

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA, MICROBIOLOGIA E  
IMUNOLOGIA

**Priscila Karla Silva Dias**

**ENXAGUANTES BUCAIS E INTERFERÊNCIAS NA MICROBIOTA  
BUCAL**

JUIZ DE FORA  
2019

**PRISCILA KARLA SILVA DIAS**

**ENXAGUANTES BUCAIS E INTERFERÊNCIAS NA  
MICROBIOTA BUCAL**

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Área: Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas: Área: Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias

**Orientador: Prof. Dr. Cláudio Galuppo Diniz**

**Co-orientadora: Profa. Dra. Ana Carolina Morais Apolônio.**

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Dias, Priscila Karla Silva.

ENXAGUANTES BUCAIS E INTERFERÊNCIAS NA MICROBIOTA BUCAL / Priscila Karla Silva Dias. -- 2019.

72 p.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Galuppo Diniz

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Ana Carolina Moraes Apolônio

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2019.

1. Enxaguante bucal. . 2. Microbiota bucal. . 3. Diversidade.. I.

Diniz, Prof. Dr. Cláudio Galuppo , orient. II. Apolônio, Prof<sup>a</sup>. Dra. Ana Carolina Moraes , coorient. III. Título.

**PRISCILA KARLA SILVA DIAS**

**ENXAGUANTES BUCAIS E INTERFERÊNCIAS NA  
MICROBIOTA BUCAL**

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Área: Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas: Área: Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_  
**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. Cláudio Galuppo Diniz - Orientador**  
**Universidade Federal de Juiz de Fora**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Ana Carolina Morais Apolônio**  
**Universidade Federal de Juiz de Fora – Co-orientadora**

---

**Profa. Dra. Fernanda Campos Machado**  
**Universidade Federal de Juiz de Fora**

---

**Profa. Dra. Carolina dos Santos Fernandes da Silva**  
**Universidade Presidente Antônio Carlos**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por minha vida, família e amigos.

À Universidade Federal de Juiz de Fora, pelo ambiente criativo e amigável proporcionado durante esta etapa.

Ao meu orientador, Prof. Dr Cláudio Galuppo Diniz pela orientação, apoio e confiança.

À minha Co-orientadora Prof<sup>a</sup>. Dra. Ana Carolina Morais Apolônio pela oportunidade e apoio na *elaboração deste trabalho*.

A todos os *professores*, por me proporcionarem conhecimento e aprendizagem nesta caminhada.

Aos amigos do Centro de Estudos em Microbiologia, o CEMIC, companheiros de trabalhos e irmãos na amizade que fizeram parte da minha formação.

Aos meus pais, pelo amor, incentivo e apoio incondicional.

E a todos que, direta ou indiretamente, fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

## RESUMO

A cavidade bucal constitui um sítio anatômico peculiar. Suas características permitem o desenvolvimento de uma comunidade microbiana típica, bastante diversificada e que se altera durante os diferentes períodos da vida tendendo, como microbiota residente, a um estado de equilíbrio que resulta na manutenção da saúde. Entretanto, caso esse equilíbrio seja quebrado, a microbiota pode se portar como agressora oportunista ou deixar de exercer seu efeito barreira contra microrganismos exógenos potencialmente patogênicos. É nesse contexto que a utilização de enxaguantes bucais com ação antimicrobiana, os antissépticos, ganha importância frente a possibilidade desses produtos estarem contribuindo para a alteração da microbiota bucal. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar comparativamente a ocorrência de bactérias de interesse clínico na cavidade bucal indicadoras de desequilíbrio microbiano e traçar um perfil clínico-epidemiológico dos indivíduos que fazem uso regular desses enxaguantes. Os voluntários foram submetidos à inspeção da cavidade bucal visando à análise de suas condições de saúde. As informações obtidas foram registradas em uma Ficha Clínica. Após serem submetidos a uma triagem os voluntários deram origem aos dois grupos de estudo: o Grupo Controle (n=15) constituído pelos participantes não usuários de antissépticos bucais e o Grupo Teste (n=15), constituído por usuários regulares de tais produtos, ou seja, aqueles que utilizam o produto pelo menos 1 vez por dia, todos os dias. Amostras de saliva estimulada foram submetidas a análises dependentes de cultivo para avaliar os microrganismos presentes. Placas com crescimento viável tiveram seus morfotipos quantificados e caracterizados de acordo com sua macro morfologia e foram posteriormente, identificados por testes bioquímicos convencionais. Foram observadas diferenças no perfil clínico-epidemiológico entre os participantes dos diferentes grupos. Trinta e dois morfotipos foram caracterizados, mantendo-se a prevalência de microrganismos gram-positivos sobre os organismos gram-negativos. Tais morfotipos foram agrupados em 05 grupos bacterianos que demonstraram ocorrências comuns entre os grupos de estudo e uma distribuição diferenciada pelo uso de antissépticos. Os resultados encontrados permitem sugerir que a utilização regular de antissépticos altera a microbiota bucal uma vez influenciando na distribuição dos grupos bacterianos. Tal alteração pode influenciar no mecanismo de regulação saúde x doença e resultar em processos infecciosos tanto por colonização de espécies exógenas como por proliferação de espécies residentes.

**Palavras chaves:** Enxaguante bucal. Microbiota bucal. Diversidade.

## ABSTRACT

The buccal cavity constitutes a peculiar anatomical site. Its characteristics allow the development of a typical microbial community, which is very diversified and that changes during the different periods of life, tending, as a resident microbiota, to a state of equilibrium that results in the maintenance of health. However, in case this equilibrium is broken, the microbiota may behave as an opportunistic aggressor or fail to exert its barrier effect against potentially pathogenic exogenous microorganisms. It is in this context that the use of mouthwashes with antimicrobial action gains importance because the possibility of these products are contributing to the alteration of the oral microbiota. Thus, the objective of this study was to evaluate the occurrence of bacteria of clinical interest in the oral cavity indicative of microbial disequilibrium and to draw a clinical-epidemiological profile of individuals who regularly use mouthwashes. The volunteers were submitted to the inspection of the oral cavity aiming at the analysis of their health conditions. The information obtained was recorded in a Clinical Record. After being screened the volunteers gave rise to the two study groups: the Control Group (n = 15) consisting of non-rinsing participants and the Test Group (n = 15), consisting of regular users of much, namely, those that use the product at least 1 time a day, every day. Stimulated saliva samples were collected and analysed to assess cultivation-dependent microorganisms present. Viable growth plates had their morph types quantified and characterized according to their macro morphology. The identification of major groups performed using conventional biochemical tests. The observed differences in the clinical-epidemiological profile among the participants of the different groups. Thirty-two morphotypes were characterized, maintaining the prevalence of gram-positive microorganisms on gram-negative organisms. These morphotypes were grouped in 05 bacterial groups that demonstrated common occurrences between the study groups and a differentiated distribution by the use of rinsers. The results suggest that the regular use of rinses changes the oral microbiota once it influences the distribution of bacterial groups. Such alteration may influence the regulation mechanism of health x disease and result in infectious processes both by colonization of exogenous species and by proliferation of resident species.

**Keywords:** Mouth rinse. Buccal microbiota. Diversity.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Contagem média de Unidades Formadoras de Colônias por meio de Isolamento. As letras a e b indicam diferença significativa entre os grupos de estudo ( $p < 0.05$ ). A: Ágar Hipertônico Manitol; B: Ágar Mitis Salivarius; C: Ágar Eosina Azul de Metileno ..... 40
- Figura 2 Diagrama de Venn representativo da diversidade de morfotipos e agrupamento qualitativo de acordo com sua ocorrência exclusiva e compartilhada entre indivíduos dos grupos de estudo. a: morfotipos isolados apenas no Grupo Controle; b: morfotipos isolados em ambos os grupos; c: morfotipo isolado em usuários regulares de enxaguante bucal 44
- Figura 3 Estrutura da comunidade bacteriana bucal a partir de cultura seletiva e contagem de UFC/mL, de amostras de saliva de indivíduos controle ou usuários regulares de enxaguantes bucais, baseado na observação de morfotipos coloniais nos meios de cultura Ágar Hipertônico Manitol, Ágar Mitis Salivarius e Ágar Eosina Azul de Metileno..... 45
- Figura 4 Estrutura da comunidade bacteriana bucal a partir de cultura seletiva e contagem de UFC/mL, de amostras de saliva de indivíduos controle ou usuários regulares de enxaguantes bucais, baseado na identificação por grupos bacterianos ..... 47
- Figura 5 Estimativa de diversidade dos grupos bacterianos a partir de cultura seletiva e contagem de UFC/mL, de amostras de saliva de indivíduos controle ou usuários regulares de enxaguantes bucais, baseado na identificação por grupos bacterianos ..... 48

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características sociodemográficas do grupo de indivíduos amostrado .....	37
Tabela 2	Características comportamentais .....	38
Tabela 3	Classificação da condição bucal e características clínicas ...	39
Tabela 4	Distribuição quantitativa dos microrganismos em culturas seletivas .....	40
Tabela 5	Caracterização e ocorrência geral (%) dos morfotipos isolados em Ágar <i>Mitis Salivarius</i> .....	41
Tabela 6	Caracterização e ocorrência geral (%) dos morfotipos isolados em Ágar Hipertônico Manitol .....	42
Tabela 7	Caracterização e ocorrência geral (%) dos morfotipos isolados em Ágar Eosina Azul de Metileno .....	43
Tabela 8	Distribuição quantitativa dos microrganismos em grupos bacterianos.....	46

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AHM</b>	Ágar Hipertônico Manitol
<b>AMS</b>	Ágar <i>Mitis Salivarius</i>
<b>BGN</b>	Bacilos entéricos gram-negativos
<b>EMB</b>	Ágar Eosina Azul de Metileno
<b>ENT</b>	<i>Enterococcus</i>
<b>SCN</b>	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa
<b>SCP</b>	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva
<b>SGV</b>	<i>Streptococcus viridans</i>

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	11
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1	A cavidade bucal e a microbiota associada .....	15
2.2	O biofilme na cavidade bucal e os antissépticos .....	18
2.2.1	Princípios ativos mais comumente associados aos enxaguantes bucais .....	21
2.2.1.1	Clorexidina.....	21
2.2.1.2	Cloreto de Cetilpiridínio .....	22
2.2.1.3	Triclosan.....	23
2.2.1.4	Óleos Essenciais (Timol, Eucaliptol, Mentol, Etc.).....	24
2.2.1.5	Flúor.....	25
2.3	Antibioticoterapia e resistência bacteriana .....	26
2.4	Resistência cruzada e co-resistência aos antimicrobianos .....	29
3	OBJETIVOS .....	32
3.1	Objetivo geral .....	32
3.2	Objetivos específicos .....	32
4	MATERIAL E MÉTODOS .....	33
4.1	Delineamento do estudo .....	33
4.2	Coleta de amostras de saliva e preparação para análises microbiológicas .....	34
4.3	Isolamento bacteriano .....	34
4.4	Identificação presuntiva da amostra .....	35
4.5	Estudos de correlação e análise de dados .....	35
5	RESULTADOS .....	37
5.1	Características sociodemográficas, comportamentais e clínicas dos participantes .....	37
5.2	Estudos de avaliação da diversidade bacteriana .....	39
5.3	Identificação presuntiva dos morfotipos isolados .....	46
5.4	Diversidade dos grupos bacterianos .....	48
6	DISCUSSÃO .....	49
7	CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	53
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	54

## 1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A cavidade bucal constitui um sítio anatômico peculiar no organismo humano. Suas características biológicas permitem o desenvolvimento de uma comunidade microbiana típica, bastante diversificada e que se altera durante os diferentes períodos da vida tendendo, como microbiota residente, a um estado de equilíbrio que resulta na manutenção da saúde. Entretanto, caso esse processo de equilíbrio sofra uma ruptura, a microbiota pode se portar como agressora oportunista (caráter anfibiótico) ou deixar de exercer seu efeito barreira contra microrganismos potencialmente patogênicos exógenos. No desequilíbrio, os microrganismos bucais são potencialmente patogênicos para infecções locais ou sistêmicas oportunistas. A modulação da microbiota no desequilíbrio pode resultar em alterações clínicas relacionadas a doenças como cárie e doenças periodontais, além de complicações clínicas do trato gastrointestinal, como a Doença de Crohn e Carcinoma de Células Escamosas, por exemplo.

De maneira geral, o uso de substâncias com potencial de auxiliar na prevenção e no tratamento de quadros infecto-inflamatórios nas gengivas e nos dentes remonta 4000 anos a.C. Porém, foi só na atualidade que o uso desses produtos se tornou popular. Historicamente, o uso de enxaguantes bucais foi preconizado como coadjuvante no controle da população microbiana na cavidade bucal em situações relacionadas à falta de habilidade física ou demências debilitantes em indivíduos na comunidade que resultavam no uso inadequado do binômio fio dental-escova, em situações pré e pós-cirúrgicas com alto risco de contaminação com potencial desenvolvimento de infecções e em processos inflamatórios na boca. Sendo os enxaguantes um importante aliado na prática odontológica promovendo o controle químico da placa, o seu uso favorece a redução nos níveis de biofilme dental, levando ao controle de doenças relacionadas como gengivite, cáries, dentre outras.

