MESTRADO EM ODONTOLOGIA

THALITA DIAS SILVA SANTOS

AVALIAÇÃO DA AÇÃO DE ENXAGUATÓRIO BUCAL CONTENDO 0,075% DE CLORETO DE CETILPIRIDÍNIO, ZINCO E FLUORETO EM UMA BASE SEM ÁLCOOL EM BIOFILMES *IN VITRO* COM MÚLTIPLAS ESPÉCIES BACTERIANAS

Guarulhos

2018

THALITA DIAS SILVA SANTOS

AVALIAÇÃO DA AÇÃO DE ENXAGUATÓRIO BUCAL CONTENDO 0,075% DE CLORETO DE CETILPIRIDÍNIO, ZINCO E FLUORETO EM UMA BASE SEM ÁLCOOL EM BIOFILMES *IN VITRO* COM MÚLTIPLAS ESPÉCIES BACTERIANAS

Dissertação apresentada à Universidade Guarulhos
para obtenção do título de Mestre em Odontologia
Área de concentração: Periodontia
Orientadora: Profº. Dra. Magda Feres
Co-orientadora: Profº. Dra. Geisla Soares

Guarulhos

2018

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Biblioteca Fernando Gay da Fonseca

S237a

Santos, Thalita Dias Silva

Avaliação da ação de enxaguatório bucal contendo 0,075% de cloreto de cetilpiridínio zinco e fluoreto em uma base sem álcool em biofilmes in vitro com múltiplas espécies bacterianas. / Thalita Dias Silva Santos. -- 2018.

45f.; 31 cm.

Orientador: Profª. Dr. Magda Feres

Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Centro de Pós-Graduação e Pesquisa e Extensão, Universidade Guarulhos, Guarulhos, SP, 2018.

1. Antimicrobiano 2. Biofilme *in vitro* 3. Cetilpiridínio 4. Microbiologia I Título II. Feres, Magda (Orientadora). III. Universidade Guarulhos

CDD. 617.6

UNIVERITAS
UNIVERSIDADE UNIVERSUS VERITAS

UNG
UNIVERSIDADE

Grupo Ser Educacional — Gente criando o futuro

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de MESTRADO, intitulada "AVALIAÇÃO DA AÇÃO DE ENXAGUATÓRIO BUCAL CONTENDO 0,075% DE CLORETO DE CETILPIRIDÍNIO, ZINCO E FLUORETO EM UMA BASE SEM ÁLCOOL EM BIOFILMES *IN VITRO* COM MÚLTIPLAS ESPÉCIES BACTERIANAS" em sessão pública realizada em 25 de maio de 2018, considerou a candidata THALITA DIAS SILVA SANTOS aprovada.

COMISSÃO EXAMINADORA:

1. Profa. Dra. Magda Feres (UNG)_____

2. Profa. Dra. Elaine Cristina Escobar (USJT)_____

3. Prof. Dr. Bruno Bueno Silva (UNG)_____

Guarulhos, 25 de maio de 2018.

DEDICATÓRIA

A DEUS, TODA HONRA E GLÓRIA SOMENTE A ELE.

AGRADECIMENTOS

Eternamente grata pela misericórdia de Deus em minha vida, pelo fiel cumprimento de sua promessa. Grata porque em meios a tantas provas, não me desamparou. Grata por acrescentar a minha fé e tornar possível o desejo do meu coração.

Aos meus pais, Antônio Luis e Maria Inês por toda dedicação, por me guiarem nos melhores caminhos, por serem os melhores Mestres que Deus poderia me dar.

A minhas irmãs Thamiris e Thandara por toda compreensão e força nesses últimos anos, por compartilhar todo conhecimento e ajuda.

Ao meu noivo, Douglas por toda paciência, pelo incentivo e companheirismo. Por acreditar nos meus sonhos e ser presente em todas minhas conquistas.

A toda minha família que chorou comigo, mas que esteve sempre junto para aplaudir minhas vitórias.

A irmandade, mocidade e crianças pelas orações que foram elevadas ao céu e votos que foram feitos a meu favor, tenho certeza que Deus ouviu cada um.

Não tenho palavras para agradecer a Profº. Dra.Magda Feres, minha orientadora e a Profº. Dra. Geisla Soares, minha co-orientadora. Vocês realmente são incríveis! Muito obrigada pela paciência, confiança depositada em mim e pelos conhecimentos divididos durante esses anos. Por desenvolverem ainda mais o meu amor pela ciência, microbiologia, mas principalmente pela Periodontia.

Ao Profº. Dr. Marcelo Faveri, conhecimento e paciência durante a Iniciação Científica, Graduação e Mestrado. E que venha o Doutorado!

Ao Profº. Drº. Bruno Bueno, por ter disponibilizado seu tempo para me ensinar e desenvolver ainda mais técnicas laboratoriais. Espero que ainda tenha sobrado paciência, para as próximas pesquisas.

A Izilvânia Barreto, pela amizade e todo conhecimento transmitido desde a época da Iniciação Científica. Pode ter a certeza que guardarei com todo zelo essa preciosidade.

Aos Mestres, Doutores e Amigos Poliana Mendes, Josefa Mestnik, Jamil Shibli, Belén Retamal, Vanessa Santos, Gabriela Giro, Marta Bastos,André Reis, Guto,Maurilo, Murilo

Feres, Hélio Doyle, Camila ,Samantha, Stela, Magda e André, cada um deixou sua marca em minha vida.

Aos Professores que fizeram parte da banca examinadora, Profº. Dra. Gabriela Giro, Profº.Dra. Elaine Escobar e Profº. Dr. Bruno Bueno muito obrigada por todas dicas, debates e elogios.

A FAPESP pela realização deste sonho, pelo amparo a esta pesquisa. Sem este auxílio não teria condições de continuar o Mestrado.

Ao Dr. Bernal Stewart, por ter acreditado nesse projeto, e à Colgate Palmolive (Technology Center, Pisacataway, NJ) por ter financiado esse estudo.

A todos que contribuíram e me apoiaram direta ou indiretamente, o meu eterno agradecimento.

Tudo tem o seu tempo determinado.

E há tempo para todo

propósito debaixo do céu.

(Eclesiastes 3:1)

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos antimicrobianos de um enxaguatório bucal contendo 0,075% de cloreto de cetilpiridínio, zinco e fluoreto em uma base sem álcool (CPC+Zn) em um modelo de biofilme *in vitro* com múltiplas espécies bacterianas periodontais. Trinta e duas espécies bacterianas foram selecionadas de acordo com as espécies mais prevalentes na doença periodontal e biofilmes in vitro foram cultivados com o uso do dispositivo de biofilme de Calgari. Os biofilmes foram cultivados durante sete dias e sobre eles foram testadas a ação antimicrobiana da formulação para enxaguatório bucal contendo CPC+Zn, solução de gluconato de clorexidina 0,12% (CLX) e uma solução placebo (H2O). Duas exposições de um minuto cada foram realizadas diariamente com um intervalo de seis horas, por 3 dias. A composição microbiana dos biofilmes foi avaliada usando a técnica *checkerboard DNA-DNA hybridization.* Testes de inibição de metabolismo bacteriano e erradicação dos biofilmes foram realizados. A significância estatística das diferenças entre os grupos foi testada usando o teste de Kruskall Wallis e Dunn ($p<0,05$)e para comparações múltiplas em pares foi empregado o procedimento de Dunn-Sidak em um nível de confiança de 95%. Trinta e uma das 32 espécies incluídas no modelo de biofilme foram recuperadas nos biofilmes cultivados. Com a exposição aos antimicrobianos foi observado menor atividade celular nos biofilmes expostos à solução de CLX 0,12% ($p<0,05$). O composto que melhor mostrou capacidade de erradicação dos biofilme foi a CLX ($p<0.05$) em comparação com os grupos CPC+Zn ($p = 0,002$) e Placebo ($p = 0,044$). Os complexos amarelo e laranja estavam em menores proporções nos biofilmes expostos à CLX e ao CPC+Zn do que nos biofilmes expostos ao placebo ($p<0.05$). Em conclusão, a solução de CPC+Zn e fluoretos também foi efetiva na redução da atividade celular, na inibição do crescimento dos biofilmes cultivados e na alteração da composição desses biofilmes.

Palavras-chave: Antimicrobiano; Biofilme *in vitro*; Cloreto de cetilpiridínio

ABSTRACT

The aim of this study was to test the antimicrobial effects of a mouthwash containing 0.075% cetylpyridinium chloride, zinc and fluoride in an alcohol-free base (CPC + Zn) *in vitro* complex biofilm model with multiple periodontal bacterial species. Thirty-two bacterial species were selected according to the species most prevalent in periodontal disease and in vitro biofilms were cultured using the Calgari biofilm device. The biofilms were cultivated for seven days and the antimicrobial action of the mouthrinse solution containing CPC + Zn, 0.12% chlorhexidine gluconate solution (CLX) and a placebo (H2O) solution were tested on them. Two one-minute exposures were performed daily at a six-hour interval for 3 days. The microbial composition of the biofilms was evaluated using the *checkerboard DNA-DNA hybridization.*Tests of bacterial inhibition metabolism and eradication of biofilms were performed. The statistical significance of the differences between the groups was tested using the Kruskall Wallis and Dunn test ($p < 0.05$) and for multiple paired comparisons the Dunn-Sidak procedure was used at a 95% confidence level. Thirty-one of the 32 species included in the biofilm model were recovered in cultured biofilms. With the exposure to antimicrobials, lower cellular activity was observed in the biofilms exposed to CLX solution0,12% ($p<0,05$).The solution with best biofilm eradication capacity was CLX ($p < 0.05$) compared to the CPC + Zn ($p = 0.002$) and placebo ($p = 0.044$) groups. The yellow and orange complexes were smaller in biofilms exposed to CLX and CPC + Zn than in biofilms exposed to placebo ($p < 0.05$). In conclusion, the solution of CPC + Zn and fluorides was effective in the reduction of cellular activity, inhibition of the growth of biofilms cultured and alteration of the composition of these biofilms.

