 1970.

LÓPEZ-MARTÍNEZ, F. et al. Implants failures related to endodontic treatment. An observational retrospective study. **Clinical Oral Implants Research**, v. 26, n. 9, p. 992–995, set. 2015.

LUNDSTROM, J. R. et al. Bactericidal Activity of Stabilized Chlorine Dioxide as an Endodontic Irrigant in a Polymicrobial Biofilm Tooth Model System. **Journal of**

---

---

**Endodontics**, v. 36, n. 11, p. 1874–1878, nov. 2010.

LUZZARO, F. et al. Prevalence and epidemiology of microbial pathogens causing bloodstream infections: results of the OASIS multicenter study. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 69, n. 4, p. 363–369, abr. 2011.

MA, J.-W. et al. Efficacy and Safety Evaluation of a Chlorine Dioxide Solution. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 14, n. 3, p. 329, 22 mar. 2017.

MACALUSO, A.; SIMMANG, C.; ANTHONY, T. Streptococcus sanguis Bacteremia and Colorectal Cancer. **Southern Medical Journal**, v. 91, n. 2, p. 206–207, fev. 1998.

MAIA FILHO, E. M. et al. Efeito antimicrobiano in vitro de diferentes medicações endodônticas e própolis sobre Enterococcus faecalis TT - In vitro antimicrobial effect of different endodontic materials and propolis on Enterococcus faecalis. **Revista Gaúcha de Odontologia**, v. 56, n. 1, p. 21–25, 2008.

MAIYA, A. et al. Use of different oral hygiene strategies in children with cerebral palsy: A comparative study. **Journal of International Society of Preventive and Community Dentistry**, v. 5, n. 5, p. 389, 2015.

MATHARU, R. K.; CIRIC, L.; EDIRISINGHE, M. Nanocomposites: suitable alternatives as antimicrobial agents. **Nanotechnology**, v. 29, n. 28, p. 282001, 13 jul. 2018.

MATHUR, S. et al. Chlorhexidine: The gold standard in chemical plaque control. **National Journal of Physiology, Pharmacy and Pharmacology**, v. 1, n. 2, p. 45–50, 2011.

MCDONNELL, G.; RUSSELL, A. D. Antiseptics and disinfectants: Activity, action, and resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 1, p. 147–179, 1999.

MEDVEDEC MIKIĆ, I. et al. Antimicrobial effectiveness of polyhexamethylene biguanide on Enterococcus faecalis, Staphylococcus epidermidis and Candida albicans. **Medicinski glasnik : official publication of the Medical Association of Zenica-Doboj Canton, Bosnia and Herzegovina**, v. 15, n. 2, p. 132–138, 1 ago. 2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SB Brasil 2010: Pesquisa Nacional de Saúde Bucal: resultados principais / Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. – Brasília. p. 116, 2012.

---

---

MOLANDER, A. et al. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. **International Endodontic Journal**, v. 31, n. 1, p. 1–7, jan. 1998.

MOON, S.-Y. et al. Changing etiology of community-acquired bacterial meningitis in adults: a nationwide multicenter study in Korea. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 29, n. 7, p. 793–800, 1 jul. 2010.

MYLONAKIS, E.; CALDERWOOD, S. B. Infective Endocarditis in Adults. **New England Journal of Medicine**, v. 345, n. 18, p. 1318–1330, nov. 2001.

NAKANO, K. et al. Detection of oral bacteria in cardiovascular specimens. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 24, n. 1, p. 64–68, fev. 2009.

NEEDLEMAN, I.; NIBALI, L.; DI IORIO, A. Professional mechanical plaque removal for prevention of periodontal diseases in adults - systematic review update. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 42, n. S16, p. S12–S35, abr. 2015.

NOEL, J.; TEMPLE, A.; LAYCOCK, G. A case report of anaphylaxis to chlorhexidine during urinary catheterisation. **The Annals of The Royal College of Surgeons of England**, v. 94, n. 4, p. e159–e160, 17 maio 2012.

PIRANI, C. et al. Recovery of *Enterococcus faecalis* in root canal lumen of patients with primary and secondary endodontic lesions. **The new microbiologica**, v. 31, n. 2, p. 235–40, abr. 2008.

RAKIC, M.; GRUSOVIN, M.; CANULLO, L. The Microbiologic Profile Associated with Peri-Implantitis in Humans: A Systematic Review. **The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, p. 359–368, mar. 2016.