Entretanto, foi fora dos consultórios odontológicos, os enxaguantes adquiriram um caráter cosmético passando a ter seu uso estimulado por um extenso apelo de marketing e sua venda livre. A partir daí, observou-se a incorporação sistematizada de substâncias de caráter antimicrobiano em dentifrícios e enxaguantes e o estímulo a seu uso, de maneira indiscriminada, desconsiderando

os riscos desses de poder exercer um impacto adverso na saúde humana e facilitar a disseminação da resistência microbiana aos antimicrobianos.

A descoberta de drogas com potencial antimicrobiano e sua introdução na prática médica representou uma importante redução na mortalidade por doenças infecciosas, nas complicações decorrentes de procedimentos cirúrgicos, além de auxiliar no tratamento de pacientes transplantados e imunodeprimidos de maneira profilática. Porém, como resposta natural dos microrganismos ao seu uso, decorreu-se o fenômeno de resistência microbiana a essas substâncias. Há quem defenda que esse fenômeno ocorreu concomitantemente à descoberta da Penicilina por Fleming, uma vez que pouco tempo após sua entrada no mercado, na década de 1940, já era possível observar linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* resistentes a essa droga datando assim, o primeiro relato do fenômeno de resistência ainda no século XX. Entretanto é aceito hoje em dia que a resistência bacteriana aos antimicrobianos seja tão antigo quanto a evolução microbiana dos mecanismos de antibiose que provavelmente tenham surgido para fins ecológicos de modulação de populações bacterianas e fúngicas em ecossistemas complexos, como ambientes polimicrobianos.

Desde sua instituição como arsenal terapêutico, o uso indiscriminado de substâncias com efeitos antimicrobianos e mesmo sua presença natural no meio ambiente, elevou a um novo patamar o fenômeno de resistência microbiana à antimicrobianos, muito relacionado a mecanismos complexos de resistência cruzada e co-resistência. O uso dessas substâncias implica na seleção de organismos resistentes que podem tornar-se predominantes em uma população e compartilhar os mecanismos genéticos e fisiológicos de resistência aos biocidas com drogas antimicrobianas de uso terapêutico. Além disso, esses mecanismos podem ser transferidos para outras bactérias com grande impacto ecológico.

A transferência horizontal de genes relacionados à expressão de mecanismos fisiológicos de resistência entre diferentes espécies bacterianas, patogênicas ou não, assim como a transmissão subsequente dessas bactérias entre vários hospedeiros e reservatórios ambientais, desempenha um papel importante na emergência e disseminação da resistência bacteriana. Antes do século XXI, a resistência bacteriana era notada, predominantemente, em ambientes hospitalares; atualmente, este fenômeno está associado a diversos ambientes e setores de atividade humana como a produção de alimentos, e pode atingir indivíduos

saudáveis na comunidade. Assim, a resistência aos antimicrobianos, enquanto fenômeno ecológico e seus desdobramentos é considerada, nos dias atuais, um problema mundial de saúde pública.

De maneira geral, a resistência das bactérias aos antimicrobianos e biocidas pode ocorrer de maneira intrínseca, ou seja, através de mecanismos naturais de um gênero ou espécie, como por exemplo, bactérias Gram positivas ou Gram negativas que são naturalmente resistentes às drogas que interferem na parede celular ou membrana por não atravessarem o peptidoglicano espesso ou a membrana externa; ou adquirida, geralmente mediada por genes extracromossomais e disseminada por conjugação, transdução ou transformação, com conseqüente expressão de novos mecanismos fisiológicos, como sistemas de efluxo ativo, por exemplo. Ainda, bactérias podem sofrer mutações espontâneas e adquirir resistência a uma determinada droga. Tais fenômenos manifestam-se através de mecanismos globais, geneticamente determinados como a alteração da permeabilidade celular ou impermeabilidade, a produção de enzimas que degradam, modificam ou inativam substâncias com potencial antimicrobiano, a alteração do sítio de ação da droga e o bloqueio ou proteção do sítio alvo do antibiótico.

Uma das questões levantadas atualmente relaciona-se com a extensão do fenômeno em relação à resistência cruzada de um microrganismo a um medicamento ao qual não foi exposto, resultante da exposição prolongada e aquisição/desenvolvimento de resistência em relação a outra substância como um biocida. Sob esse ponto de vista, é plausível aceitar que o uso indiscriminado de biocidas, sobretudo aqueles à base de metais como o cobre, o mercúrio, entre outros, possa contribuir para a manutenção da pressão seletiva com efeito cruzado à resistência aos antimicrobianos uma vez que, além de compartilhamento de mecanismos, a pressão exercida por essas substâncias favorece a manutenção de genoma extracromossomal (plasmídeos) que podem carregar, além de genes específicos de detoxificação de metais e biocidas, diversos genes para resistência aos antimicrobianos clássicos de uso terapêutico (co-resistência). Nesse contexto, os enxaguantes bucais a base de substâncias antimicrobianas ganham atenção pelo seu uso corriqueiro, muitas vezes considerado inofensivo por profissionais da área de saúde e pela população em geral.

Do exposto, partindo-se das considerações sobre o uso indiscriminado de antissépticos bucais e seus desdobramentos que incluem a provável relação com a

resistência bacteriana aos antimicrobianos e alterações na ecologia do ecossistema bucal, é proposto este trabalho. De maneira geral, o objetivo é direcionado à avaliação da diversidade bacteriana cultivável incluindo-se grupos de interesse clínico-microbiológico tidos como transitórios na cavidade bucal e indicadores de desequilíbrio microbiano em indivíduos que fazem uso regular de antissépticos bucais.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 A cavidade bucal e a microbiota associada

Segundo Thomas e Greer (2010) define-se como “Microbiota” uma população de organismos microscópicos que habitam um órgão do corpo ou parte do corpo de uma pessoa resultando em uma interação harmônica. É o caráter anfibiótico dessa interação microrganismos x homem que determina os processos de saúde ou doença.

O corpo humano apresenta vários sítios anatômicos que são colonizados por microrganismos, porém, cada região representa um nicho ecológico que será colonizado por uma comunidade microbiana distinta (APOLÔNIO, PAULA e MACHADO, 2018). Entre as características benéficas da microbiota residente na homeostase, citam-se a modulação do sistema imunológico, a barreira à colonização de patógenos, a produção de substâncias utilizáveis pelo hospedeiro e a degradação de produtos tóxicos. Na boca, a presença de mais de 700 espécies de bactérias constitui um relevante recurso de defesa, pois dificulta a implantação de espécies patogênicas estranhas a essa microbiota (GAO Z *et al.*, 2007, FREDRICKS D.N, 2001 e DE LORENZO, J. L. 2004).

Fatores genéticos e ambientais parecem modular a composição da microbiota. Neste sentido, qualquer fator externo que possa alterar o equilíbrio da microbiota, tal como a dieta ou o tratamento com antimicrobianos, deve ser considerado como potencial para o desequilíbrio e perda, concomitante das propriedades benéficas destes microrganismos anfibióticos (KOSIEWICZ MM *et al.*, 2011). Na boca, a microbiota bucal contribui para o desenvolvimento do sistema imune, exerce seu efeito barreira, dentre outras características, permitindo a colonização equilibrada de grande variedade de microrganismos, podendo constituir reservatório de microrganismos potencialmente invasivos aos tecidos do hospedeiro (MARCOTTE e LAVOIE, 1998).

A cavidade bucal apresenta uma enorme diversidade microbiana, diversidade esta que inclui bactérias, vírus, fungos e protozoários (HE e SHI, 2009). Além de cerca de 700 espécies de bactérias diferentes (contagem aproximada), os fungos constituem também uma grande população na microbiota bucal. Até o momento já foram listadas cerca de 74 gêneros cultiváveis e 11 não cultiváveis (GHANNOUM *et*

*al.*, 2010). Isto significa que, no decorrer da vida humana, centenas de espécies microbianas colonizam de maneira consistente esse compartimento, sem, no entanto normalmente lhes causar mal algum.

Segundo Dewhirst *et al.*, 2010, a cavidade bucal humana inclui vários ecossistemas distintos, como dentes, sulco gengival, gengiva, língua, bochecha, lábio, palato duro e palato mole que permitem uma elevada diversidade microbiana. Essa diversidade contribui para a instalação de uma diversidade de microrganismos comensais, simbióticos e potencialmente patogênicos, que compartilham o espaço encontrando-se imersos na saliva e associados às superfícies bucais formando um ecossistema típico (MUNRO e GRAP, 2004). Esses microrganismos podem ser classificados como residentes (colonizadores constantes e típicos em determinadas condições fisiológicas, que quando em equilíbrio atuam na fisiologia do hospedeiro), ou transitórios (normalmente não patogênicos, ou potencialmente patogênicos, que apresentam flutuações contínuas em sua constituição e que, habitualmente, não são essenciais ao hospedeiro) (JORGE, 1998; UREÑA, 2002). A microbiota transitória, incluindo microrganismos exógenos oportunistas ou patógenos obrigatórios, podem passar a colonizar a cavidade bucal do hospedeiro, no desequilíbrio na microbiota local, como, por exemplo, ocorrência de enterobactérias e de *Pseudomonas aeruginosa* na boca (DE LORENZO, 2004).

As espécies classificadas como residentes dividem-se de acordo com sua frequência de ocorrência na cavidade bucal: dominantes e suplementares. Tal espécie é considerada dominante, quando ocorre em altas concentrações na população microbiana total, maior que 1%. Em contrapartida, outra espécie é considerada suplementar quando ocorre em baixas proporções (menor que 1%). Pertencem a esse último grupo bactérias do grupo estreptococos do grupo *mutans*, *Lactobacilos*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, e *Treponema spp*, cujos números só aumentam se houver alteração ambiental (DE LORENZO, 2004).

A colonização da cavidade bucal e de suas estruturas inicia-se por meio do contato com a microbiota materna (lactobacilos, corinebactérias, estreptococos e leveduras) e objetos organizando-se nos primeiros dias de vida e estabilizando-se ao longo da infância. Gradativamente essa microbiota fica abundante e diversificada (LOTUFO *et al.*, 2001). Tal colonização é altamente específica e envolve um processo de interação bacteriana e receptores tissulares. Um microrganismo aderido aos tecidos epiteliais pode fornecer o sítio para a ligação de outra espécie,

contribuindo para manutenção de uma microbiota abundante e diversificada. Contudo a relação entre a superfície dental e a gengiva, somada ao fluxo salivar, favorece o acúmulo destes microrganismos nessas superfícies, ocasionando grandes depósitos bacterianos, também conhecidos como placa bacteriana, placa dental ou biofilme (LANG *et al.*, 1999; MARSH, 2004).

Na cavidade bucal, a língua atua como um reservatório de microrganismos anaeróbios Gram negativos que, normalmente, aparecem associados à etiologia das doenças periodontais e à halitose (MARSH e MARTIN, 2009). Além disso, neste sítio pode ser considerado também reservatório primário de fungos do gênero *Candida*. É a partir daí que a mucosa bucal, gengivas, dentina, raiz, bolsas periodontais, placa e saliva tornam-se colonizadas secundariamente (ARENDORF e WALKER, 1980).

Por outro lado, a superfície bucal é revestida pela saliva que além de exercer atividade umidificante, lubrificante, tamponante e antimicrobiana (LEUNG *et al.*, 2000) abriga a microbiota salivar que desempenha importante papel na prevenção da colonização por bactérias exógenas ou patogênicas. Embora desempenhe um papel importante nas doenças da cavidade bucal e extrabucais, ainda pouco se sabe sobre a diversidade desses microrganismos (HE *et al.*, 2011).

Em geral, indivíduos com boa higiene bucal possuem uma microbiota dominada por bactérias Gram positivas, especialmente *Streptococcus spp.* e *Actinomyces spp.* Em uma menor frequência, podem também ocorrer bactérias Gram negativas como *Veillonella spp.* Em contrapartida, em pessoas com baixo controle da higienização observa-se uma maior diversidade, complexidade microbiana sendo esta dominada por bactérias Gram negativas anaeróbias, incluindo espiroquetas, cocos e bastonetes Gram positivos acidúricos acidogênicos, além de anaeróbios facultativos que podem incluir membros da família *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus* e ainda bastonetes Gram negativos não fermentadores (MUNRO *et al.*, 2004; SCANNAPIECO, 2013).

É evidente a existência de uma associação entre os microrganismos bucais e o hospedeiro e, para que esta seja saudável, deve haver uma relação harmoniosa entre essas duas entidades (JENKINSON e LAMONT, 2005). O adequado relacionamento entre sistema imunológico e microbiota permite a indução de respostas protetoras a patógenos e a manutenção de vias regulatórias envolvidas na manutenção da tolerância a antígenos inócuos (APOLÔNIO, 2018). Assim, qualquer

alteração no ambiente do hospedeiro levará a interrupção da relação simbiótica normal entre o hospedeiro e sua microbiota (MARSH, 2011).