Key-words: Antimicrobial; *in vitro* biofilm; cetylpyridinium chloride

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura1. Dispositivo de biofilme de Calgari 26

Figura 2. Dispositivo de Calgari montado e armazenado em condições de Anaerobiose 27

Figura 3. Média de contagem das unidades formadoras de colônias $x10^4$ com erro padrão, após exposição aos diferentes antimicrobianos nos diferentes tempos. 31

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1. Lista das bactérias utilizadas neste projeto 25

Tabela 2. Média do percentual de oxido-redução detectado nos grupos após cada dia de exposição 29

Tabela 3. Média da proporção dos complexos microbianos nos três grupos após os períodos de exposição aos antimicrobianos/placebo 30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMX	Amoxicilina
AZM	Azitromicina
BHI	Brain Heart Infusion
CLX	Digluconato de Clorexidina
CPC	Cloreto de Cetilpiridínio
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
F	Fluoreto de Sódio
HNK	Sangue de carneiro, ácido N-acetilmurâmico e Menandioma
K	Vitamina K(menandioma)
MTZ	Metronidazol
NAM	Ácido acetil-murâmico
NaOh	Hidróxido de Sódio
TSA	Tryticase Soy Agar
TTC	Trifeniltetrazólico Cloreto
Tris-Hcl	Trisaminometano hidrocloreto
UFCs	Unidades Formadoras de Colônias
Zn	Zinco

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Por cento
µl	Microlitro
µm	Micrômetros
µg/µl	Micrograma/microlitro
$x10^8$	100000000
$x10^6$	1000000
$x10^4$	10000

SUMÁRIO

	Página
1.INTRODUÇÃO	**16**
1.1. Microbiologia Oral	**17**
1.2.Controle do Biofilme	**18**
1.2.1.Controle Mecânico	18
1.2.2.Controle Químico	19
1.3. Agentes Químicos	**20**
1.3.1.Clorexidina	20
1.3.2.Fluoretos	21
1.3.3.Triclosan	21
1.3.4.Cloreto Cetilpirídinio	22
1.3.5.Zinco	22
1.3.6.Óleos Essenciais	23
1.3.7.Produtos Naturais	23
2. OBJETIVO	**24**
3. METODOLOGIA	**25**
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	**29**
5. RESULTADOS	**29**
6. DISCUSSÃO	**31**
7. CONCLUSÃO	**35**
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	**36**

1. INTRODUÇÃO

As doenças periodontais são infecções mistas causadas por espécies bacterianas organizadas em biofilmes que colonizam as superfícies dentárias. Em diversos países as doenças periodontais superaram a cárie dental como causa principal para a perda dentária em adultos (Petersen,2003). Os custos envolvidos no tratamento dessas infecções e na restauração das sequelas deixadas por elas são estimados em bilhões de dólares (Petersen,2003). No mais, essas infecções apresentam possíveis efeitos sistêmicos, por meio do envolvimento das doenças periodontais na etiologia de doenças cardiovasculares, diabetes e em complicações durante o parto foram propostas recentemente (Bahekar et al., 2007; Mealey et al.,2007; Uppal et al., 2010).

A organização da microbiota subgengival em biofilmes é um desafio para o controle dessas infecções, uma vez que bactérias organizadas em biofilmes apresentam uma resistência elevada a agentes antimicrobianos (Socransky et al.,2002). Biofilmes também são mais protegidos da ação do sistema imune do hospedeiro, quando comparados com bactérias planctônicas (Socransky et al.,2002). Embora o emprego de antibióticos sistêmicos no tratamento dessas infecções tenha demonstrado benefícios clínicos (Feres et al.,2001; Winkel et al., 2001; Carvalho et al., 2004; Matarazzo et al.,2008; Haffajee et al., 2007; Cionca et al., 2009; Silva et al., 2011), a possibilidade de desenvolvimento de resistência bacteriana a essas substâncias justifica a busca por outros agentes antimicrobianos que possam ser usados em longo prazo no controle das doenças periodontais.

O emprego de agentes antimicrobianos para o tratamento e/ou prevenção de doenças periodontais tem que ser validado em estudos clínicos. Porém, a utilização de novas substâncias antimicrobianas em seres humanos deve ser precedido pela demonstração de eficácia dessas substâncias em modelos *in vitro* e teste dos seus possíveis efeitos tóxicos. Devido ao efeito protetor da estrutura dos biofilmes, testes *in vitro* de susceptibilidade a agentes antimicrobianos evoluíram para incluir modelos que mimetizem biofilmes. Porém, uma das limitações desses modelos é que, na sua maioria, eles utilizam uma espécie isolada ou poucas espécies em conjunto (Sissons,1997; Guggenheim et al.,2001; Guggenheim et al., 2009; Sanchez et al., 2011). O biofilme subgengival pode conter uma grande variedade de espécies bacterianas (Socransky et al., 2002), dificultando a reprodução *in vitro* dessas estruturas. Outra limitação dos modelos atuais existentes de biofilmes *in vitro* envolvendo diversas espécies é a baixa

reprodutibilidade dessas estruturas, ou a possiblidade de gerar um número pequeno de réplicas, não permitindo o seu uso sistemático em testes de agentes antimicrobianos (Guggenheim et al., 2001; Sanchez et al., 2011).

1.1.Microbiologia Oral

Com a chegada de técnicas imunológicas e de biologia molecular capazes de detectar espécies bacterianas, foi estabelecido na década de 90 a relação entre os perfis microbianos e as diversas formas de doenças periodontais (Socransky et al. 1988, Socransky et al. 1994). Utilizando a técnica do *Checkerboard DNA-DNA hibridization*, espécies como *Tannerella forsythia* e espiroquetas, se tornaram passíveis de detecção.

Após hipóteses terem sido levantadas ao longo dos anos, sobre o estabelecimento e formação do biofilme na doença periodontal, Socransky e colaboradores (1998) definiram os complexos microbianos associados com saúde e doença periodontal, neste estudo coletaram amostras de biofilme subgengivais em 185 indivíduos (idade média 51 +/- 16 anos) com (n = 160) ou sem periodontite (n = 25).E determinaram a presença e os níveis de 40 espécies em 13.261 amostras, utilizando sondas de DNA genômico completo pela técnica *Checkerboard DNA-DNA hibridization.* Sendo assim, cinco complexos principais foram consistentemente formados. O primeiro complexo, definido como complexo vermelho, consistiu em um grupo de espécies bem relacionadas entre si: *T. forsythia, Porphyromonas gingivalis* e *Treponema denticola*. O segundo, nomeado complexo laranja foi fortemente relacionado com o primeiro e incluiu membros das subespécies *Fusobacterium nucleatum/ periodonticum,* além de *Prevotella intermedia, Prevotella nigrescens* e *Peptostreptococcus micros*. As espécies associadas a este grupo incluíram: *Eubacterium nodatum, Campylobacter rectus, Campylobacter showae, Streptococcus constellatus* e *Campylobacter gracilis*. O terceiro, complexo amarelo, consistiu em *Streptococcus sanguinis, Streptococcus oralis, Strepctococcus mitis, Streptococcus gordonii* e *Streptococcus intermedius*. O quarto complexo, definido verde foi composto de 3 espécies de *Capnocytophaga, Campylobacter concisus, Eikenella corrodens* e *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotipo *a*. E o quinto complexo,nomeado como roxo, consistiu em *Veillonella parvula* e *Actinomyces odontolyticus. A. actinomycetemcomitans serotype b, Selenomonas noxia e Actinomyces naeslundii genospécies 2 (A. Viscosus.).* Sendo que o complexo vermelho relacionou-se de forma

consistente com as medidas clínicas da doença periodontal, particularmente a profundidade de sondagem e o sangramento á sondagem. Em 2002, as espécies *Actinomyces israelli e Actinomyces naeslundii* sorotipos 1 e 2, foram associadas a um grupo a parte (Socransky et al.,2002).

Desde então, diversos estudos têm sido realizados sobre o biofilme supragengival e subgengival, possibilitando ao profissional e ao paciente utilizar terapias capazes de alcançar remoção/desorganização do biofilme de forma adequada, muitas vezes retornando ao estado de saúde oral. E para isso acontecer, mecanismos de controle baseados em dispositivos e substâncias químicas passaram a ser utilizados (Serrano et al., 2015).