RODRIGUES, C. T. et al. Antibacterial properties of silver nanoparticles as a root canal irrigant against *Enterococcus faecalis* biofilm and infected dentinal tubules. **International Endodontic Journal**, v. 51, n. 8, p. 901–911, ago. 2018.

ROHRER, N. et al. Antimicrobial Efficacy of 3 Oral Antiseptics Containing Octenidine, Polyhexamethylene Biguanide, or Citroxx: Can Chlorhexidine Be Replaced? **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 31, n. 7, p. 733–739, 2 jul. 2010.

ROSIN, M. et al. Effect of a polyhexamethylene biguanide mouthrinse on bacterial counts and plaque. **Journal of clinical periodontology**, v. 28, n. 12, p. 1121–1126, 2001.

RUSSEL, A. D.; DAY, M. J. Antibacterial activity of chlorhexidine. **Journal of**

---

---

**Hospital Infection**, v. 25, n. 4, p. 229–238, 1993.

RUSSELL, A. D. Chlorhexidine - Antibacterial Action and Bacterial-Resistance. **Infection**, v. 14, n. 5, p. 212–215, 1986.

SAKKAS, H.; PAPADOPOULOU, C. Antimicrobial Activity of Basil, Oregano, and Thyme Essential Oils. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 3, p. 429–438, 28 mar. 2017.

SAMARANAYAKE, L.; MATSUBARA, V. H. Normal Oral Flora and the Oral Ecosystem. **Dental Clinics of North America**, v. 61, n. 2, p. 199–215, 2017.

SEPTIMUS, E. J. Antimicrobial Resistance: An Antimicrobial/Diagnostic Stewardship and Infection Prevention Approach. **Medical Clinics of North America**, v. 102, n. 5, p. 819–829, 2018.

SERRANO, J. et al. Efficacy of adjunctive anti-plaque chemical agents in managing gingivitis: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 42, n. S16, p. S106–S138, abr. 2015.

STALONS, D. R.; THORNSBERRY, C.; DOWELL JR, V. R. Effect of culture medium and carbon dioxide concentration on growth of anaerobic bacteria commonly encountered in clinical specimens. **Applied microbiology**, v. 27, n. 6, p. 1098–1104, 1974.

TANZER, J. M.; LIVINGSTON, J.; THOMPSON, A. M. The microbiology of primary dental caries in humans. **Journal of dental education**, v. 65, n. 10, p. 1028–37, out. 2001.

THORN, R. M. S.; ROBINSON, G. M.; REYNOLDS, D. M. Comparative antimicrobial activities of aerosolized sodium hypochlorite, chlorine dioxide, and electrochemically activated solutions evaluated using a novel standardized assay. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 5, p. 2216–2225, 2013.

TZANAVARAS, P.; THEMELIS, D.; KIKA, F. Review of analytical methods for the determination of chlorine dioxide. **Open Chemistry**, v. 5, n. 1, p. 1–12, 2007.

UZER CELIK, E. et al. Antimicrobial activity of different disinfectants against cariogenic microorganisms. **Brazilian Oral Research**, v. 30, n. 1, p. e125, 2016.

VITT, A. et al. Antimicrobial activity of polyhexamethylene guanidine phosphate in comparison to chlorhexidine using the quantitative suspension method. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 14, n. 1, p. 1–9, 2015.

---

WALDRON, C. et al. Oral hygiene interventions for people with intellectual disabilities. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 2019, n. 5, 31 maio 2019.

WALTER J. LOESCHE. Role of Streptococcus mutans in Human Dental Decay. **Microbiological Reviews**, v. 50, n. 4, p. 353–380, 1986.

WHILEY, R. A. et al. Streptococcus parasanguis sp. nov., an atypical viridans Streptococcus from human clinical specimens. **FEMS microbiology letters**, v. 56, n. 1–2, p. 115–21, 1 mar. 1990.

WIRTHLIN, M. R.; CHEN, P. K.; HOOVER, C. I. A Laboratory Model Biofilm Fermenter: Design and Initial Trial on a Single Species Biofilm. **Journal of Periodontology**, v. 76, n. 9, p. 1443–1449, set. 2005.

WISPLINGHOFF, H. et al. Nosocomial Bloodstream Infections in US Hospitals: Analysis of 24,179 Cases from a Prospective Nationwide Surveillance Study. **Clinical Infectious Diseases**, v. 39, n. 3, p. 309–317, 1 ago. 2004.