## **2.2 O biofilme na cavidade bucal e os antissépticos**

Na boca, o biofilme placa dental, o mais representativo, é formado por uma biomassa densa, não calcificada e muito bem estruturada, constituída exclusivamente por bactérias envolvidas e aglutinadas por uma matriz que representa cerca de 75% de seu volume (DE LORENZO, 2004). A formação desta matriz é um processo dinâmico e depende da disponibilidade de nutrientes, da síntese e secreção de material extracelular, estresse de cisalhamento, competição social e pastoreio por outros organismos (FLEMMING *et al.*, 2016).

Devido às características anatômicas e funcionais do sítio de colonização, e as práticas de higiene do hospedeiro, o biofilme dentário passa por ciclos contínuos de desorganização e recolonização (MADEIRA e QUEIROS-JUNIOR, 2018). Seu desenvolvimento é fortemente influenciado pelos estreptococos bucais, principal grupo de colonizadores primários. Essa colonização inicial determina a composição dos colonizadores posteriores no biofilme e afeta o estado de saúde ou doença do hospedeiro (KRETH *et al.*, 2009).

O método mais valioso para controle do biofilme dentário, com atuação tanto na sua prevenção como em sua remoção, consiste no controle mecânico. Tal controle é uma técnica simples, constituída por vários dispositivos de limpeza sendo os mais eficazes, as escovas dentais e os dispositivos de limpeza interproximal (GEBRAN; GEBERT, 2002). A limpeza do espaço interproximal é imprescindível para que não ocorra acúmulo de biofilme. Estudos mostram que a utilização adequada do fio dental remove até 80% do biofilme sub e supragengival (ECHEVERRIA e SANZ, 2005). Porém, essas técnicas nem sempre são realizadas adequadamente. É aceito que os métodos mecânicos de controle da placa bacteriana na superfície dentária requerem tempo, destreza manual e motivação (ADDY, 2008; GUNSOLLEY, 2010; MARSH, 2010; LESZCZYŃSKA *et al.*, 2011; MACIAS *et al.*, 2015).

Buscando suprir as deficiências relacionadas à má higienização mecânica para controle e remoção do biofilme placa bacteriana na cavidade bucal, os antissépticos bucais foram introduzidos na rotina odontológica, tendo como primeiro

objetivo a eliminação da placa bacteriana na zona supra e subgingival (BARNETT, 2003; GONZÁLEZ *et al.*, 2014). Assim, o uso dos enxaguantes bucais com potencial antimicrobianos, também denominados antissépticos, tem sido frequentemente, indicado no controle químico da placa como adjuvantes aos procedimentos mecânicos ou para afecções específicas para pacientes sob o uso de aparelhos ortodônticos, no pré e pós-operatório de cirurgias ou em pacientes especiais (MONFRIN; RIBEIRO, 2000; GEBRAN; GEBERT, 2002; ADDY, 2008).

Os antissépticos podem ser definidos como agentes anti-infecciosos para uso local em superfícies como pele ou mucosas (GONZÁLEZ *et al.* 2014). Um antisséptico ideal deve ter as seguintes propriedades: não ser absorvido pela pele ou pelas mucosas; possuir ação rápida e permanente; apresentar características sensoriais agradáveis que permitam uma boa adesão por parte do usuário; ter baixa toxicidade e amplo espectro antimicrobiano englobando tanto bactérias Gram positivas como bactérias Gram negativas, além de fungos e vírus e não ser inativado ao entrar em contato com matéria orgânica. Todavia não existe ainda um antisséptico disponível que reúna todas essas propriedades (FONT, 2001).

O registro mais antigo da utilização destes enxaguantes bucais como coadjuvante no tratamento odontológico (doenças da gengiva) remota à medicina chinesa, por volta de 2700 a.C. Várias civilizações antigas preconizavam a utilização de formulações sob a forma de elixires, pastas ou pós de aplicação dentária e bucal, para melhoria cosmética das estruturas bucais ou alívio de patologias agudas. Tais formulações baseavam-se, essencialmente, em produtos de origem animal e vegetal e não apresentavam qualquer tipo de evidência científica (ASADOORIAN, 2006). O objetivo primário destas seria o mascaramento da halitose e o estabelecimento de uma sensação de frescor na cavidade bucal. Além disso, o efeito abrasivo de alguns desses produtos contribuía para o desaparecimento de manchas dentárias (RELVAS, 2015). Foi em meados do século XIX que Joseph Lister, cirurgião e pesquisador, despontou como um dos principais proponentes da utilização de agentes químicos como antissépticos (MANDEL, 1988). Anos depois, Miller aprofundou os conhecimentos sobre enxaguantes bucais, classificando-os como bacteriostáticos ou bactericidas (BURTON, 2004). Em meados da década de 1900, soluções antissépticas e germicidas bucais eram abundantes, embora poucos fossem seus dados clínicos de apoio. A partir de 1960 observa-se uma mudança na abordagem de utilização dessas preparações que tem seu foco alterado da

prevenção de lesões cáries para estudos terapêuticos de antimicrobianos para gengivite e periodontite (ASADOORIAN, 2006).

Mais recentemente, motivado pelas dificuldades com os métodos mecânicos de higiene bucal os enxaguantes bucais com princípios antimicrobianos tiveram seu uso disseminado com o objetivo de controlar o biofilme dental e a gengivite (WITT *et al.*, 2005). Decorrente disto, as formulações de preparações bucal normalmente usados em contextos clínicos como pré e pós-cirúrgicos; e as de prescrição das lavagens bucal (tidas como adjuntas às medidas mecânicas) aumentaram as vendas e adquiriram uma parcela do mercado de produtos para a saúde bucal domiciliar (ASADOORIAN, 2006). Atualmente existem normas internacionais bem estabelecidas para a segurança de produtos de higienização bucal e prevenção de patologias bucais. É neste cenário que a *U. S. Food and Drug Administration* (FDA), a *Canadian Dental Association*, a *British Dental Association* e a *American Dental Association* (ADA), definiram normas para regulamentação dos produtos para controle e prevenção de formação de placa bacteriana e gengivite (BARNETT, 2003). Entretanto, essas substâncias ainda são de livre comercialização, sem necessariamente, normatização de uso no Brasil.

Como um todo, os enxaguantes representam o meio mais simples para a veiculação de substâncias antissépticas, sendo uma mistura do componente ativo, água, álcool, surfactantes, umectantes e flavorizantes (TORRES *et al.*, 2000). De acordo com Van der Ouderaa (1991), para ser empregado na cavidade bucal, um agente químico deve apresentar segurança, ou seja, não deve ser tóxico ou induzir reações de sensibilização nos pacientes, deve possuir sabor agradável e facilidade de manipulação, o que aumentaria a adesão ao tratamento. Deve ser eficaz demonstrando uma redução nos níveis de biofilme dentário e gengivite, deve demonstrar especificidade para a microbiota periodontopatogênica e apresentar boa substantividade, ou seja, capacidade de permanecer na cavidade bucal por período de tempo suficiente para exercer seus efeitos. Atendendo, de maneira maior ou menor a essas especificidades, várias substâncias com ação antimicrobiana vêm sendo utilizadas sob a forma de enxaguantes e tem levantado uma preocupação pública de longa data devido à controvérsia de poder exercer um impacto adverso na saúde humana e facilitar a disseminação da resistência aos antimicrobianos (YEE; GILBERT, 2016).

Atualmente uma grande quantidade de antissépticos bucais, de diferentes

marcas e composições, encontram-se disponível no mercado. Estes têm sido avaliados com relação à sua eficácia como agentes antiplaca e/ou antigengivite, além do controle à halitose de origem bucal. A eficácia, a curto e longo prazo, destes produtos ainda não é totalmente estabelecida e informações relacionadas ao seu real benefício podem trazer importantes implicações comerciais e sociais (TOLENTINO *et al.*, 2010).

## **2.2.1 Princípios ativos mais comumente associados aos enxaguantes bucais**

### **2.2.1.1 - Clorexidina**

A Clorexidina foi proposta na década de 1950 como um antisséptico dérmico para aplicação em feridas cutâneas, mas rapidamente adquiriu popularidade em outras áreas da medicina, como obstetrícia e a ginecologia. Já na Odontologia, foi utilizado inicialmente como um elixir bucal pré-cirúrgico e em endodontia (LINDHE, 2003). A partir de então, por mais de três décadas, a clorexidina tem sido considerada o padrão-ouro em comparações com outros agentes químicos devido à sua capacidade de evitar a formação do biofilme dental (SEMENOFF *et al.*, 2008).

A forma mais comum comercialmente é a de Digluconato de Clorexidina, a qual apresenta maior atividade, devido à sua solubilidade, a qual permite combinação com álcool (LINDHE, 2003; GONZÁLEZ *et al.*, 2014). Pode ser encontrada em dentifrícios, géis, vernizes ou soluções. Entretanto, seu uso em dentifrícios pode ser indevido, pois estes em geral apresentam detergentes (ex. laurel sulfato de sódio), incompatíveis com a clorexidina, reduzindo sua ação. Na forma de solução, a concentração mais utilizada é de 0,12%, duas vezes ao dia.

Uma das principais vantagens de seu uso é o amplo espectro de atividade, atuando tanto em bactérias Gram positivas como em Gram negativas, aeróbias e anaeróbias, fungos e vírus lipofílicos, como o HIV, HBV e *Herpes simplex* (LINDHE, 2003; PIETRUSKA *et al.*, 2006; MANIVANNAN, 2008; MATHUR *et al.*, 2011; MAYA *et al.*, 2011). Em altas concentrações, a clorexidina promove a coagulação das proteínas citoplasmáticas e morte bacteriana e, em doses mais baixas, a integridade da membrana celular é alterada, resultando num extravasamento dos componentes bacterianos de baixo peso molecular (ZANATTA e RÖSING, 2007). Em virtude das células bacterianas serem carregadas negativamente e a clorexidina positivamente,

esta substância é atraída pelas células, acabando por se ligar aos fosfolípidos das membranas celulares. Desta forma, a permeabilidade da membrana aumenta o que desencadeia a saída de compostos de baixo peso molecular, tal como os íons de potássio, provocando forte adsorção na superfície dos dentes (RELVAS, 2015).

Outro mecanismo proposto baseia-se na liberação prolongada de clorexidina ao longo de várias horas a partir de um reservatório bioquímico adsorvido nos tecidos bucais que não os dentes. Tal liberação, lenta e prolongada, atuaria de três maneiras distintas: (1) diminuindo a formação de película do esmalte por bloqueio dos grupos acídicos das glicoproteínas salivares; (2) inibindo a capacidade de fixação ao esmalte; (3) diminuindo a capacidade bacteriana de fixação à película de esmalte e precipitando os fatores aglutinadores da saliva que aumenta a fixação de cálcio e diminui a sua disponibilidade para integração na placa bacteriana (MATHUR *et al.*, 2011).

#### **2.2.1.2 Cloreto de Cetilpiridínio**

O cloreto de cetilpiridínio (CCP) figura como o princípio ativo dos enxaguantes bucais de amplo uso, sendo utilizado nos Estados Unidos da América por mais de 70 anos (PARASKEVAS, 2005). Seu efeito inibitório sobre o biofilme da placa bacteriana foi descrito primeiramente por Schroeder e colaboradores, em 1962 (SEMENOFF *et al.*, 2008). Por ser um composto de amônio quaternário, ao serem carregados positivamente, tornam-se catiônicos e ligam-se com facilidade aos tecidos orais garantindo uma boa adsorção pelas estruturas da cavidade oral (PARASKEVAS, 2005).

O mecanismo de ação do CCP está relacionado ao aumento da permeabilidade da parede celular bacteriana, o que favorece a lise celular, diminui o metabolismo e a habilidade da bactéria de aderir-se à superfície dentária. Tais propriedades são atribuídas ao cloreto de cetilperidínio numa concentração de 0,05%, comum nos produtos comerciais (SEMENOFF *et al.*, 2008). O CCP demonstrou atividade antimicrobiana contra um amplo espectro de bactérias orais, porém, sua ação ocorre de maneira mais efetiva sobre as Gram positivas (JENKINS, 1994). Tal atividade é considerada igual ou melhor do que a clorexidina, ao passo que sua propriedade de inibição de placa é inferior.

Tal diferença pode estar relacionada a perda de parte de suas propriedades

antimicrobianas com sua adsorção nas superfícies. Além disso, o CCP apresenta menor eficácia clínica por possuir baixa substantividade, ou seja, por permanecer ativo por menos tempo na cavidade oral (TORRES *et al.*, 2000). Assim, apesar de apresentar uma maior retenção inicial, o CCP é eliminado da cavidade oral mais rapidamente. O que implica naduração de seu efeito terapêutico por um período, aproximado, de até 90 minutos, enquanto a clorexidina, pode atingir um período de até 7h (ALVES *et al.*, 2012).