1.2.Controle do Biofilme

1.2.1.Controle Mecânico

A boa higiene oral, realizada por meio de escova e fio dental desorganiza e remove o biofilme supragengival, e é um requisito fundamental para se manter uma boa saúde oral (Zanatta et al.,2011). Essas medidas de higiene oral podem prevenir por exemplo, o desenvolvimento de gengivite. Além disso, a higiene oral meticulosa durante longos períodos de tempo pode modificar tanto a quantidade quanto a composição do biofilme subgengival, e evitar perda de inserção periodontal (Van der Weijden et al., 2015).

A raspagem e alisamento radicular é o procedimento mecânico considerado padrão ouro para o tratamento periodontal. Esse procedimento, realizado pelo profissional, remove o biofilme supragengival e leva a uma alteração benéfica na composição do biofilme subgengival. Enquanto a raspagem subgengival leva a uma melhora nos parâmetros clínicos, como ganho na inserção clínica e diminuição da profundidade de sondagem, do sangramento, supuração e do índice de placa (Haffajaee et al.,1997). Muitas vezes essa prática isolada não é capaz de modificar o perfil microbiano associado a doença para um biofilme compatível com saúde (Carvalho et al., 2005; Matarazzo et al.,2008). Com o objetivo de potencializar os efeitos microbiológico e clínicos da raspagem, diversas terapias adjuntas têm sido propostas, como uso de antibióticos locais, sistêmicos e de substâncias químicas encontradas em dentifrícios e enxaguatórios bucais (Jongsman et al., 2015). Além disso, a utilização de

produtos químicos com boa ação antimicrobiana pode ser importante na fase de manutenção periodontal, pois uma boa higiene oral e substâncias efetivas no pós-tratamento periodontal são importantes para evitar a recidiva da doença.

1.2.2.Controle Químico

Apesar do controle mecânico do biofilme ser o principal método utilizado para o controle das doenças bucais pela população em geral, a utilização de dentifrícios e soluções antimicrobianas para bochechos ganham bastante importância quando o assunto é atuar como adjunto para obter saúde oral. Assim o controle químico pode ser associado no alívio de dor em inflamações da mucosa oral como periodontite, aftas, estomatite ou ainda para tratamento da halitose; nas fases pré e pós-cirúrgicas, na manutenção da saúde dos implantes dentários e dentes naturais; para pacientes com dificuldade ou deficiência motora e como tratamento associado ao clareamento dental e xerostomia (Almerich et al.,2005). Ao longo dos anos, as combinações destas terapias foram bastantes pesquisadas, os controles mecânico e químico na higiene bucal mostraram bastante eficiência, justamente porque a maior parte do biofilme é reduzido mecanicamente, deixando para trás apenas um biofilme desorganizado e “fino” que pode ser mais facilmente reduzido por meios químicos (Brecx,1997). Os principais antimicrobianos utilizados para controle do biofilme oral são íons metálicos (ex.: zinco, cobre, estanho), extratos de plantas ou resinas da flora (própolis), fenóis (triclosan), detergentes (ex.: sulfato de sódio e lauril), óleos essenciais (ex.: timol, eucaliptol), compostos quaternários de amônia (ex.: cloreto de cetilpiridínio (CPC) e digluconato de clorexidina (CLX). Esses produtos também podem conter outros ingredientes, como água, agentes aromatizantes, sulfactantes, flavorizantes, corantes, conservantes, espessantes e álcool, que têm o objetivo de conservar e solubilizar as substâncias principais, mantendo a sua biodisponibilidade.

Alguns fatores devem ser levados em consideração na eleição de uma substância antimicrobiana, por exemplo permeabilidade e substantividade, ou seja, deverá penetrar e ser capaz de ficar retida no local onde irá atuar (mucosa oral ou superfície dental) e ser liberada aos poucos, evitando a neutralização rápida pela própria saliva. A substância ainda deve ter capacidade de inibir bactérias orais, especialmente patógenos, deve ter baixa toxicidade e não provocar efeitos colaterais graves (Surbhi et al.,2011).

Os antimicrobianos orais podem ser utilizados tendo a base de géis, dentifrícios ou colutórios (Loe & Schiott, 1970; Schiott, 1973; Jones,1997; Faveri et al., 2006; Feres et al.,2009). Os dentifrícios são geralmente utilizados em combinação com a escovação dental com o propósito de facilitar a remoção do biofilme (Lindhe et al.,2008). Os bochechos orais têm sido testados para uso diário com o objetivo de melhorar a higiene oral (Wu et al.,2002). Mais recentemente tem sido proposto a combinação de diferentes substâncias para potencializar os seus efeitos antimicrobianos (Lang et al.,2007).

1.3. Agentes Químicos

1.3.1. Clorexidina (CLX)

A CLX é considerada o antimicrobiano “padrão-ouro”, e tem sido a principal escolha para o controle do biofilme supragengival, por possuir um amplo espectro de ação e alta substantividade (Feres et al.,2010). As suas moléculas são absorvidas na superfície do esmalte, inibindo a adesão bacteriana. A CLX é formada por dois anéis clorofenólicos e dois grupos bis-biguanida, ligados igualmente por cadeias de hexametilênica (Sakaue et al.,2018). A penetração deste agente ao meio citoplasmático favorece o rompimento da membrana celular e por consequência o extravasamento das estruturas celulares do microrganismo (Kocak et al.,2009). Quando a CLX é utilizada por longos períodos, podem ser observados alguns efeitos colaterais, como manchamento nas mucosas, dentes, restaurações, além da perda do paladar ou sensação de queimação das mucosas orais. Alguns pacientes não podem fazer o uso da CLX por serem alérgicos ou intolerantes a esse medicamento (McGoy et al.,2008).

Estudos recentes sugerem a substituição do controle de placa profissional semanal pelo bochecho diário com digluconato de clorexidina, com um objetivo adjunto ao tratamento periodontal (Faveri et al. 2009, Feres et al. 2009). Outro estudo, de Soares e colaboradores (2014), avaliou o efeito da CLX, em combinação com metronidazol (MTZ) e amoxicilina (AMX) sistêmicos no tratamento periodontal, e observou que o perfil microbiológico mais compatível com saúde foi obtido quando a raspagem e alisamento radicular foi associada ao MTZ+CLX, MTZ+AMX e principalmente, ao MTZ+AMX+CLX.

1.3.2.Fluoretos

Os efeitos do flúor sobre as bactérias orais são bem conhecidos. Existem fortes evidências sobre o efeito protetor deste íon em relação ao desenvolvimento de cáries dentais. O flúor possui rápida deposição na superfície dental, promove um pH mais neutro na cavidade bucal, e altera a produção de polissacarídeos extracelulares insolúveis, reduzindo a aderência bacteriana e permitindo a remineralização do esmalte dental (Hanning et al.,2013). Os fluoretos podem ser formulados tendo como base de sódio, estanho ou amina (Ganss et al.,2008)

O fluoreto de amina, por exemplo, forma uma camada homogênea na superfície do dente e não é removido pela saliva. O fluoreto de amina quando exposto a amostras de biofilmes de pacientes com periodontite crônica inibiram o crescimento de todas as bactérias cultiváveis (Van Der Mei et al.,2007). As cepas Gram positivas foram mais sensíveis do que os organismos Gram negativos. O flúor leva a uma redução na espessura do biofilme porque existe uma interação eletrostática entre o flúor que é catiônico e a superfície bacteriana carregada negativamente. Essa interação é importante para a redução da formação do biofilme (Priya et al.,2015). Enxaguantes que possuem o fluoreto de amina e o estanhoso têm uma boa ação bactericida.

Avalições recentes demonstraram que os fluoretos desempenham um efeito anti-placa, porém, a longo prazo a sua estabilidade pode ser comprometida podendo causar manchamento dental (Kensche et al.,2017).

1.3.3.Triclosan

O triclosan é um agente antibacteriano de amplo espectro e possui baixa toxicidade. Essa substância pertence ao grupo dos fenoxifenóis policlorados e também é utilizada como conservante de cosméticos (Adolfsson-Erici et al.,2002). O triclosan não leva a efeitos colaterais, possui baixa substantividade e rápida liberação. No entanto, não há evidências claras sobre a eficácia antimicrobiana de produtos contendo somente o triclosan, tanto para o controle de cáries quanto do biofilme oral (Riley et al.,2013). O triclosan é utilizado principalmente em associação a outras substâncias, como o gantrez (ácido polivinilmetil éter maleico), para facilitar sua absorção e retenção ao esmalte, células e epitélio oral (Ciancio,2007).

A inflamação gengival precursora da perda de tecidos periodontais, pode ser reduzida ao utilizar o triclosan (Sreenivasan et al.,2011). Recentes preocupações foram levantadas sobre os possíveis efeitos de bioacumulação do triclosan no meio ambiente que podem afetar vários organismos, especialmente algas e recursos aquáticos. Porém, esse efeito danoso nunca ficou provado. Além disso, foi levantada a possibilidade de desenvolvimento de resistência bacteriana após a exposição ao triclosan (Yueh et al.,2016).