YADAV, S. R.; KINI, V. V.; PADHYE, A. Inhibition of tongue coat and dental plaque formation by stabilized chlorine dioxide Vs chlorhexidine mouthrinse: A randomized, triple blinded. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 9, n. 9, p. ZC69–ZC74, 2015.

YETURU, S. K. et al. Effect of Aloe vera, chlorine dioxide, and chlorhexidine mouth rinses on plaque and gingivitis: A randomized controlled trial. **Journal of Oral Biology and Craniofacial Research**, v. 6, n. 1, p. 55–59, 2016.

ZAURA-ARITE, E.; VAN MARLE, J.; TEN CATE, J. M. Confocal Microscopy Study of Undisturbed and Chlorhexidine-treated Dental Biofilm. **Journal of Dental Research**, v. 80, n. 5, p. 1436–1440, 18 maio 2001.

ZHANG, Y. et al. Incidence, clinical characteristics, and outcomes of nosocomial Enterococcus spp. bloodstream infections in a tertiary-care hospital in Beijing, China: a four-year retrospective study. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 6, n. 1, p. 73, 4 dez. 2017.

ZHANG, Y. et al. Human oral microbiota and its modulation for oral health. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 99, n. January, p. 883–893, mar. 2018.

ZHU, B. et al. Streptococcus sanguinis biofilm formation & interaction with oral pathogens. **Future Microbiology**, v. 13, n. 8, p. 915–932, jun. 2018.

---

---

# APÊNDICE

---

---





## APÊNDICE

**Tabela 4.** Viabilidade de cada campo lido no microscópio confocal de varredura a laser no experimento com *S. sanguinis*

Controle	CHX	PHMB	ClO <sub>2</sub>
62,801	96,076	0,858	3,341
79,307	1,364	60,087	4,644
10,981	88,050	40,453	9,356
69,325	53,692	0,674	18,175
80,038	63,894	45,419	37,014
86,658	33,568	7,019	45,853
57,925	39,875	8,643	53,055
46,551	39,790	47,632	36,892
	1,865	69,324	0,005
	23,525	2,564	36,449
	52,505	26,228	43,719
	95,142	64,149	51,753
	37,717	93,433	48,909
	2,060	86,484	46,261
	72,969	0,377	43,485
	46,137	0,144	41,092

Legenda 1. CHX: Clorexidina; PHMB: Polihexanida; ClO<sub>2</sub>: Dióxido de cloro

**Tabela 5.** Viabilidade de cada campo lido no microscópio confocal de varredura a laser no experimento com *S. mutans*

Controle	CHX	PHMB	ClO <sub>2</sub>
69,088	42,915	0,013	44,924
40,064	58,491	30,384	5,124
56,721	92,445	43,333	3,568
55,426	98,247	43,975	16,513
42,720	37,614	19,462	10,722
33,619	42,351	30,772	32,181
30,450	48,201	24,075	42,383
26,476	44,486	17,858	40,206
	32,636	25,895	0,056
	37,050	18,007	0,082
	38,917	21,630	0,039
	40,546	54,575	0,045
	31,096	17,011	30,520
	32,626	26,379	40,718
	25,739	57,529	24,074
	31,880	31,268	33,446

Legenda 2. CHX: Clorexidina; PHMB: Polihexanida; ClO<sub>2</sub>: Dióxido de cloro

**Tabela 6.** Viabilidade de cada campo lido no microscópio confocal de varredura a laser no experimento com *E. faecalis*

Controle	CHX	PHMB	ClO <sub>2</sub>
85,631	1,631	7,797	15,022
52,447	57,658	61,218	47,033
66,455	58,639	47,087	61,144
86,242	12,761	55,403	15,819
63,013	15,826	45,363	55,248
30,224	52,722	54,086	50,371
47,754	23,573	43,905	40,737
63,127	13,721	66,520	7,295
	6,998	15,974	7,505
	19,308	7,084	16,098
	39,380	43,335	21,403
	19,453	8,628	37,318
	57,459	2,335	20,825
	43,357	0,862	30,421
	14,685	74,256	13,623
	37,270	4,438	24,979

Legenda 3. CHX: Clorexidina; PHMB: Polihexanida; ClO<sub>2</sub>: Dióxido de cloro