Acredita-se que os enxaguantes a base de cloreto de cetilpiridíneo ocasionam um aumento significativo na redução da microbiota oral, em comparação aos enxaguatórios contendo compostos fenólicos, triclosan ou óleos essenciais (DINIZ, 2014). Porém, o uso prolongado do cloreto de cetilpiridíneo pode causar sensação de queimação, descoloração dos dentes, ulcerações recorrentes e aumento da formação do cálculo (GRANJEIRO, 1993)

### **2.2.1.3 Triclosan**

O Triclosan® [5-cloro-2- (2,4-diclorofenoxi) fenol] tem sido usado mundialmente há mais de 40 anos em muitas áreas, como produtos para cuidados pessoais e ambientes clínicos (GAO *et al.*, 2017). É um composto bifenólico, não iônico, lipossolúvel, com largo espectro de ação biocida que atua como inibidor do crescimento de fungos, vírus e, sobretudo bactérias. Essa substância apresenta, ainda, efeito anti-inflamatório (RELVAS, 2015). O triclosan pode ser encontrado no mercado, para uso odontológico, como integrante de colutórios ou dentifrícios na concentração de 0,2 a 0,3% (TORRES *et al.*, 2000).

O triclosan é muito utilizado em dentifrícios e atua na desorganização da membrana celular bacteriana, inibindo seu funcionamento enzimático (SEMENOFF *et al.*, 2008). Sua ação baseia-se na desorganização da membrana celular e inibição inespecífica de enzimas da membrana tanto de bactérias Gram positivas, quanto de Gram negativas e até mesmo sobre fungos. Tal ação depende de sua disponibilidade de concentração podendo esta ser bacteriostática, quando em concentrações baixas, ou bactericida, quando em concentrações elevadas (FOOD *et al.*, 2008). Ele inibe a incorporação e metabolismo da glicose por *Streptococcus mutans*, *S. sanguis* e *Actinomyces naeslundii*, e a atividade *in vitro* de proteases tipo tripsina de *Porphyromonas gingivalis* e *Capnocytophaga gingivalis* (TORRES *et al.*, 2000).

Alguns estudos realizados com *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* descreveram um efeito bacteriostático deste composto através da inibição da síntese de ácidos graxos, pelo bloqueio da enzima NADH dependente enoil [proteína transportadora de acil] redutase (FabI). A inibição dessa via afeta as outras vias biossintéticas dependentes desta enzima, como as de fosfolípidos, lipoproteínas e lipopolissacarídeos, que constituem a parede celular. A ligação do triclosan com a enzima FabI aumenta significativamente a afinidade da enzima pelo NAD<sup>+</sup>, ocorrendo a formação de um complexo ternário estável, onde o triclosan liga-se de modo irreversível ao sítio do substrato enoil (intermediário da via biossintética de ácidos gordos), inativando a enzima, o que resulta na inibição da síntese dos mesmos. (SCHWEIZER, 2001; FOOD *et al.*, 2008; RILEY E LAMONT, 2013). Além do efeito antimicrobiano direto, o triclosan apresenta ainda um efeito anti-inflamatório local, promovendo a inibição da formação de fatores mediadores de inflamação gengival, atuando sob TNF- $\alpha$ , interleucina-1 $\beta$  e prostaglandina E2 (RAUTEMAA *et al.*, 2007).

A eficácia na ação antiplaca e a substantividade do triclosan, *in vivo*, quando aplicado sozinho, são bastante limitadas (TORRES *et al.*, 2000). Na tentativa de suprir tais limitações são adotadas técnicas que busquem aumentar sua ação. Uma dessas técnicas é a adição de Gantrez, um copolímero que aumenta a retenção bucal e diminui o índice de liberação do triclosan. Outra técnica é a adição de citrato de zinco, um sal metálico que tem um efeito bactericida sinérgico com o triclosan, diminuindo a presença de bactérias anaeróbicas e espécies de *Actinomyces* na placa bacteriana, e facilitando a ação anti-enzimática bacteriana (SEMENOFF *et al.*, 2008; FOOD *et al.*, 2008; MARSH, 2010).

#### **2.2.1.4 Óleos Essenciais (Timol, Eucaliptol, Mentol, Etc.)**

O enxaguatório que apresenta o maior histórico de uso é composto por uma solução hidro-alcoólica dos óleos essenciais, o Listerine®. Sua eficácia é geralmente atribuída à sua atividade bactericida, porém, também demonstra-se efetivo no retardo da colonização bacteriana da superfície dental, além de inibição da agregação bacteriana de Gram positivos (DINIZ, 2014).

Constituídos pela mistura de óleos essenciais, como o timol, o mentol, o eucaliptol e o salicilato de metila acrescidos de cloreto de zinco, os enxaguantes a

base de óleos essenciais interferem na formação de cristais de fosfato de cálcio, no crescimento do cristal e na mineralização da placa bacteriana, minimizando assim a formação de tártaro. Seu mecanismo de ação consiste na desnaturação de proteínas bacterianas, alteração da permeabilidade da membrana externa de bactérias Gram negativas e quelação de cátions presentes no citoplasma bacteriano, resultando na inativação de enzimas. Além da atividade antimicrobiana, o Listerine® é capaz de exercer ação anti-inflamatória (GONÇALVES *et al.*, 2010).

A ação dos óleos essenciais é bem diminuída quando comparada às demais substâncias por apresentar uma baixa substantividade. Apesar disto, estudos de curta duração tem mostrado redução de placa e gengivite na média de 35%, e os estudos de longa duração tem mostrado uma redução de 25% na formação de placa e de 29% de gengivite (TORRES *et al.*, 2000). Segundo RAMOS *et al.* (2012), enxaguantes à base de óleos essenciais demonstram efetividade no controle de *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus mutans*, *Prevotella intermedia*, *Lactobacillus casei* e *Candida albicans*.

Ao uso dos enxaguantes à base de óleos essenciais e álcool são atribuídos efeitos adversos como sensação de queimação, ardência bucal e a possibilidade de causar sensação de queimação, gosto desagradável e o seu alto teor de álcool, que pode contribuir para injúrias à mucosa bucal (DINIZ, 2014).

### **2.2.1.5 Flúor**

As medidas profiláticas envolvendo os fluoretos na prevenção de lesões cariosas mostraram-se, ao longo do tempo, bastante eficientes (DIVARIS *et al.*, 2012). Frente a isso, atualmente, tais substâncias estão disponíveis em diferentes formas de aplicação e concentrações sendo considerada, na odontologia, uma estratégia eficaz para ajudar na remineralização dos dentes e “padrão ouro” para a prevenção da lesão cariosa (BENSON *et al.*, 2013).

Os enxaguantes bucais fluoretados podem ser composto de fluorofosfato acidulado, fluoreto de estanho, fluoreto de amônio e fluoreto de amina, são formulados em várias concentrações, sendo as principais disponíveis como 0,05% para uso diário e 0,2% para uso semanal (SANTOS *et al.*, 2019).

Sabe-se que fluoreto exerce seu efeito sobre as bactérias da cavidade bucal através da inibição das enzimas celulares e do aumento da permeabilidade do

próton ( $H^+$ ) nas membranas bacterianas sob a forma de fluoreto de hidrogênio (HF). O fluoreto difunde-se nas bactérias cariogênicas sob a forma de HF. Quando o pH extracelular se torna mais baixo, mais HF é formado e, maior quantidade desse composto se difunde para dentro da célula. No meio intracelular, devido ao seu maior pH, o HF se dissocia em  $H^+$  e  $F^-$ . Este processo contínuo provoca um acúmulo de flúor no citoplasma da célula e conseqüente redução do gradiente de prótons e da atividade enzimática (SANTOS *et al.*, 2019). Nesse momento, um colapso no gradiente de prótons transmembrana, reduz a capacidade bacteriana em transportar açúcares contra o gradiente de concentração. O flúor inibe a enolase, (enzima glicolítica que converte 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato, (SUTTON, BENDER, MARQUIS, 1987).

A síntese reduzida de fosfoenolpiruvato resulta na inibição do transporte de açúcares e na diminuição da síntese de ATP. Essa redução resulta na inibição da bomba de prótons transmembrana ( $H^+/ATPase$ ), envolvida na geração de gradientes de prótons através da extrusão de prótons da célula às custas de ATP (SANTOS *et al.*, 2019).

### **2.3 Antibioticoterapia e resistência bacteriana**

Antimicrobianos são compostos naturais ou sintéticos capazes de inibir o crescimento ou causar a morte de fungos ou bactérias. Tais compostos podem ser classificados como bactericidas quando causam morte da bactéria, ou bacteriostáticos, quando promovem a inibição de seu crescimento (WALSH, 2003). As primeiras descrições sobre o uso desses agentes datam de 4000 anos. Diversas civilizações antigas já conheciam as propriedades terapêuticas de mofo ou bolores e empregavam estes fungos no tratamento de feridas infectadas. Entretanto, foi somente a partir do século XIX, com o desenvolvimento da alquimia, que as drogas antimicrobianas passaram a ser obtidas por métodos laboratoriais (TAVARES, 2002).

Em 1910, Paul Ehrlich desenvolveu o primeiro antimicrobiano de origem sintética, a arsfenamina, comercializada sob o nome de Salvarsan®, usado contra sífilis, porém poucos progressos foram conseguidos nos 20 anos seguintes para o desenvolvimento de antimicrobianos, até a introdução da proflavina em 1934, agente amplamente utilizado na Segunda Guerra Mundial, principalmente contra infecções

de feridas profundas. Apesar deste avanço, o grande marco no tratamento das infecções bacterianas ocorreu com a descoberta da penicilina por Alexander Fleming, em 1929 (GUIMARÃES, MOMESSO, PUPO, 2010), mas somente em 1940 Chain, Florey e colaboradores conseguiram isolá-la das culturas do *Penicillium*, purificar o composto, e realizar os primeiros ensaios clínicos com a droga. A demonstração do efeito terapêutico da penicilina G estimulou a busca por novas substâncias originadas do metabolismo de microrganismos (FERNANDES, 2006). As pesquisas realizadas nos anos seguintes levaram à descoberta de uma grande gama de drogas com efeito antimicrobiano como a estreptomicina (1944), o cloranfenicol (1947), a clortetraciclina (1948), penicilinas semi-sintéticas (1958), cefalosporinas (1960) e as fluoroquinolonas (1980) (GILMAN, 2003; SCHIMIDT, 2004). Tais drogas representaram uma revolução no tratamento de doenças infecciosas (CALVO; MARTINEZ-MARTINES, 2009).

Atualmente, as principais classes de antimicrobianos em uso clínico compreendem substâncias de origem natural, derivados semi-sintéticos e os sintéticos. A atividade destes depende da sua ligação aos seus alvos bioquímicos, obedecendo a uma saturação suficiente para bloquear a função celular normal e deter o crescimento microbiano (FISHER, MEROUEH, MOBASHERY, 2006). Freitas *et al.* (2014) agrupa as drogas com ação antibacteriana em grupos conforme seu mecanismo de ação. Assim, estes podem ser classificados como inibidores da síntese de parede celular (Betalactâmicos, Carbapenêmicos e Monobactâmicos); inibidores da síntese de proteínas (Aminoglicosídeos, Tetraciclina, Cloranfenicol, Macrolídeos, Estreptograminas e Oxazolidinonas); inibidores da síntese de ácidos nucleicos (Quinolonas, Fluoroquinolonas e Rifamicinas); inibidores competitivos da síntese de metabólitos essenciais (Sulfonamidas) e aqueles que atuam gerando danos sobre a membrana plasmática (Polimixinas).

Embora a penicilina tenha se apresentado como um fármaco extremamente poderoso, após poucos anos de seu uso sistemático, ainda na década de 1950, pode-se observar o surgimento das primeiras linhagens de *Staphylococcus aureus* resistentes à penicilina em hospitais de Londres (GILMAN, 2003). Em meados de 1980, a resistência bacteriana continuava a crescer e a indústria não produzia novos agentes antimicrobianos como nos anos anteriores (APOLÔNIO; GAIA; COUTINHO, 2018). Desde então, o problema da resistência a antimicrobianos passou a representar uma importância considerável na saúde pública.

A resistência bacteriana é um fenômeno biológico natural que tem origem em uma resposta evolutiva desses microrganismos à exposição a agentes antimicrobianos (WRIGHT, 2007). As linhagens resistentes são caracterizadas como aquelas capazes de se multiplicar em presença de concentrações de antimicrobianos mais altas do que as que provém de doses terapêuticas dispensadas a humanos (WANNACHER, 2004). O aumento deste fenômeno ocorre pelo uso inadequado de substâncias antimicrobianas na prática médica, humana e veterinária, e em práticas de manejo empregadas na criação de animais para corte (NORMANNO *et al.*, 2007).

A resistência pode ocorrer de maneira intrínseca, normalmente gênero ou espécie-específica, o que determina o espectro de ação do antimicrobiano; ou de ser adquirida devido à exposição continuada a antimicrobianos através de mutações (deleções, inserções ou mutações de ponto), propagação clonal ou por transferência horizontal de genes de resistência localizados em elementos genéticos móveis (NORMARK, NORMARK, 2002). A transferência horizontal de genes pode ocorrer através de bacteriófagos (transdução), plasmídeos (conjugação) e inserção direta de DNA bacteriano de bactérias lisadas no ambiente (transformação) (JAWETZ *et al.*, 2001).