1.3.4.Cloreto de Cetilpiridínio (CPC)

O CPC causa aumento da permeabilidade da célula bacteriana, facilitando a lise da parede celular e levando a morte do microrganismo (Pitten & Kramer,2001). O CPC possui amplo espectro antimicrobiano e tem efeito bactericida em patógenos Gram positivos e fungos (Pitten et al.,2001). Considerado um agente químico alternativo, já que têm uma boa atividade antimicrobiana, o CPC leva a menos efeitos colaterais do que a CLX (Quisno & Foster,1946). Em diversas situações clínicas, o CPC pode ser utilizado como bochecho bucal pré-procedimento odontológico (Feres et al.,2010), como adjunto ao tratamento periodontal mecânico (Costa et al. 2013) no tratamento da halitose (Mendes et al. 2016) e de infecções da orofaringe (Pitten & Kramer,2001), além de possuir propriedade anti-cariogênicas (Pandit et al.,2015). Quando usado em concentrações mais altas, o CPC pode provocar pigmentação dos dentes e sensação de ardência. O CPC ainda possui fácil aderência ao epitélio oral, porém com substantividade inferior a CLX.

Quando comparada a efetividade de uma solução contendo 0,05% CPC e outra contendo 0,12% CLX foi observado a efetividade do CPC na redução de bactérias viáveis dos aerossóis e menor proporção de bactérias patogênicas do complexo laranja (Socransky et al.,1998). Também foi observado uma boa ação antimicrobiana do CPC em voluntários que fizeram bochechos com CPC antes do realizar profilaxia com ultrassom, revelando ser tão efetivo quanto aos que fizeram bochecho com CLX (Retamal-Valdes et al.,2017).

1.3.5.Zinco

O zinco tem efeito bacteriostático e anti-inflamatório. Quando associado a outras substâncias como o triclosan ou CPC, o Zinco tem efeito sinérgico. Mostrou

também ter efeito anti-bacteriano contra *S. mutans, P. gingivalis e P. intermedia* (Netuveli et al.,2004). Lynch e colaboradores (2011) observaram que o Zn mantem a porosidade da zona de superfície dental, permitindo assim uma melhor difusão dos íons minerais e, consequentemente, aumentando a remineralização. Saxton e colaboradores (1988) sugeriram que o zinco tem um efeito sobre o crescimento bacteriano, assim sendo capaz de reduzir a taxa de proliferação bacteriana residual na superfície dental. Um outro importante efeito do Zn quando associado a outras substâncias é a inibição do metabolismo da glicose pelo *S. mutans, S. sanguinis e A.naeslundii*. (Sreenivasan et al.,2009).

1.3.6.Óleos Essenciais

Os óleos essenciais têm em suas formulações menos ingredientes ativos e por consequência menos efeitos adversos do que outros antimicrobianos. Os principais compostos de óleo são extraídos do mentol, eucaliptol, timol e metil salicilato e para manter estes compostos fenólicos, é necessário o acréscimo de 27% de etanol. Foi proposto que a utilização de bochecho com óleos essenciais duas vezes ao dia durante 30 segundos diminui as bactérias nocivas em 99,9% mesmo em locais difíceis para escova dental alcançar (Vlachojannis et al.,2016).

Um dos primeiros estudos avaliando o uso do óleo essencial como enxaguatório foi realizado em dez pacientes por Fornell e colaboradores (1975). Os autores descreveram que o uso diário de óleos essenciais teve efeito na inibição do biofilme e na redução da inflamação gengival, e que levavam também a uma melhor cicatrização pós-cirúrgica. Na cirurgia periodontal por exemplo, esta substância pode interferir sobre o acúmulo de biofilme, e melhorar também o processo de cicatrização (Jackson,1997).

1.3.7.Produtos Naturais

Ao longo dos anos, os produtos naturais, chamados agentes terapêuticos alternativos, têm sido introduzidos e cada vez mais aceitos pela população (Jain et al., 2016). Um destes produtos, a própolis, uma substância retirada das colméias de abelhas, na forma de resina, que possui funções antimicrobiana, anti-inflamatória e anti-fúngicas (Fuliang et al. 2005). A própolis vermelha brasileira tem sido largamente estudada por ser 100% natural, não possuir efeitos adversos, ter propriedade antimicrobiana contra *S. mutans, S. sobrinus, S. aureus e A. naeslundii*, além de apresentar boa capacidade anti-

inflamatória (Bueno-Silva, 2013). Essas características tem colocado a própolis vermelha como uma substância promissora na a indústria farmacêutica e alimentar.

2. OBJETIVO

O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos antimicrobianos de um enxaguatório bucal contendo 0,075% de cloreto de cetilpiridínio, zinco e fluoreto em um modelo de biofilme *in vitro* composto por múltiplas espécies bacterianas.

3. METODOLOGIA

3.1. Estabelecimento do modelo de biofilme *in vitro* com múltiplas espécies periodontais.

As espécies bacterianas periodontais utilizadas nesse projeto (Tabela 1) fazem parte das 40 espécies descritas em Soares et al. (2015). A escolha das espécies para o modelo *in vitro* de biofilme foi baseada em conhecimentos sobre a composição de biofilmes subgengivais a partir da análise de amostras *in vivo*. A maioria delas, como *Actinomyces ssp, Streptococcus ssp e Fusobacterium ssp,* foi cultivada em placas de Agar com 5% de sangue de carneiro (SB). Algumas espécies exigem condições mais específicas para crescimento, como *P. gingivalis*foi cultivada em meio enriquecido com 1% de hemina e 5% vitamina K; *T. forsythia*com 1% de hemina , 5% vitamina K e mais 1% de ácido N-acetilmuramico; e *Eubacterium subsp*. foram cultivados em fastidious anaerobe Agar com 5% SB.

Tabela 1: Lista das bactérias utilizadas neste projeto

Espécie	ATTC	Espécie	ATTC
Aggregatibacter actinomycetemcomitans b	29523	Fusobacterium nucleatum ss polymorphum	10953
Eikenella corrodens	23834	Fusobacterium nucleatum ss vincenti	49256
Veillonella parvula	10790	Fusobacterium periodonticum	33693
Eubacterium saburreum	33271	Actinomyces gerencseriae	23860
Eubacterium nodatum	33099	Actinomyces israellii	12102
Gemella morbillorum	27824	Actinomyces naeslundii I	12104
Prevotella denticola	35038	Actinomyces naeslundii II (oris)	43146
Parvimonas micra	33270	Actinomyces odontolyticus	17929
Porphyromonas gingivalis	33277	Selenomonas noxia	43541
Prevotella intermedia	25611	Tannerella forsythia	43037 (338)
Propionibacterium acnes I	11827	Capnocytophaga gingivalis	33624 (27)
Streptococcus mutans	25175	Capnocytophaga ochracea	33596 (25)
Streptococcus anginosus	33397	Capnocytophaga sputigena	33612 (4)
Streptococcus constellatus	27823 (M32b)	Streptococcus oralis	35037
Streptococcus gordonii	10558	Streptococcus sanguinis	10556
Streptococcus intermedius	27335	Campylobacter gracilis	33236 (1084)

O protocolo utilizando o dispositivo de biofilme de Calgari (DBC) (Figura 1), descrito em Soares et al. (2015), foi utilizado para a preparação dos biofilmes. Após 48 horas de crescimento nas placas de Ágar todas as espécies foram transferidas para tubos contendo caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) complementado com 1% de hemina. Após 24 horas, a densidade óptica da suspensão de cada espécie foi medida e a concentração ajustada para 10^8 células por ml, então 100µl, contendo 10^7 células de cada espécie, foram adicionadas a um inóculo que foi utilizado para a formação dos biofilmes. Uma vez preparado, o inóculo foi dispensado em placas de poliestireno de 96 poços (NUNC-TM), em cada poço foram adicionados 150µl do inóculo, contendo 10^5 células de cada uma das 32 espécies. Então o dispositivo foi fechado com a tampa contendo pinos (Nunc TSP system; Thermo Scientific, Roskilde, Denmark) onde os biofilmes serão formados, colocado em condição de anaerobiose com uso do sistema BD GasPak EZ (Bec- ton Dickinson, Sparks, MD), e armazenado em estufa à 37°C. Após 72 horas, a tampa contendo os pinos foi transferida para outra placa contendo meio de cultura fresco (BHI com 1% de hemina e 5% de sangue de ovelha) (Figura 2). Esse procedimento foi repetido após 48 horas (sexto dia) e então no sétimo dia de formação dos biofilmes os testes antimicrobianos foram iniciados.