O mecanismo de resistência mais comumente apresentado pelas bactérias é o desenvolvimento de enzimas que degradam (beta-lactamases) ou alteram (aminoglicosídeoquinas) a estrutura química do agente antimicrobiano. Porém, outras estratégias podem ser utilizadas como: a modificação da permeabilidade da membrana externa ao fármaco –através de porinas, que facilitam a entrada de pequenas moléculas na célula e, passivamente, excluem drogas antimicrobianas; a alteração do sítio de ação – que parece ser o mais específico dos mecanismos de resistência. A resistência aos aminoglicosídeos está associada a uma perda ou alteração de uma proteína específica na subunidade 30S do ribossomo bacteriano, que atua como sítio de ligação em microrganismos suscetíveis; o desenvolvimento de uma via metabólica alternativa aquela inibida pelo fármaco e a super expressão de bombas de efluxo – onde ocorrer a produção de complexos de proteínas que atravessam toda a parede celular bacteriana, incluindo a membrana citoplasmática, e que, ativamente, promovem o efluxo dos antimicrobianos do interior da célula (WRIGHT, 2005; ACHOUAK *et al.*, 2001; LAMBERET, 2005; TAVARES, 2002; GOH *et al.* 2002).

## 2.4 Resistência cruzada e co-resistência aos antimicrobianos

Por um longo período, o uso indiscriminado de antimicrobianos na medicina humana e criação de animais figurou como a principal causa do fenômeno de resistência bacteriana. Contudo, nos últimos anos, preocupações surgiram sobre o uso de biocidas como um fator contribuinte para a ocorrência deste fenômeno. Tais preocupações baseiam-se no isolamento, *in vitro*, de bactérias com perfil de tolerância alterado após exposição a biocidas em níveis de concentração considerados menores que sua concentração inibitória mínima (RUSSELL, 2002).

O termo biocida é utilizado para identificar substâncias com ação esterilizante, desinfetante, antisséptica e sanitizante utilizadas no controle populacional microbiano através da inativação destes microrganismos (RUSSEL, 2002). O sucesso na prevenção de infecções nos dias de hoje é altamente preocupante, face o crescente fenômeno da resistência bacteriana aos antimicrobianos, considerando-se, sobretudo o prognóstico do paciente e evolução da doença já que a resistência a drogas está diretamente associada à possibilidade de alteração de virulência bacteriana (PEREIRA *et al.*, 2016; DIAS *et al.*, 2017). Os biocidas, destacam-se nesse cenário, como coadjuvantes para o sucesso do controle de infecções e são amplamente utilizados em hospitais, em fazendas, na indústria de alimentos e em casa para o controle de microrganismos (WEBBER *et al.*, 2015). Seus mecanismos de ação antibacteriana ainda são pouco esclarecidos, mas é provável que tenham múltiplos sítios de ação dentro de uma célula bacteriana. Atualmente, sabe-se que estes interagem com a parede celular, produzem alterações na membrana citoplasmática afetando sua integridade, dissipam a força motriz protônica, inibem enzimas, atuam como agentes alquilantes, reticulantes e intercalantes ou, de alguma outra forma, interagem com grupos químicos identificáveis na célula levando a dano celular (DENYER e STEWART, 1998, WEBBER *et al.*, 2015).

Vários genes que codificam tolerância a metais, resistência aos biocidas e aos antimicrobianos são comumente encontrados nos genes situados em elementos extracromossomais, o que resulta na chamada co-resistência (SUMMERS, 2002). A co-resistência é definida como dois ou mais genes de resistência geneticamente ligados, ou seja, os genes responsáveis por duas ou mais resistências estão localizados próximos em um elemento genético móvel (CHAPMAN, 2003).

Osman *et al.* (2010) isolaram uma bactéria aquática portadora de um plasmídeo que continha genes que conferiam resistência tanto a antimicrobianos quanto a metais como o cromo e cobalto. Devido ao estreito arranjo dos genes, é provável que estes estejam sujeitos, durante um processo de transferência gênica, a uma transmissão conjunta. Uma ligação genética da tolerância ao cobre codificada pelo gene *tcrB* e da resistência aos macrolídeos (*ermA*) e ao glicopeptídeos (*vanA*) foi observada por Hasman e Arestrup (2002) em *Enterococcus faecium* isolado de animais de pecuária. O que evidencia um fenômeno de co-resistência ao cobre e a antimicrobianos como os macrolídeos, comumente utilizados na medicina veterinária, e os glicopeptídeos, utilizados largamente no passado como promotor de crescimento para a produção animal. Sabe-se que glicopeptídeos, como a vancomicina, pertencem ao grupo de antimicrobianos de última instância na medicina humana. Assim, esta ligação genética poderia ser um exemplo de propagação de resistência induzida por cobre a antimicrobianos relevantes na medicina veterinária e humana (DI CESARE, ECKERT e CORNO, 2016).

Um segundo mecanismo potencial na seleção e proliferação de resistência aos antimicrobianos é uma resistência cruzada a essas substâncias. Neste caso, ocorrerá resistência a um antibiótico ao qual a bactéria nunca tenha sido exposta, que é consequência à resistência adquirida a um outro xenobiótico (BAKER–AUSTIN *et al.*, 2006). Na última década, vários trabalhos têm relatado bactérias resistentes aos antimicrobianos que possam surgir nos diferentes ambientes através de co-resistência ou resistência cruzada a xenobióticos como os biocidas (FILALI *et al.*, 2000; SUMMERS, 2002). Os mecanismos de resistência bacteriana aos antimicrobianos são bem compreendidos, no entanto, estudos detalhados sobre os mecanismos de resistência aos biocidas evidenciam certa inespecificidade. Contudo, sabe-se que pelo menos alguns mecanismos, como o sistema de efluxo, a alteração de permeabilidade e a modificação dos sítios de ação, são também aplicáveis a biocidas. O que permite sugerir a possibilidade de ocorrência de uma resistência cruzada entre antimicrobianos e biocidas. (WEBBER *et al.*, 2015).

Além disso, outro problema relacionado à resistência bacteriana é contaminação antropogênica do meio ambiente com metais pesados. A aquicultura e as práticas agrícolas contribuem para este problema através da utilização de metais como aditivos em rações, fertilizantes orgânicos e inorgânicos, pesticidas, produtos anti-incrustantes associados ao uso de antimicrobianos, a fim de limitar a

disseminação de infecções. Assim, comunidades bacterianas inteiras são expostas à combinação de metais pesados e antimicrobianos. Tal exposição pode promover a disseminação da resistência aos antimicrobianos por meio da co-seleção (SEILER e BERENDONK, 2012; DI CESARE, ECKERT e CORNO, 2016).

Segundo Roberts e Mullany (2010) a proximidade das células bacterianas no biofilme constitui um ambiente propício para a transferência horizontal de genes, o que pode levar a disseminação de genes de resistência entre os indivíduos. Apesar da presença dessa massa densa de microrganismos, em condições de saúde, a microbiota bucal co-existe harmonicamente com o hospedeiro. É nesse contexto de quebra de equilíbrio, seja por fatores do hospedeiro, como alterações hormonais, nas doenças, fluxo salivar, seja por fatores do ambiente como dieta, pH, potencial de oxi-redução, ou por fatores da própria microbiota como expressão de fatores de virulência, que o desenvolvimento de doenças da cavidade bucal, como a cárie e as doenças periodontais, pode ocorrer.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral:**

Avaliar, comparativamente a diversidade bacteriana cultivável incluindo a ocorrência de bactérias de interesse clínico-microbiológico transitórias na cavidade bucal, indicadoras de desequilíbrio microbiano em indivíduos que fazem ou não uso regular de enxaguantes bucais.

#### **3.2 Objetivos específicos:**

Avaliar características clinico-epidemiológicas e comportamentais de indivíduos que fazem o uso regular de enxaguantes bucais e sua percepção sobre o papel dos microrganismos na saúde bucal;

Avaliar qualitativa e quantitativamente a diversidade bacteriana na cavidade bucal de indivíduos sob o uso regular de enxaguantes bucais ou não a partir de culturas seletivas de amostras de saliva direcionadas ao estudo de bastonetes Gram negativos e Cocos Gram positivos representativos;

Isolar e identificar enterobactérias, bastonetes Gram negativos não fermentadores, estafilococos, enterococos e estreptococos a partir de amostras de saliva de indivíduos sob o uso regular ou não de enxaguantes bucais.

Estabelecer relação entre uso regular de enxaguantes bucais e perfil microbiano nas amostras de saliva de indivíduos sob o uso regular ou não de enxaguantes bucais.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Delineamento do estudo

Este é um estudo transversal, prospectivo e que foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Humanos da Universidade Federal de Juiz de Fora sob o parecer número 2.422.594/2013 (APÊNDICE A), no qual foram recrutados na comunidade, na cidade de Juiz de Fora, MG, 30 indivíduos adultos, com bom estado de saúde bucal. Após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE B), conforme resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, a saúde bucal foi aferida em avaliação clínica por cirurgiã dentista. Os participantes foram categorizados em 2 grupos: usuários (n= 15) ou não de antissépticos bucais (n=15). Entre os critérios de inclusão e exclusão citam-se idade superior a 18 anos, sem alterações naso-faríngeas, não tabagistas ou respiradores bucais, sem histórico de diabetes *mellitus*, doença renal, sem evidencia ou história recente de doenças respiratórias (bronquite, sinusite ou tonsilite). Mulheres grávidas ou em período lactante foram excluídas.

Em relação à saúde bucal, indivíduos sem histórico de gengivite, doença periodontal, ou com bolsas periodontais  $\geq 4$ mm, lesões cariosas ativas, língua saburrosa, portadores de próteses odontológicas, aparelhos ortodônticos fixos ou *piercings* linguais. Foram excluídos, ainda, indivíduos que fizeram uso de drogas antibacterianas nos últimos seis meses (NALÇACI & SÖNMEZ, 2008; BORDEN et al., 2002; STEENBERGHE et al., 2001).

As informações obtidas na avaliação clínica foram registradas em uma Ficha Clínica (APÊNDICE C), enquanto que os dados comportamentais e sóciodemográficos foram registrados em uma Ficha de Coleta de Informações (APÊNDICE D) que deu origem aos dois grupos de estudo: Grupo 1, denominado Grupo Controle, composto pelos voluntários não usuários de antisséptico bucal; e Grupo 2, composto pelos voluntários usuários regulares de antisséptico bucal. Neste estudo foi definido como usuário regular de antisséptico bucal, o indivíduo que declarou a utilização destas substâncias pelo menos uma vez ao dia, nos setes dias de uma semana.

## 4.2 Coleta de amostras de saliva e preparação para análises microbiológicas

Amostras de saliva foram obtidas por estimulação através da mastigação, durante 3 a 5 minutos, de uma fita de parafina inodora, insípida, incolor (JENSEN, et al., 1998; LENANDER-LUMIKARI et al., 1995) previamente esterilizada em autoclave. Transcorrido esse tempo a saliva, aproximadamente 3,5 mL, foi coletada em um frasco de plástico descartável, esterilizado, com tampa rosqueada. O material foi mantido a temperatura de 2° a 8° C e submetido ao processamento no prazo máximo de duas horas no Centro de Estudos em Microbiologia, o CEMIC, no Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia do ICB/UFJF.

## 4.3 Isolamento bacteriano

No laboratório, alíquotas de 1,0mL da amostra de saliva foram submetidas a agitação em vórtex e, em seguida, diluídas, por diluição seriada, em solução salina (NaCl 0,85%) estéril até a concentração de  $10^{-4}$ . Posteriormente, 0,1 mL de cada diluição foi inoculada por esgotamento em placas de petri, com o auxílio de alça de Drigalski, contendo ágar *Mitis Salivarius*, para o isolamento de *Streptococcus* e enterococcus, ágar *Eosina Azul de Metileno (Eosin Methylene Blue Ágar)*, EMB, para o isolamento de Gram negativos (enterobactérias e não fermentadores) e ágar Hipertônico Manitol, AHM, para o isolamento seletivo de *Staphylococcus*. Uma alíquota de 1mL da saliva sem diluição foi, ainda, inoculada em caldo tioglicolato suplementado com hemina e menadiona, para preservação do espécime original durante os experimentos de cultura seletiva. Os meios foram incubados a 37°C, por um período de 48 a 72 horas. As placas contendo AMS foram incubadas em atmosfera de microaerofilia em jarras de vidro, pela utilização do método da vela para produção de uma atmosfera de aproximadamente 5 a 7% de oxigênio.

Transcorrido o período de incubação, placas que demonstraram crescimento viável, entre 30 e 300 colônias, tiveram seus morfotipos quantificados e caracterizados de acordo com sua morfologia macroscópica obedecendo a critérios estabelecidos por Neder (1992), como tamanho; aspecto da borda; elevação; textura; brilho; pigmentação e aspecto (se cremoso, oleoso, mucoide, ressecado, pulverulento).

Posteriormente, três a cinco colônias de cada morfotipo foram transferidas

para obtenção de culturas puras em ágar *Brain Heart Infusion* (BHI) e incubado a 37 °C por 48 horas. As culturas obtidas foram avaliadas quanto o seu aspecto morfotintorial pela coloração de Gram e estocadas em freezer a -80°C, em caldo *Brucella* acrescido de glicerol (concentração final 10%), para estudos posteriores.

#### 4.4 Identificação presuntiva da amostra

A identificação presuntiva dos cocos Gram positivos foi realizada através da avaliação das características morfotintoriais após coloração de Gram, determinação da habilidade de hidrólise da esculina, produção de catalase, coagulase, fermentação do manitol e fermentação anaeróbia da glicose. A identificação presuntiva das bactérias Gram negativas foi realizada de acordo com as características morfotintoriais após coloração de Gram, assim como a habilidade de fermentar carboidratos, motilidade e produção de H<sub>2</sub>S.

As linhagens de referência de *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Escherichia coli* ATCC 25922 foram utilizadas como controles para bactérias Gram positivas ou Gram negativas, e todos os testes foram realizados em duplicata.

#### 4.5 Estudos de correlação e análise de dados

Para análise dos dados foi utilizado o pacote estatístico SPSS versão 22. Para as variáveis contínuas foram utilizadas medidas de tendência central (média e mediana) e de dispersão (desvio padrão), enquanto para as variáveis categóricas foram utilizadas distribuição percentual. Foi utilizado Teste t de *Student* e valores de *p* menores que 5% ( $p < 0,05$ ) foram considerados significantes.

A análise da variância (ANOVA) foi aplicada para comparar a distribuição e contagem de diferentes grupos bacterianos nos diferentes meios de culturas utilizados nas culturas seletivas comparativas entre os grupos de indivíduos. O nível de significância foi definido como  $p < 0,05$ .

O teste de ANOVA e o teste a posteriori de Tukey foram utilizados para comparações da densidade bacteriana, bem como para a comparação dos diferentes grupos nos espécimes de saliva amostrados. O nível estabelecido para significância dos testes utilizados será  $p < 0,05$ .

As análises de correlação foram realizados Testes de correlação de Spearman e Pearson. Nestes, valores de  $p$  menores que 5 % ( $p < 0,05$ ) foram considerados significativos. Para o coeficiente de correlação foram aceitos valores variando entre -1 e +1. Onde quanto maior for o valor absoluto do coeficiente, mais forte é a relação entre as variáveis. Nesse sentido, um valor absoluto de 1 indica uma relação linear perfeita enquanto, uma correlação perto de 0 indica que não há relação linear entre as variáveis. O sinal de cada coeficiente indica a direção da relação. Assim, variáveis com o coeficiente positivo tendem a aumentar ou diminuir em conjunto ao passo que, variáveis com o coeficiente é negativo tendem a aumentar à medida que as outras diminuem.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Características sociodemográficas, comportamentais e clínicas dos participantes

As características sociodemográficas dos 30 voluntários estão apresentadas na Tabela 1. A média de idade dos participantes foi de 22,3 anos e indivíduos do sexo feminino prevaleceram em ambos os grupos. De maneira semelhante, os participantes com ensino superior incompleto predominam tanto no grupo controle quanto no de usuários. Em contra partida, a renda mensal familiar mostrou-se determinante na utilização dos enxaguantes pelos participantes, uma vez que o maior percentual de utilização do produto foi encontrado no grupo com maior renda declarada.

**Tabela 1.** Características sociodemográficas do grupo de indivíduos amostrado

Parâmetros	Grupo de indivíduos	
	Controle, n=15	Usuários, n=15
Média de idade (anos ± DP)	22,3 ± 4,4	22,5 ± 4,5
Sexo (n; %)	Masculino	02 (13,3 %)
	Feminino	13 (86,7 %)
Escolaridade (n; %)	Médio completo	-
	Superior Incompleto	10 (66,7 %)
	Superior Completo	05 (33,3 %)
Renda em salários mínimos* (n; %)	1 a 2	01 (6,7 %)
	2 a 3	02 (13,4 %)
	3 a 4	02 (13,4 %)
	4 a 5	04 (26,6)
	>5	05 (33,3 %)
	Não declararam	01 (6,7 %)

\*Renda mensal em salários mínimos no Brasil em 2018 (R\$ 954,00).

As características comportamentais estudadas aparecem apresentadas na Tabela 2 e exploram aspectos da higiene bucal dos participantes e os critérios utilizados na escolha dos seus produtos de higiene bucal. Os resultados encontrados mostram que indivíduos não usuários de enxaguantes bucais, o grupo controle, apresentam hábitos mais frequentes de higienização bucal e que, a utilização de tais produtos, não ocorre em detrimento aos processos mecânicos de higienização. Quanto aos critérios utilizados na escolha dos produtos de higiene bucal os participantes indicaram como determinantes para a compra o preço e a marca. Em menor escala foram citados a indicação de um profissional odontólogo e, apenas no grupo controle, foi relatada a preocupação com a formulação do produto e a escolha por produtos que não contenham agentes antimicrobianos em sua composição.

**Tabela 2.** Características comportamentais

Variáveis	Grupo de indivíduos		
	Controle, n=15	Usuários, n=15	
Frequência de escovação (n; %)	3 x dia	14 (93,3 %)	12 (80 %)
	2 x dia	-	02 (13,3 %)
	Após as refeições	01 (6,7 %)	01 (6,7 %)
Frequência de utilização do fio dental (n; %)	1 x dia	09 (60 %)	11 (73,2 %)
	2 x dia	02 (13,3 %)	01 (6,7 %)
	3 x dia	-	01 (6,7 %)
	2 x semana	-	01 (6,7 %)
	3 a 4 x semana	01 (6,7 %)	-
	Não utilizam	02 (13,3 %)	01 (6,7 %)
	Não declararam	01 (6,7 %)	-
	Critérios utilizados para aquisição dos produtos (n; %)	Preço	07 (46,6 %)
Marca		02 (13,3 %)	04 (26,7 %)
Indicação profissional		01 (6,7 %)	01 (6,7 %)
Princípio ativo		01 (6,7 %)	-
Não declararam		04 (26,7 %)	02 (13,3 %)

Após inspeção da cavidade bucal os participantes tiveram suas condições de higiene bucal classificadas como boa, regular ou ruim. Tais resultados, e demais características clínicas, dos participantes são apresentados na Tabela 3. Foram observadas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) nas variáveis de nível de controle de placa, impacção alimentar e presença de cálculo dental. Esses resultados, evidenciaram uma tendência de piora da condição bucal nos indivíduos do grupo controle relacionados ao aumento da ocorrência de placa dental e situação de impacção alimentar. Em contrapartida, a presença de cálculo dental foi mais evidenciada nos usuários regulares de enxaguante bucal, o que podem estar relacionado a diferença nos hábitos de higienização bucal pelo binômio fio-escova, ou até mesmo a eficácia deste. Não foram observadas alterações da mucosa em nenhum dos grupos de estudo.

**Tabela 3.** Classificação da condição bucal e características clínicas

Variáveis (n; %)		Grupo de indivíduos	
		Controle, n=15	Usuários, n=15
Nível de Controle de Placa	Bom	11 (73,3 %)	12 (80 %)
	Regular	04 (26,7 %)	03 (20%)
	Ruim	-	-
Presença Impacção alimentar	Sim	07 (46,7 %)	03 (20%)
	Não	08 (53,3 %)	12 (80 %)
Presença Cálculo	Sim	02 (13,3 %)	03 (20%)
	Não	13 (86,7 %)	12 (80 %)
Alteração nas mucosas	Sim	-	-
	Não	15 (100 %)	15 (100 %)

## 5.2 Estudos de avaliação da diversidade bacteriana

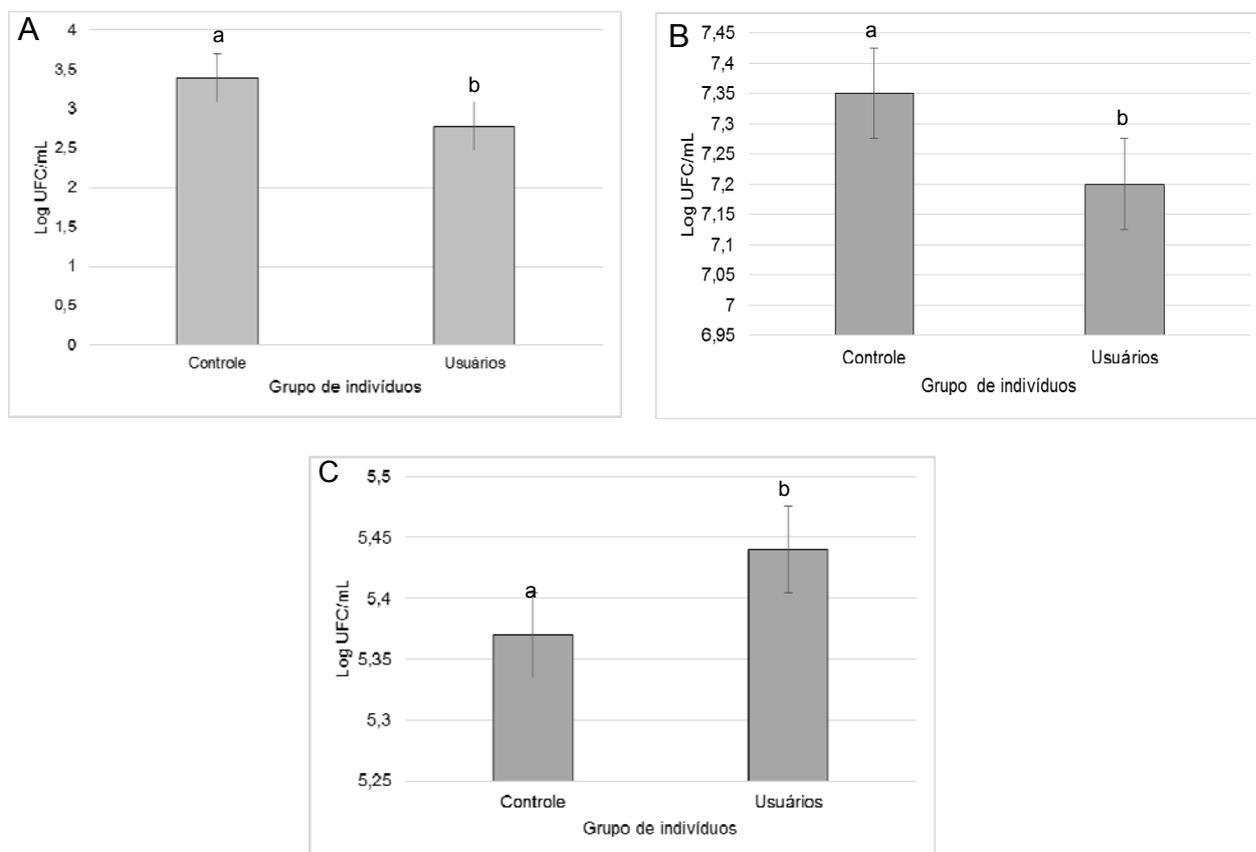
Nas culturas seletivas, foi observado crescimento bacteriano nos diferentes meios utilizados. Do ponto de vista quantitativo, foram observadas maiores contagens médias de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) nos meios AMS e EMB, respectivamente, a partir da saliva dos indivíduos de ambos os grupos (Tabela 4). Contudo, observou-se menores valores na contagem média de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) a partir da saliva dos indivíduos usuários

de enxaguates nos meios AHM e AMS. Valores menores foram mais observados no meio AHM, sendo acompanhada de um aumento na contagem média de unidades formadoras de colônias (UFC/ mL) no meio EMB. Figuras 1.

**Tabela 4.** Distribuição quantitativa dos microrganismos em culturas seletivas.

Cultura Seletiva (meio)	Contagem média de Unidades Formadoras de Colônias (Log UFC/mL)		Valor de $P^*$
	Controle, n=15	Usuários, n=15	
Ágar Hipertônico Manitol	3,39	2,78	0,046
Ágar <i>Mitis Salivarius</i>	7,35	7,20	0,01
Ágar Eosina Azul de Metileno	5,37	5,44	0,001

\* Teste de Tukey



**Figura 1** - Contagem média de Unidades Formadoras de Colônias por meio de Isolamento. As letras a e b indicam diferença significativa entre os grupos de estudo ( $p < 0.05$ ). A: Ágar Hipertônico Manitol; B: Ágar *Mitis Salivarius*; C: Ágar Eosina Azul de Metileno.

De maneira geral, foi observado crescimento bacteriano diferencial nos meios de cultura utilizados, a partir dos espécimes de saliva obtidos nos dois grupos de indivíduos, usuários ou não usuários de enxaguantes bucais. As culturas que apresentaram crescimento viável tiveram suas colônias contabilizadas e caracterizadas dando resultando em 32 morfotipos e 407 isolados. Destas, 218 foram isoladas do AMS, 93 foram isoladas do AHM e 90 foram isoladas do EMB (Tabela 5).