Tampa com 96 pinos Placa com 96 poços Dispositivo montado

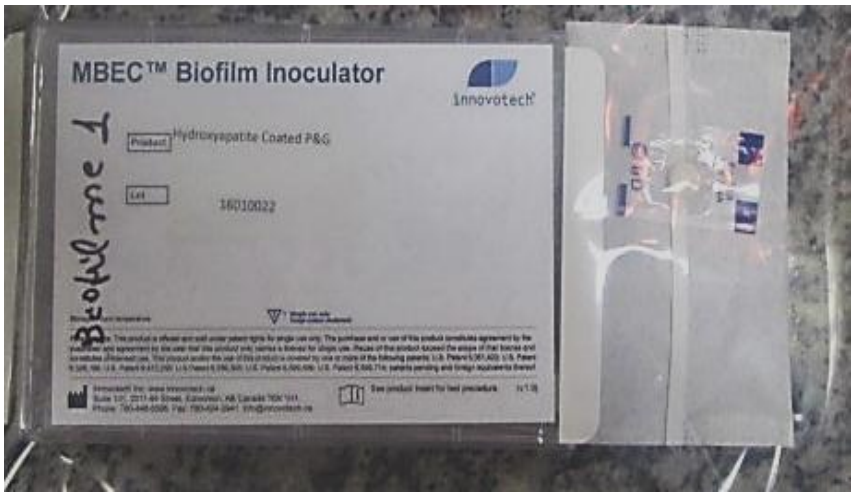
Figura 1. Dispositivo de biofilme de Calgari

3.2.Exposição ao cloreto de cetilpiridíneo 0,075% + Zinco e fluoretos

A cinética bactericida ou bacteriostática do cloreto de cetilpiridíneo 0,075% + Zn e fluoretos (CPC) foi testada durante três dias. Os 88 pinos remanescentes na placa foram expostos à solução de CPC, e aos controles negativos e positivos, soluções placebo (H2O destilada e autoclavada) e gluconato de clorexidina 0,12% (CLX),

respectivamente. Para a exposição os pinos foram lavados duas vezes em 200ul de solução salina de fosfato 1% (PBS) e transferidos para uma placa contendo as soluções por dois períodos de um minuto cada um, com um intervalo de 6 horas entre eles, simulando o uso de um enxaguatório utilizado 2 vezes ao dia. Diariamente após o término da segunda exposição biofilmes foram removidos para análise. Cada condição foi testada em quadriplicata. Desta forma,foi testado o tempo de exposição necessário para se obter o efeito antimicrobiano do cloreto de cetilpiridínio associado a zinco e fluoreto. O tempo de incubação foi selecionado com base nos experimentos *time-kill* utilizando bactérias planctônicas e biofilmes. (LiPuma, 2009, Lee et al. 2010).

Figura 2. DBC montado e armazenado em condição de anaerobiose



3.3.Capacidade inibitória de formação dos biofilmes

O teste para avaliar a atividade celular dos biofilmes foi realizado com 2,3,5-trifeniltetrazólio cloreto (TTC)(catalog no. 17779; Fluka Analytical) e espectrofotometria. O TTC é reduzido a um formazan vermelho pela atividade metabólica de bactérias. Para esta análise, pós-exposição aos antimicrobianos a cada dia 4 pinos, com os biofilmes, de cada condição testada, foram removidos da tampa com auxílio de um fórceps18, lavados 2 vezes em PBS 1% e transferidos para uma placa contendo 200µl de meio BHI fresco contendo 1% de hemina e 10% de solução 1% de TTC. O conjunto então foi encubado a 37°C por 24 horas para posterior leitura da atividade celular. Para a leitura os pinos contendo os biofilmes foram removidos da solução de TTC e a conversão do TCC foi lida a 485 nanômetros usando

espectrofotômetro (Epoch -Software Gen5). Um precipitado vermelho indica a presença de metabolismo bacteriano. Portanto, agentes antimicrobianos eficazes podem ser rapidamente identificados pela falta de um precipitado.

3.4. Composição dos biofilmes formados

A composição bacteriana dos biofilmes formados foi avaliada antes da exposição aos antimicrobianos e após cada dia de teste. Inicialmente pinos cobertos pelos biofilmes da primeira coluna do DBC, foram removidos do dispositivo antes da exposição aos antimicrobianos para avaliação da composição inicial dos biofilmes. Após cada dia os pinos incubados para o teste TCC eram transferidos para análise de composição bacteriana dos biofilmes. Para tanto os pinos foram lavados duas vezes em solução salina de fosfato 1% (PBS) e transferidos para tubos tipo Eppendorf contendo 150 µl de tampão TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 7,6).Foram adicionados 100 µl de solução 0,5 M de hidróxido de sódio (NaOH) em cada tubo e fervidos em banho-maria por 10 minutos e, em seguida, os pinos foram descartados e as soluções contendo os DNAs bacterianos foram armazenas em freezer -20°C, onde permaneceram até a análise pela técnica do C*heckerboard DNA-DNA hybridization*. A composição de cada biofilme formado foi avaliada com base na contagem total de DNA e proporção de cada espécie bacteriana analisada (Socransky et al 1994, 2004).

3.5.Capacidade de redução dos biofilmes

Após a exposição às soluções antimicrobianas, os pinos contendo os biofilmes foram removidos da placa, lavados duas vezes em solução 1% PBS e transferidos para um tubo tipo Eppendorf contendo100µl de do meio de cultura fresco (BHI+hemina) e dispersos por sonicagem. Em seguida as soluções contendo os biofilmes dispersos foram diluídas em série e plaqueadas em placa de Ágar tipo HNK (placas suplementadas com hemina, NAN e vitamina K) e incubadas em condições anaeróbicas durante 7 dias. O teste indica a capacidade do composto de matar as espécies presentes no biofilme e o tempo necessário para que isso ocorra. A capacidade de erradicação de biofilme foi registrada de acordo com a quantidade de unidades formadoras de colônias bacterianas (UFC) presentes em cada placa. O total de UFC das amostras de biofilme antes e após a exposição aos antimicrobianos foram utilizados para calcular o percentual de erradicação do biofilme.

4.ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram apresentados os resultados através de estatística descritiva das análises utilizando a média percentual e o desvio padrão. Análise da capacidade inibitória e da capacidade de erradicação dos biofilmes foram avaliadas com método para as comparações múltiplas em pares e foi empregado o procedimento de Dunn-Sidak em um nível de confiança de 95% através do programa estatístico IBM® SPSS® Statistics, versão 22 para Windows®. A média da proporção dos complexos microbianos foi comparada entre os grupos através dos testes Kruskall Wallis e Dunn.

5. RESULTADOS

5.1.Capacidade Inibitória

A atividade celular bacteriana e a capacidade inibitória de cada solução testada foi avaliada no início e após cada dia de procedimento pelo percentual de oxido-redução do TTC detectado em cada situação testada. A média da atividade celular dos biofilmes controles foi definido com 100% de atividade celular. No total, quatro biofilmes foram avaliados após dois tempos de exposição de um minuto cada um, durante três dias consecutivos. Após o primeiro e terceiro dia de exposição aos antimicrobianos foi observado menor atividade celular nos biofilmes expostos à solução de CLX 0,12% ($p<0,05$). Embora sem diferença estatisticamente significantes, após o primeiro dia de exposição a solução de CPC+Zn também reduziu consideravelmente a atividade celular dos biofilmes testados. (Tabela 2).

Tabela 2. Percentual médio e desvio padrão da oxido-redução detectados nos grupos após cada dia de exposição

	CLX			Placebo			CPC+Zn		
	%		DP	%		DP	%		DP
Dia 1*	10.4^{a}	±	7.4	56.5^{b}	±	9.4	19.2^{b}	±	14.8
Dia 2	193.3	±	118.6	96.5	±	31.8	141.1	±	23.1
Dia 3	53.5^{a}	±	55.0	202.0^{b}	±	57.6	202.3^{b}	±	67.8

Valores na mesma linha seguidos de letras distintas indicam diferença significativa entre os tratamentos através do método de comparação múltipla Sidak ($p<0,05$). * Indica diferença significativa nos valores mensurados ao longo do experimento citados na tabela. CLX: gluconato de clorexidina 0,12%; CPC+Zn: cloreto de cetilpiridínio + zinco + fluoretos; DP: desvio padrão.

5.2.Composição dos biofilmes formados

A composição dos biofilmes foi determinada pela técnica do *Checkerboard DNA-DNA hybridization*. Ao final dos dez dias de crescimento dos biofilmes apenas a espécie bacteriana *Fusobacterium nucleatum polymorphum* não foi estabelecida.

A detecção das espécies bacterianas presentes nos biofilmes após a exposição aos compostos demonstrou que os biofilmes expostos ao placebo foram os biofilmes com maior média de contagem de celular (266,6 x 10^5), seguidos pelos biofilmes expostos à CLX (57,75 x 10^5) e ao CPC+Zn (53 x 10^5), porém sem diferença estatística entre os dois últimos. Quando as proporções dos complexos bacterianos (Socransky et al.,2002) foram comparados, observou-se que os biofilmes expostos ao CPC e à CLX tiveram menor proporção de espécies dos complexos amarelo e laranja, em comparação ao grupo placebo. Não houve diferença entre os grupos em relação aos outros complexos (Tabela 3).

Tabela3. Média da proporção dos complexos microbianos (Socransky et al.,1998) nos três grupos após os períodos de exposiçãoaos antimicrobianos / placebo (quantidade x 10^4± SD)

Complexos	Placebo	CPC+Zn	CLX	p
Actinomyces	0.9 ± 0.8	2.2 ± 6.3	0.8 ± 1.0	*0.2015*
Roxo	50.6 ± 53.3	23.1 ± 32.9	14.2 ± 4.9	*0.3504*
Amarelo	8.8 ± 14.8 [a]	0.8 ± 0.3 [b]	1.0 ±1.6 [b]	*<.0001*
Verde	0.8 ± 0.3	1.2 ± 1.9	1.0 ± 1.9	*0.3293*
Laranja	6.9 ± 14 [a]	4.3 ± 8.7 [b]	2.4 ± 5.4 [b]	*0.0185*
Vermelho	0.7 ± 0.5	0.6 ± 0.4	0.3 ± 0.4	*0.2254*
Outros	8.2 ± 16.7	0.8 ± 0.7	1.4 ± 2.9	*0.0632*

Letras diferentes representam diferenças significativas entre os grupos (testes Kruskall Wallis e Dunn) CPC+Zn: cloreto de cetilpiridínio + zinco + fluoretos, CLX: gluconato de clorexidina 0,12%.

5.3.Capacidade de redução bacteriana

Após sete dias de cultivo em anaerobiose as UFC que cresceram nas placas de Ágar foram contadas. No total 4 biofilmes expostos aos diferentes antimicrobianos foram diluídos em série para cultivo. Os biofilmes iniciais, antes da exposição aos compostos testados, apresentaram em média 16,75x10^4 UFCs. Após o primeiro dia de exposição aos compostos ocorreu um decréscimo do número de colônias formadas, os

biofilmes que tiveram maior crescimento foram os expostos ao placebo, seguidos dos expostos à CLX e CPC+Zn. Números significativamente menores de UFCs foi observado no dia 2 nos dois grupos teste em comparação com o grupo placebo ($p<0.05$). Após o último dia de exposição o composto que mais inibiu a formação de biofilme foi o CPC+Zn ($p<0.05$) em comparação com os grupos CLX e Placebo (Figura 3).

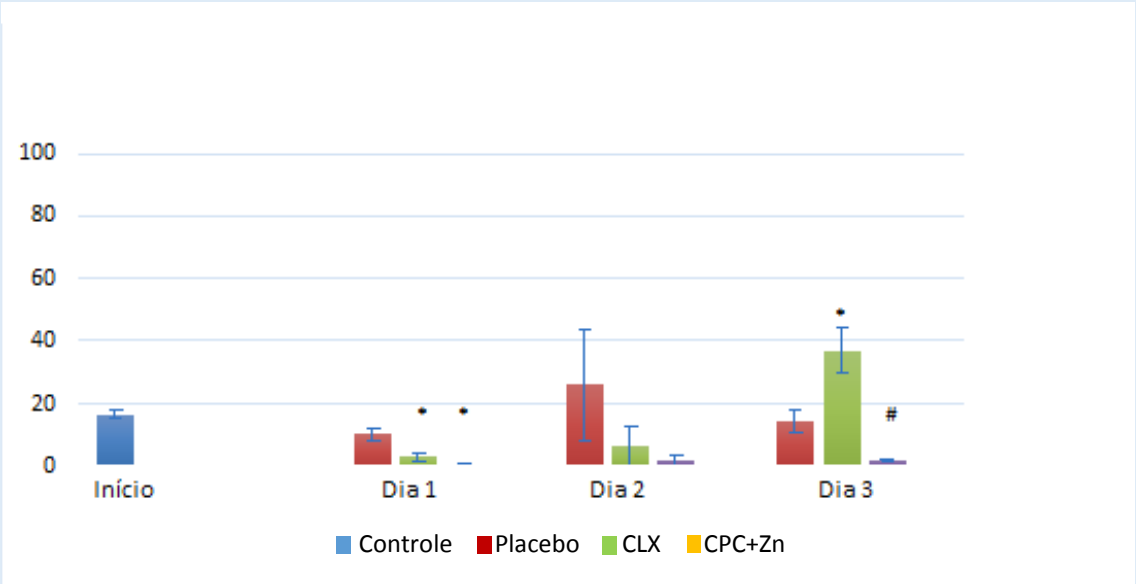


Figura 3. Média de contagem das unidades formadoras de colônias $x10^4$ com erro padrão, após exposição aos diferentes antimicrobianos nos diferentes tempos. Foram observadas as diferenças significativas (Dunn-Sidak $p<0,05$) entre os seguintes grupos: dia 1: placebo vs CPC+Zn, placebo vs CLX; dia 3: placebo vs CPC+Zn, placebo vs CLX, e CPC+Zn vs CLX. CLX: gluconato de clorexidina 0,12%, CPC+Zn: cloreto de cetilpiridínio + zinco + fluoretos.

6. DISCUSSÃO

A capacidade de inibição do biofilme e de erradicação bacteriana de soluções de CLX e CPC+Zn foram testadas em biofilmes multi-espécies mistos com 7 à 10 dias de desenvolvimento. Os dados do presente estudo mostraram que tanto a solução de CLX quanto o CPC+Zn foram capazes de reduzir a atividade celular dos biofilmes, principalmente após o primeiro dia de exposição (Tabela 2). Quando comparadas as proporções dos complexos bacterianos (Socransky et al., 1998) nos biofilmes após

terem sido expostos às soluções antimicrobianas, os complexos amarelo e laranja estavam significativamente mais reduzidos nos biofilmes expostos à CLX e ao CPC+Zn do que nos biofilmes expostos a solução placebo ($p<0.05$) (Tablea 3).Já em relação à capacidade de redução bacteriana, o CPC+Zn resultou em menor contagem de colônias após os três dias de exposição, seguida pelo CLX e placebo(Figura 3).

Os dados gerados nesse estudo mostraram que a solução de CPC+Zn teve efeito similar ao da CLX na quantidade do biofilme exposto a essas substâncias é inédito e clinicamente relevante. A CLX a 0,12% é considerada o padrão ouro para controle químico do biofilme oral, além de ter sido demonstrado que sua ação no controle do biofilme supragengival também beneficia o ambiente subgengival, favorecendo uma re-colonização microbiana compatível com saúde (Faveri et al.,2009; Feres et al.,2009; Soares et al.,2014). No entanto, efeitos adversos associados ao uso da CLX, como manchamento dos dentes e alteração do paladar contra indicam o seu uso contínuo. Dessa forma, é importante buscar outras substâncias que possam favorecer uma microbiota oral compatível com saúde e contribuir para controle e prevenção de doenças periodontais continua, porém com menos efeitos colaterais. Os dados desse estudo mostram que a solução de CPC+Zn pode funcionar como uma boa alternativa à CLX, uma vez que mostrou boa ação antibacteriana e normalmente está associada com poucos efeitos colaterais.

Em concordância com os dados do presente estudo, anteriormente já havia sido demonstrada a efetividade do CPC em controlar a formação do biofilme eda gengivite (Costa et al., 2013; Pandit et al., 2015). Um estudo clínico recente também mostrou que o CPC+Zn foi mais efetivo do que o CPC sem zinco em reduzir acúmulo de biofilme oral e gengivite (Rosing et al.,2017). Além disso, Kang e colaboradores (2015) mostraram que o CPC ou o CPC+Zn foram efetivos no controle de sete espécies bacterianas envolvidas com a etiopatogênese da halitose, cárie dental, periodontite e peri-implantite: *Staphylococcus aureus, Streptococcus mutans, Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia, Fusobacterium nucleatum, Treponema denticola e Tannerella forsythia.*

Estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa demostraram que bochechos pré-profilaxia dentária com ultra-som com enxaguatórios contendo CPC (Feres et al.,2010) ou CPC+Zn (Retamal-Valdes, 2017) foram tão efetivos quanto a CLX na redução de bactérias viáveis em aerossóis orais. Uma vantagem adicional do CPC em comparação

com a CHX é o seu baixo custo (Slots et al.,2012) e a menor chance de intolerância do paciente a esse produto (Keni et al.,2012)

Algumas limitações das metodologias utilizadas nesse estudo podem ser detectadas. Parte do precipitado gerado pelo teste TCC ficou aderido ao biofilme e não pode ser lido no espectrofotômetro. A ação da CLX e do CPC+Zn após os segundo e terceiro dias de exposição não foi cumulativa como esperada, diferentemente do demostrado por Soares e colaboradores (2015), quando a ação da CLX sobre os biofilmes após 36h de exposição reduziu cerca de 95% da atividade celular. Esse fato pode ser devido à lavagem dos biofilmes com PBS 1% que foi feita após cada exposição, que pode ter reduzido a quantidade de substância adsorvida aos biofilmes diminuindo, portanto, a substantividade esperada.

Um importante diferencial do presente estudo foi o modelo experimental utilizado. O estabelecimento de modelos de biofilme *in vitro* que mimetizam biofilmes *in vivo* é um grande desafio para estudos sobre a fisiologia/patogênese de doenças causadas por espécies organizadas em uma estrutura de biofilme (Socransky & Haffajee, 2002). Embora muitos avanços tenham sido alcançados em estudos com espécies individuais, o entendimento do comportamento de múltiplas espécies co-existindo em um ambiente controlado é fundamental para estabelecimento de estratégias de prevenção, diagnóstico, tratamento e prognóstico de processos infecciosos (Palmer et al.,2014). Limitações de modelo de biofilmes pouco reprodutíveis ou com poucas espécies incluídas (Sissons,1997; Guggenheim et al.,2001; Guggenheim et al.,2009, Sanchez et al.,2011) vem sendo observadas, e modelos *ex vivo* têm sido usados com o intuito de se obter uma coleção de espécies já organizada para o ambiente *in vitro*. No entanto, modelos *ex vivo* também não são sempre reprodutíveis, visto que variando o doador, a composição do biofilme também variará (Voos et al., 2014; Prada-López et al.,2015). Dessa forma, um modelo *in vitro* como o utilizado no presente estudo, composto por 31 espécies bacterianas e quantidades celulares previamente definidos pode garantir a reprodutibilidade de biofilmes e favorecer testes de ação antimicrobiana. Esse modelo de biofilme foi proposto recentemente (Soares et al.,2015) e atualmente é desenvolvido em apenas dois laboratórios de microbiologia no mundo, o da Universidade Guarulhos e da Universidade da Pensilvânia.