**Tabela 5.** Caracterização e ocorrência geral (%) dos morfotipos isolados em Ágar *Mitis Salivarius*.

Meio de cultura	Morfotipo	Características	Ocorrência N (%)
AMS	M31	Tamanho grande ( $\geq 5$ mm), forma irregular, elevação do tipo protuberante, estrutura lisa, brilho translúcido, pigmentada em azul claro, de aspecto úmido e Gram Positivas.	12 (2,95)
	M32	Tamanho médio (2 a 5 mm), forma irregular, elevação do tipo protuberante, estrutura lisa, brilho translúcido, pigmentada em azul claro, de aspecto úmido e Gram Positivas.	52 (12,78)
	M33	Tamanho médio (2 a 5 mm), com borda circular, elevação do tipo achatada, estrutura lisa, brilho opaco, pigmentada em azul, com aspecto úmido e Gram Positivas	64 (15,72)
	M34	Tamanho pequeno ( $\leq 2$ mm), com borda circular, elevação do tipo convexa, estrutura lisa, brilho opaco, pigmentada em azul, com aspecto úmido e Gram Positivas	75 (18,43)
	M35	Tamanho pequeno ( $\leq 2$ mm), com borda circular, elevação do tipo achatada, estrutura lisa, brilho opaco, pigmentada em azul, com aspecto úmido e Gram Positivas	03 (0,74)
	M36	Tamanho pequeno ( $\leq 2$ mm), com borda irregular, elevação do tipo protuberante, estrutura lisa, brilho translúcido, pigmentada em azul claro, com aspecto úmido e Gram Positivas	06 (1,47)
	M39	Tamanho pequeno ( $\leq 2$ mm), com borda circular, elevação do tipo convexa, estrutura lisa, brilho opaca, pigmentadas em róseo, com aspecto viscoso e Gram Positivas	03 (0,74)
	M42	Tamanho pequeno ( $\leq 2$ mm), puntiforme, elevação do tipo convexa, estrutura lisa, brilho translúcido, pigmentada em azul claro, com aspecto úmido e Gram Positivas	03 (0,74)

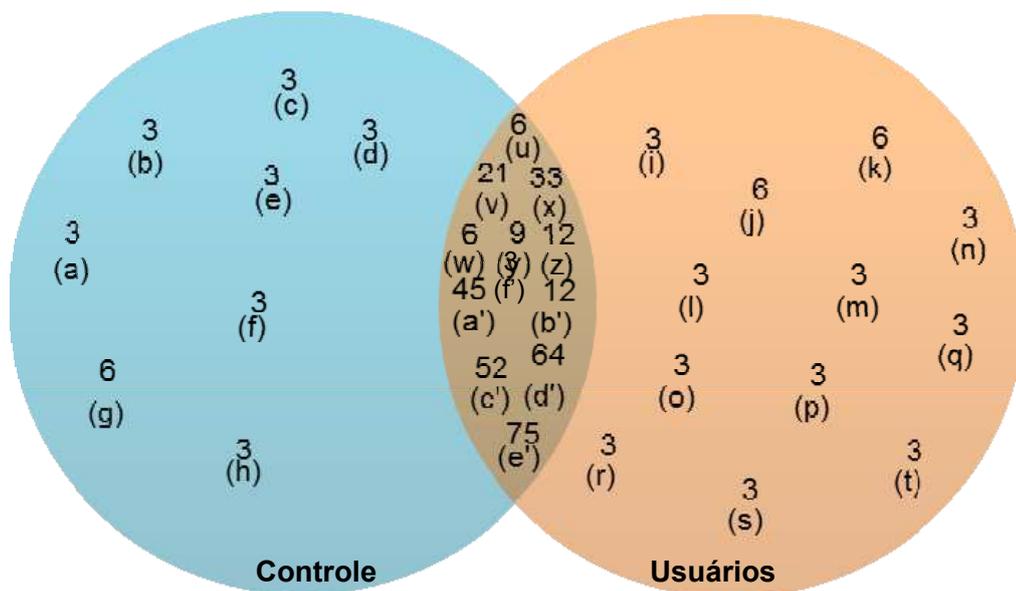
**Tabela 6.** Caracterização e ocorrência geral (%) dos morfotipos isolados em Ágar Hipertônico Manitol.

Meio de cultura	Morfotipo	Características	Ocorrência n (%)
	M1	Tamanho grande ( $\geq 5$ mm), com borda rizoide, elevação do tipo achatada, estrutura filamentosa, brilho translúcido, pigmentadas em amarelo, com aspecto membranoso e Gram Positivas	06 (1,47)
	M3	Tamanho grande ( $\geq 5$ mm), com borda circular, elevação do tipo convexa, estrutura lisa, brilho opaco, pigmentadas em amarelo, com aspecto viscoso e Gram Positivas	06 (1,47)
	M4	Tamanho médio (2 a 5 mm), com borda circular, elevação do tipo convexa, estrutura lisa, brilho opaco, pigmentadas em amarelo, com aspecto viscoso e Gram Positivas	21 (5,16)
	M5	Tamanho médio (2 a 5 mm), com borda circular, elevação do tipo convexa, estrutura lisa, brilho opaco, pigmentadas em amarelo exibindo um halo, com aspecto viscoso e Gram Positivas	03 (0,74)
	M6	Tamanho médio (2 a 5 mm), com borda circular, elevação do tipo convexa, estrutura lisa, brilho opaco, pigmentadas em branco/róseo, com aspecto viscoso e Gram Positivas	33 (8,11)
AHM	M7	Tamanho médio (2 a 5 mm), com borda circular, elevação do tipo convexa, estrutura lisa, brilho transparente, pigmentadas em rosa, com aspecto úmido e Gram Positivas	03 (0,74)
	M8	Tamanho pequeno ( $\leq 2$ mm), com borda circular, elevação do tipo convexa, estrutura lisa, brilho opaco, pigmentadas em amarelo, com aspecto viscoso e Gram Positivas	03 (0,74)
	M9	Tamanho pequeno ( $\leq 2$ mm), com borda circular, elevação do tipo convexa, estrutura lisa, brilho opaco, pigmentadas em amarelo, com aspecto úmido e Gram Positivas	06 (1,47)
	M10	Tamanho pequeno ( $\leq 2$ mm), com borda circular, elevação do tipo convexa, estrutura lisa, brilho opaco, pigmentadas em amarelo-pálido, com aspecto viscoso e Gram Positivas	03 (0,74)
	M11	Tamanho pequeno ( $\leq 2$ mm), com borda circular, elevação do tipo convexa, estrutura lisa, brilho opaco, pigmentadas em branco/róseo, com aspecto viscoso e Gram Positivas	06 (1,47)
	M12	Tamanho pequeno ( $\leq 2$ mm), com borda irregular, elevação do tipo elevada, estrutura lisa, brilho transparente, pigmentadas rosa, com aspecto viscoso e Gram Positivas	03 (0,74)

**Tabela 7.** Caracterização e ocorrência geral (%) dos morfotipos isolados em Ágar Eosina Azul de Metileno.

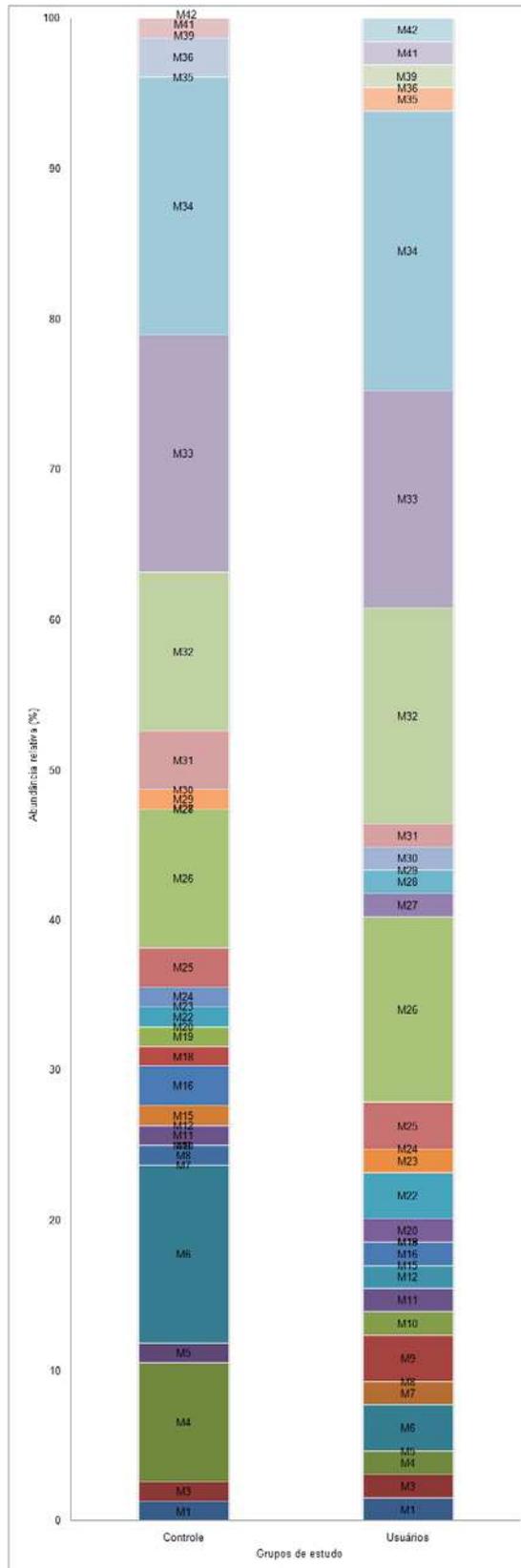
Meio de cultura	Morfotipo	Características	Ocorrência (%)
EMB	M18	Tamanho grande ( $\geq 5$ mm), com borda circular, elevação do tipo convexa, estrutura lisa, brilho opaco, pigmentada em rosa, com aspecto úmido e Gram Negativas	03 (0,74)
	M19	Tamanho médio (2 a 5mm), com borda circular, elevação do tipo convexa, estrutura lisa, brilho opaco, pigmentada em rosa, com aspecto gelatinoso e Gram Negativas	03 (0,74)
	M20	Tamanho pequeno ( $\leq 2$ mm), com borda circular, elevação do tipo achatada, estrutura lisa, brilho opaco, pigmentada em roxo, com aspecto seco e Gram Negativas	03 (0,74)
	M22	Tamanho pequeno ( $\leq 2$ mm), com borda circular, elevação do tipo convexa, estrutura lisa, brilho opaco, pigmentada em roxo, com aspecto úmido e Gram Negativas	09 (2,21)
	M23	Tamanho pequeno ( $\leq 2$ mm), com borda circular, elevação do tipo convexa, estrutura lisa, brilho transparente, não pigmentada, com aspecto seco e Gram Negativas	03 (0,74)
	M24	Tamanho pequeno ( $\leq 2$ mm), com forma filamentosa, elevação do tipo elevada, estrutura rugosa, brilho opaco, pigmentada em roxo, com aspecto seco e Gram Negativas	03 (0,74)
	M25	Tamanho pequeno ( $\leq 2$ mm), com forma irregular, elevação do tipo protuberante, estrutura rugosa, brilho opaco, pigmentada em roxo, com aspecto membranoso e Gram Negativas	12 (2,95)
	M26	Tamanho pequeno ( $\leq 2$ mm), puntiforme, elevação do tipo convexa, estrutura lisa, brilho transparente, não pigmentada, com aspecto seco e Gram Negativas	45 (11,06)
	M27	Tamanho pequeno ( $\leq 2$ mm), com forma irregular, elevação do tipo elevada, estrutura rugosa, brilho transparente, pigmentada em roxo, com aspecto leitoso e Gram Negativas	03 (0,74)
	M28	Tamanho médio (2 a 5 mm), com forma irregular, elevação do tipo protuberante, estrutura rugosa, brilho opaco, pigmentada em roxo, com aspecto membranoso e Gram Negativas	03 (0,74)
	M29	Tamanho médio (2 a 5 mm), com forma rizoide, elevação do tipo elevada, estrutura rugosa, brilho opaco, pigmentada em roxo, com aspecto viscoso e Gram Negativas	03 (0,74)
	M30	Tamanho médio (2 a 5 mm), com borda circular, elevação do tipo ondulada, estrutura lisa, brilho opaco, pigmentada em roxo, com aspecto úmido e Gram Negativas	03 (0,74)
	M41	Tamanho pequeno ( $\leq 2$ mm), circular, elevação do tipo convexa, estrutura lisa, brilho opaco, pigmentada em rosa, com aspecto úmido e Gram Negativas	03 (0,74)

A avaliação da distribuição bacteriana, por morfotipos observados, independentemente da sua identificação, sugere uma distribuição diferencial entre os grupos de indivíduos amostrados, em função do hábito de utilização ou não de enxaguantes bucais. Os usuários apresentaram, de maneira exclusiva, 12 morfotipos. Em contrapartida, o número de morfotipos exclusivos apresentados pelo grupo controle foi de apenas 8. Ainda pode-se observar a existência de um grupo comum, formado por 12 morfotipos, entre os grupos testados. Figura 2.



**Figura 2** – Diagrama de Venn representativo da diversidade de morfotipos, agrupamento qualitativo e ocorrência absoluta, de acordo com sua ocorrência exclusiva e compartilhada entre indivíduos dos grupos de estudo. a: M5; b: M8; c: M18; d: M19; e: M24; f: M29; g: M36; h: M39; i: M7; j: M9; k: M10; l: M12; m: M20; n: M23; o: M27; p: M28; q: M30; r: M35; s: M41; t: M42; u: M1; v: M4; x: M6; w: M11; y: M22; z: M25; a': M26; b': M31; c': M32; d': M33; e': M34; f: M3.