7. CONCLUSÃO

A solução de CPC+Zn e fluoretos foi efetiva na redução da atividade celular, na inibição do crescimento dos biofilmes cultivados e na alteração da composição desses biofilmes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adolfsson-EriciM,Petterson M, Parkkonen J, SturveJ. Triclosan, a commonly used bactericide found in human milk and in the aquatic environment in Sweden. Chemosphere. 2002;46:1485–1489.

Almerich JM, CabedoB,Ortola JC,Poblet Influence of alcohol in mouthwashes containing triclosan and zinc: an a experimental gingivitis study. Journal of Clinical Periodontology. Copenhagen, v.32,p.539-544,2005

Bahekar AA, Singh S, Saha S, Molnar J, Arora R. The prevalence and incidence of coronary heart disease is significantly increased in periodontitis: a meta-analysis. Am Heart J. 2007;154:830–837.

Brecx M. Strategies and agents in supragingival chemical plaque control Periodontology 2000, Vol. 15, 1997, 100-108

Bueno-Silva B, Alencar SM, Koo H, Ikegaki M, Silva GV, Napimoga MH, Rosalen PL.Anti-inflammatory and antimicrobial evaluation of neovestitol and vestitol isolated from Brazilian red propolis. J Agric Food Chem. 2013 May 15;61(19):4546-50. doi: 10.1021/jf305468f. Epub 2013 May 3.

Carvallho LH, D´Avila GB, Leão A, Haffajee AD, Socransky SS, Feres M. Scaling and root planing, systemic metronidazole and professional plaque removal in the treatment of chronic periodontitis in a Brazilian population: I. clinical results. J Clin *Periodontol*. 2004 Dec; 31(12):1017-76.

Carvalho LH, D'Ávila GB, Leão A, Haffajee AD, Socransky SS, Feres M.Scaling and rootplanning,systemic metronidazole and professional plaque removal in the treatment of chronic periodontitits in a Brazilian population.II.Microbiologivalresults.J Clin Periodonttol.2005,32:406-11.

Ciancio SG, Laucillo F, Shilby O, Vitello M, Mather M. The effect of an antiseptic mouthrinse on implant maintenance: plaque and peri-implant gingival tissues. J Periodontol 1995: 66: 962-965.

Cionca N, Giannopoulou C, Ugolotti G, Mombeli A. Amoxicilin and metronidazole as an adjunt to fullmouth scaling and root planning of chronic periodontitis. *J Periodontol*. 2009 Mar;80(3):364-17.

Costa X, Laguna E, Herrera D, Serrano J, Alonso B, Sanz. Efficacy of a new mouth rinse formulation based on 0.07%cetylpyridinium chloride in the control of plaque and gingivitis: a 6-month randomized clinical trial.J Clin Periodontol.2013;40(11):1007-1015

Faveri M, Feres M, Shibli JA, Salvador SL, Figueiredo LC.Scaling and root plaining and chlorexidine mouthrinses in the treatment of chronic periodontitis:a randomized, placebo-controlled clinical trial.J Clin Periodontol.2006(b);33(11):819-28

Feres M, Haffajee AD, Allard K, Som S & Socransky SS. Change in subgingival microbial profiles in adult periodontitis subjects receiving either systemically-administered amoxicillin or metronidazole. *J Clin Periodontol.* 2001; 28, 597-609.

Feres M, Figueiredo LC, Faveri M, Stewart B, deVizoW. The effectiveness of a preprocedural mouthrinse containing cetylpyridinium chloride in reducing bacteria in the dental office. J Am Dent Assoc.2010;141(4):415-422.

Fornell J, Sundin Y, Lindhe J. Effect of Listerine on dental plaque and gingivitis. Scand J Dent Res 1975: 83: 18-25.

Fulliang HU, Hepburn HR, Yinghual L, ChenM, Radloff SE, Daya S. Effects of etanol and water extracts of propolis on acute inflammatory animal models. Journal Ethnopharmacology. 2005; Lausanne, v. 100, p. 276-283.

Ganss C, Schlueter N, Hardt M, Schattenberg P, Klimek J. Effect of fluoride compounds on enamel erosion *in vitro*: a comparison of amine, sodium and stannous fluoride. Caries Res. 2008;42:2–7. doi: 10.1159/000111743.

Guggenheim B, Giertsen E, Schüpbach P, Shapiro S. Validation of an in vitro biofilm model of supragingival plaque. *J Dent Res.* 2001;80(1):363-370.

Guggenheim B, Gmür R, Galicia JC, Stathopoulou PG, Benakanakere MR, Meier A, Thurnheer T, Kinane DF. In vitro modeling of host-parasite interactions: the 'subgingival' biofilm challenge of primary human epithelial cells. *BMC Microbiology* 2009, 9:280

Haffajee AD, Cugini MA, Dibart S, Smith C,Kent Jr RL, Socransky SS.The effect of SRP on the clinical and microbiological parameters of periodontal disease.J Clin Periodontol.1997;24:324-34

Haffajee AD, Torresyap G, Socransky SS. Clinical changes following four different periodontal therapies for the treatment of chronic periodontitis: 1-year results. *J Clin Periodontol*. 2007; 34(3):243-53.

Hannig C. Effect of conventional mouthrinses on initial bioadhesion to enamel and dentin *in situ*. Caries Res. 2013;47:150–161. doi: 10.1159/000345083

Jackson RJJ. Metal salts, essential oils and phenols - old or new? Periodontology 2000, Vol. 15, 1997, 63-73

Jain I, Jain P. Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of three different formulations of mouth rinses with multi-herbal mouth rinse. J Indian Soc Pedod Prev Dent. 2016 Oct-Dec;34(4):315-23. doi: 10.4103/0970-4388.191409.

Jongsman MA, Van de Lagemaat M, Busscher HJ, Geertsema-Doornbusch GI, AtemaSmit J, Van der Mei HC, Ren Y. Synergy of brushing mode and antibacterial use on in vivo biofilm formation.Evidence Based Dentistry,2016.doi:10.1038/sj.ebd.6401169.

Jones CG. Chlorhexidine: is it still the gold standard? Periodontology 2000.1997;15:55-62

Kang JH, Jang YJ, Kim DJ, Park JW. Antimicrobial Effectiveness of Cetylpyridinium Chloride and Zinc Chloride-Containing Mouthrinses on Bacteria of Halitosis and Peri-implant Disease. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2015 Nov-Dec;30(6):1341-7.

Kensche A, Kirsch J, Mintert S, Enders F, Pötschke S, Basche S, König B, Hannig C, Hannig M. Impact of customary fluoride rinsing solutions on the pellicle's protective properties and bioadhesion *in situ.* Sci Rep. 2017; 7: 16584. . doi: 10.1038/s41598-017-16677-8.

Keni NN,Aras MA,Chitre V.Chlorhexidine allergy due to topical application.Indian J Dent 2012;23:674-6.

Kocak M.Comparison of the Efficacy of Three Different Mouthrinse Solutions in Decreasing the Level of Streptococcus Mutansin Saliva. Eur. j. dent., Mumbai, v. 3, n. 1, p. 57–61, 2009.

Lang C, Murgia C, Leong M, Tan LW, Perozzi G, Knight D, Ruffin R, ZalewskiP.Anti-inflammatory eddects of zinc and alterations in zinc transporter mRNA in mouse models of allergic inflammation.AM J Physiol Lung Cell Mol Physiol.2007;29(2):L577-584

Lee VA, Karthikeyan R, Rawls HR, Amaechi BT. Anti-cariogenic effect of a cetylpyridinium chloridecontainingnanoemulsion.*J Dent*. 2010 Sep;38(9):742-9. Epub 2010 Jun 17.

Lynch RJM, Churchley D, Butler A, Kearns S, Thomas GV, Badrock TC, Cooper L, Higham SM: Effects of zinc and fluoride on the remineralisation of artificial carious lesions under simulated plaque fluid conditions. Caries Res 2011; 45: 313–322.

Lindhe J, Lang NP, Karring T. Clinical Periodontolgy and Implant Dentistry. 5th ed. Oxford: Black well; 2008. pp. 705–33

LiPuma JJ, Rathinavelu S, Foster BK, Keoleian JC, Makidon PE, Kalikin LM, Baker JR Jr. In vitro activities of a novel nanoemulsion against Burkholderia and other multidrug-resistant cystic fibrosisassociated bacterial species. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009 Jan;53(1):249-55. Epub 2008 Oct 27.

Loe H, Schiot CR. The effect of mouthrinses and tropical application of chlorhexidine on the development of dental laque and gingivitisin man.J.Periodont Res. 1970; 11.79-83.

Matarazzo F, Figueiredo LC, Cruz SE, Faveri M, Feres M. Clinical and microbiological benefits of systemic metronidazole and amoxicillin in the treatment of smokers with chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled study. *J Clin Periodontol.* 2008; 35(10):885-96. Epub 2008 Aug 24.

McCoy LC, Wehler CJ, Rich SE, Garcia RI, Miller DR,Jones JA. Adverse events associated with chlorhexidine use: results from the Department of Veterans Affairs Dental Diabetes Study. J Am Dent Assoc. 2008 Feb;139(2):178-83..

Mealey BL, Ocampo GL. Diabetes mellitus and periodontal disease. *Periodontol 2000.* 2007;44:127–153.

Netuveli SG, Sheiham A. A systematic review of the effectiveness of anticalculus dentifrices. Oral Health Prev Dent. 2004;2(1):49-58.

Palmer RJ.Composition and development of oral bacterial communities..Periodontol 2000;64,20-39.

Pandit S, Cai JN, JungJE, Lee Ys, Jeon JG. Effect of brief cetylpyridinium chloride treatments during early and mature cariogenic biofilm formation. Oral Dis.2015;21(5)565-571.

Petersen PE. The world oral health report: continuous improvement of oral health in the 21st century – the approach of the WHO Global Oral Health Program. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2003; 31 (Suppl.1):3-24.

Pitten FA, Kramer A. Efficacy of cetylpyridinium chloride used as oropharyngeal antiseptic. Arz.ForSchung 2001; 51: 588–595.

Prada-López I,Quintas V,Casares-de-Cal AM, Quintanilla JAS, Quintanilla DS, Tomás I.Ex vivo vs. in vivo antibacterial activity of two antiseptics on oral biofilm.Front Microbiol 2015;v6:665

Priya BM, Galgali SR.Comparison of amine fluoride and chlorhexidine mouth rinses in the control of plaque and gingivitis--a randomized controlled clinical trial. Indian J Dent Res. 2015 Jan-Feb;26(1):57-62

Quisno R, Foster MJ. Cetylpyridinium Chloride: I.Gemicidal Properties. J Bacteriol.1956;52(1):111-117

Retamal-Valdes B, SoaresGM ,Stewart B, Figueiredo LC, Faveri M, Miller S, Zhang YP, Feres M. Effectiveness of a pre-procedural mouthwash in reducing bacteria in dental aerosols: randomized clinical trial. Brazilian Oral Research.2017; v. 31, p. 0021/31.

Riley P, Lamont T. Triclosan/copolymer containing toothpastes for oral health. Cochrane Database of Systematic Reviews 2013, Issue 5. Art. No.: CD010514. DOI: 10.1002/14651858.CD010514.

Rosing CK,Cavagni J,Gaio EJ,Muniz FWMG,Ranzan N,Oballe HJR,Friederich SA,Severo RM,Stewart B,Zhang YP.Efficacy of two mouthwashes with Cetylpyridinium Chloride:A Controlled Randomized Clinical Trial.Braz Oral Res 2017,July 3-31, e47

Sakaue Y, Shoji T, Tatsuya O, Hisanori D, Yutaka T, YuichiroN.The effect of chlorhexidine on dentalcalculus formation: an in vitro studyBMC Oral Health (2018) 18:52

Sanchez MC, Llama-Palacios A, Blanc V, Leo´n R, Herrera D, Sanz M. Structure, viability and bacterial kinetics of an in vitro biofilm model using six bacteria from the subgingival microbiota. *J Periodont Res.* 2011; 46: 252–260.

Saxton CA, Svatun B, Lloyd AM. Antiplaque effects and mode of action of a combination of zinc citrate and a nonionic antimicrobial agent. Scand J Dent Res 1988: 96:212-216

Schiott CR.Effect of chlorhexidineon the microflora of the oral cavity.J.Periodontal Res. Suppl.1973;12:7-10

Serrano J, Escribano M, Roldán S, Martín C, Herrera D. Efficacy of adjunctive anti-plaque chemical agents in managing gingivitis: a systematic review and meta-analysis. J Clin Periodontol. 2015;42(Suppl 16):106–38.

Silva MP, Feres M,Sirotto TA, Soares GM, Mendes JA, Faveri M, FigueiredoLC. Clinical and microbiological benefits of metronidazole alone or with amoxicillin as adjuncts in the treatment of chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled clinical trial. *J Clin Periodontol*.2011;38, 828-837.

Sisson CH. Artificial dental plaque biofilm model systems. *Adv Dent Res.* 1997; 11(1):110-126, April.

Slots J.Low-cost periodontal therapy.Periodontol 2000,2012 oct;60(1):110-37

Soares GM, Teles F, Starr JR, Feres M, Patel M, Martin L, Teles R. Effects of azithromycin,metronidazole, amoxicillin, and metronidazole plus amoxicillin on an in vitro polymicrobial subgingival biofilm model. Antimicrob Agents Chemother. 2015 May;59(5):2791-8. doi:10.1128/AAC.04974-14. Epub 2015 Mar 2.

Socransky SS, Haffajee AD, Dzink, JL. Relationship of subgingival microbial complexes to clinical features at the sampled sites. J Clin Periodontol.1988;15:440-44.

Socransky SS, Smith C, Martin L, Paster BJ, Dwehirst FE, Levin AE. Checkerboard DNA-DNA hybridization. *Biotechiniques*. 1994.17, 788-792.

Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent Jr RL. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol.* 1998;25:134-144.

Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol 2000*. 2002;28:12-55.

Socransky SS, Haffajee AD, Smith C, Martin L, Haffajee JA, Uzel NG, Goodson JM. The use of checkerboard DNA-DNA hybridization to study complex microbial ecosystems. *Oral Microbial Immunol*. 2004; 19: 352-362.

Socransky SS & Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontol 2000*. 2005; 38: 135-187.

Sreenivasan PK, Vered Y, Zini A, Mann J, Kolog H, Steinberg D, Zambon JJ, Haraszthy VI, da Silva MP, De Vizio W.A 6-month study of the effects of 0.3% triclosan/copolymer dentifrice on dental implants. J Clin Periodontol. 2011 Jan;38(1):33-42. doi: 10.1111/j.1600-051X.2010.01617.x. Epub 2010 Sep 13.

Sreenivasan PK,Furgang D,Markowitz K,McKiernan M,Tischio-Bereski D,Devizio W,Fine D.Clinical anti-microbial efficacy of a new zinc citrate dentifrice.Clin Oral Invest.(2009).Jun13(2):195-202.doi:10.1007/s00784-008-0227-3

Surbhi L, Christine T, Randall ES. General Principles of Antimicrobial Therapy.Mayo Clin Proc.February 2011;86(2):156-167.doi:10.4065/mcp.2010.0639

Uppal A, Uppal S, Pinto A, Dutta M, Shrivatsa S, Dandolu V, Mupparapu M. The effectiveness of periodontal disease treatment during pregnancy in reducing the risk of experiencing preterm birth and low birth weight: a meta-analysis. *J Am Dent Assoc.* 2010 Dec;141(12):1423-34.

Van Der Mei HC, Engels E, de Vries J, Busscher HJ. Effects of amine fluoride on biofilm growth and salivary pellicles. Caries Res. 2008;42(1):19-27. Epub 2007 Nov 27.

Van der Weijden F A, Slot D E. Efficacy of homecare regimens for mechanical plaque removal in managing gingivitis a meta review. J Clin Periodontol.2015;42(Suppl 16):77–91.

Vlachojannis C, Chrubasik-Hausmann S, Hellwig E, Al-Ahmad A. A preliminary investigation on the antimicrobial activityof Listerine®, its components, and of mixtures thereof.Phytother.Res. 2015; 29:1590–1594.

Vlachojannis C, Al-Ahmad A, Hellwig E, Chrubasik S. Listerine® Products: An Update on the Efficacy. . Res. Phytotheerapy. 2016; 30: 367–373. Wiley Online Library12 January DOI: 10.1002/ptr.5555

Voos AC,Krans S,Tonndorf-Martini S,Voelpel A,Sigusch H,Staudte H,Albbrecht V,Sigusch BW.Photodynamic antimicrobial effect of safranine.O on an ex vivo periodontal biofilm. Lasers Surg Med. 2014 ;46:235-43.

Wu CD, Savitt ED. Evaluation of the safety and efficacy of over-the-counter oral hygiene products for the reduction and control of plaque and gingivitis. Periodontol 2000 2002; 28: 91–105.

Yueh MF, Tukey RM. Triclosan: A Widespread Environmental Toxicant with Many Biological Effects Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2016 Jan 6; 56: 251–272.doi: 10.1146/annurev-pharmtox-010715-103417

Zanatta F B, Bergoli AD, Werle SB, Antoniazzi RP.Biofilm Removal and Gingival Abrasion with Medium and Soft Tootbrushes.Oral Health Prev Dent 9(2011).nº2(11.07.2011)doi:10.3290/j.ohpd.a22018