Ainda nesse sentido, considerando a ocorrência geral dos morfotipos isolados, pode-se observar uma redução da ocorrência e até mesmo ausência de crescimento de alguns morfotipos o que poderia sugerir uma alteração global na diversidade bacteriana associada ao uso frequente de enxaguantes bucais. Figura 3.



**Figura 3** – Estrutura da comunidade bacteriana bucal a partir de cultura seletiva e contagem de UFC/mL, de amostras de saliva de indivíduos controle ou usuários regulares de enxaguantes bucais baseado na observação de morfotipos coloniais nos meios de cultura Ágar Hipertônico Manitol, Ágar *Mitis Salivarius* e Ágar Eosina Azul de Metileno.

Pela aplicação do Teste de Correlação de Pearson foi observada correlação significativa ( $p < 0,05$ ) entre os dois grupos avaliados (correlação positiva,  $r = 0,942$ ). Essa correlação permite sugerir que o uso contínuo de enxaguantes bucais favorece a modificação da comunidade bacteriana estudada.

### 5.3 Identificação presuntiva dos morfotipos isolados

Testes bioquímicos foram utilizados para a identificação presuntiva dos morfotipos isolados e sua classificação em grupos bacterianos. No total, foram isoladas 407 amostras bacterianas que, após identificação presuntiva, foram identificadas como pertencentes a 05 grandes grupos. O grupo de maior predominância foi o dos Bacilos entéricos gram-negativos (BGN), que agrupou 13 morfotipos, seguido pelo grupo dos *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP) com 07 morfotipos, dos *S. viridans* (SGV) e *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN), ambos com 05 morfotipos e, com uma menor predominância, o grupo dos *Enterococcus* (ENT), com 02 morfotipos isolados.

As análises de níveis populacionais evidenciaram diferenças significativas,  $p < 0,05$ , entre os grupos analisados demonstrando predominância dos grupos *Enterococcus*, *Staphylococcus* coagulase negativa e *Staphylococcus* coagulase positiva tanto no grupo controle como no grupo de estudo. Tabela 8.

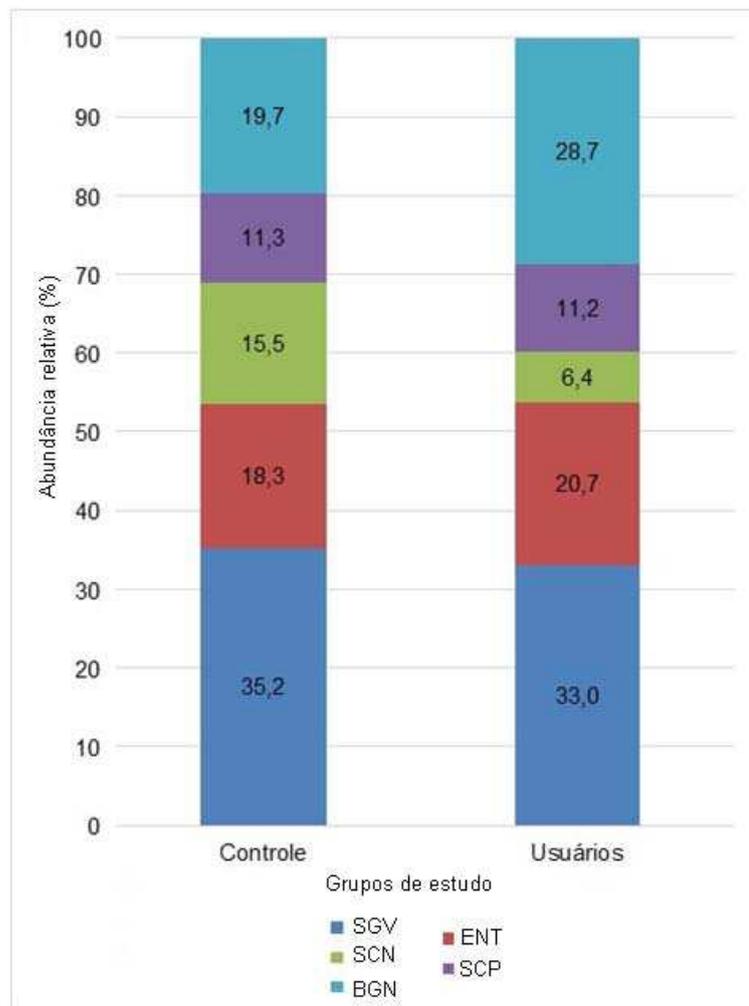
**Tabela 8.** Distribuição quantitativa dos microrganismos em grupos bacterianos.

Grupo bacteriano	Contagem média de Unidades Formadoras de Colônias (Log UFC/mL)		Valor de $P^*$
	Controle, n=15	Usuários, n=15	
<i>Streptococcus viridans</i>	2,64	1,62	0,041
<i>Enterococcus</i>	6,49	4,21	0,039
<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa	4,00	5,46	0,026
<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	7,89	4,66	0,003
Bacilos entéricos Gram negativos	2,00	2,80	0,037

\* Teste de Tukey

Considerando-se a ocorrência e a distribuição por abundância relativa dos morfotipos dentro de cada grupo bacteriano pode-se observar uma alteração no padrão de distribuição destas bactérias no ecossistema bucal nos indivíduos dos grupos de acordo com a utilização ou não de antisséptico bucal ( $p < 0,05$ ). Essa alteração apenas não foi significativa para o grupo do *Staphylococcus* coagulase positiva. Figura 4.

Entre os grupos bacterianos amostrados, foi observado, em geral, um maior aumento na frequência média de ocorrência e contagem de bastonetes Gram negativos entéricos no grupo de indivíduos usuários de antissépticos bucais. Oposto foi observado para os isolados presuntivamente identificados como *Staphylococcus* coagulase negativa.

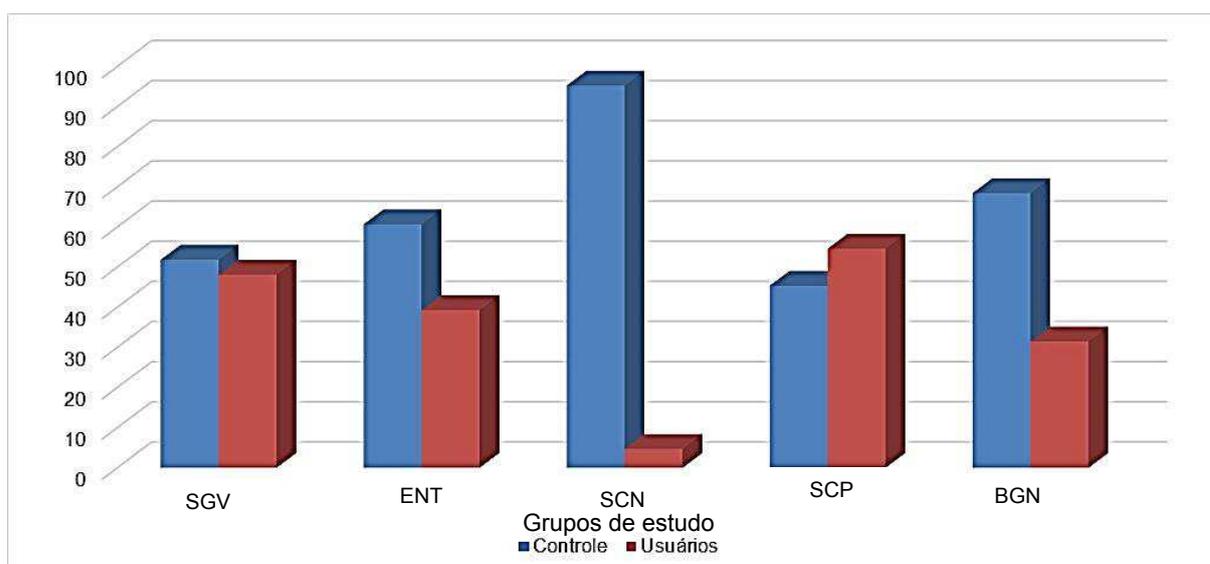


**Figura 4** - Estrutura da comunidade bacteriana bucal a partir de cultura seletiva e contagem de UFC/mL, de amostras de saliva de indivíduos controle ou usuários regulares de antissépticos bucais, baseado na identificação por grupos bacterianos. SGV - *Streptococcus* do grupo *viridans*; SCN - *Staphylococcus* coagulase negativa; BGN - Enterobactérias; ENT - *Enterococcus*; SCP - *Staphylococcus* coagulase positiva.

## 5.4 Diversidade dos grupos bacterianos

Embora neste estudo tenha sido realizada apenas a identificação presuntiva para estabelecimento de grandes grupos bacterianos (enterobacterias, enterococos, estreptococos do grupo víridans e estafilococcus coagulase positiva e negativa), uma análise de estimativa de diversidade de morfotipos foi realizada nos grupos identificados em relação à descrição e agrupamento bacteriano baseado nas características coloniais e microscópicas. Para isso, foi realizado o cálculo através da razão entre a contagem de UFC/mL de saliva coletada nos grupos e o número morfotipos exclusivos encontrados em cada grupo de identificação. .

A partir dessa medida, foi observado uma estimativa maior de diversidade dos grupos SGV, ENT, SCN e BGN entre os indivíduos do grupo controle. Essa estimativa apenas mostrou-se reduzida no grupo SCP.



**Figura 5** - Estimativa da diversidade dos grupos bacterianos de indivíduos controle ou usuários regulares de antissépticos bucais. SGV - *Streptococcus* do grupo *viridans*; ENT – *Enterococcus*; SCN – *Staphylococcus* coagulase negativa; SCP – *Staphylococcus* coagulase positiva; BGN – Enterobacterias.

## 6 DISCUSSÃO

A cavidade bucal constitui um sítio anatômico peculiar. Suas características permitem o desenvolvimento de uma comunidade microbiana típica, bastante diversificada e susceptível a uma enorme gama de alterações. A superfície bucal é revestida pela saliva que além de exercer atividade umidificante, lubrificante, tamponante e antimicrobiana (LEUNG *et al.*, 2000) abriga a microbiota salivar que desempenha importante papel na prevenção da colonização por bactérias exógenas ou patogênicas. Nesse sentido, todos os voluntários participantes eram adultos jovens e sem doença periodontal ou sob uso de próteses, logo, portadores de microbiota indígena bem estabelecida com predomínio de cocos gram positivos do grupo *Viridans* como descrito por FREITAS *et al.* 2014.

A resistência aos antimicrobianos é um importante problema de saúde pública e vastos recursos são investidos na pesquisa de novas formas de combatê-lo. Trabalhos experimentais recentes mostraram que a resistência a algumas drogas pode resultar em maior susceptibilidade a outros, nomeadamente induzir a sensibilidade cruzada (OBOLSKI, 2016). É nesse cenário que os enxaguantes bucais com potencial antimicrobiano são merecedores de maior atenção considerando seu potencial como agente de pressão seletiva sobre microrganismos e promotor do processo de disbiose.

O registro mais antigo da utilização de antissépticos bucais como coadjuvante no tratamento odontológico remota à medicina chinesa, por volta de 2 700 a. C (ASADOORIAN, 2006). Desde então, os antissépticos tem sido utilizados como coadjuvantes em processos relacionados à má higienização mecânica para controle e remoção do biofilme placa bacteriana na cavidade bucal (BARNETT, 2003; GONZÁLEZ *et al.*, 2014). Contudo, foi atualmente que uma grande quantidade de antissépticos bucais, de diferentes marcas e composições, ganharam as prateleiras dos mercados e tiveram sua comercialização ampliada devido ao comportamento dos consumidores, fatores culturais e de marketing (GOMES, 2007). Seguindo essa tendência, a renda mensal familiar mostrou-se determinante na utilização dos antissépticos uma vez que os participantes usuários deste, 92,4%, declararam renda mensal acima de 4 salários mínimos. Corroborando nesse sentido, todos os voluntários do grupo controle declaram não utilizar o produto por seu preço elevado. Quanto aos critérios utilizados para a escolha dos produtos de higiene

bucal foram mais apontadas as variáveis de preço e marca. Dados semelhantes foram descritos por Davoglio *et al.*, (2009) e Bordin, (2017) ao afirmarem que os fatores sócio-econômicos atuam como elementos diferenciadores nas ações de manutenção à saúde.

A avaliação das características comportamentais evidenciou uma frequência maior de higienização com a utilização do binômio-escova pelos indivíduos do grupo controle. Porém, tais características sua eficiência questionadas uma vez que indivíduos do grupo controle demonstram, em exame clínico por profissional especializado, uma tendência de piora da condição bucal relacionada ao aumento da ocorrência de placa dental e situação de impacção alimentar. A relação entre tais resultados, processo de higienização ineficiente e a ocorrência de impacção alimentar já fora descrito por Mendes *et al.*, (2016) ao afirmar que o desenvolvimento de cárie dentária é altamente dependente do estilo de vida e da qualidade da higiene bucal de um indivíduo. Kubo, 2011, afirma em um de seus trabalhos que a utilização de fio dental é um elemento indispensável à escovação dos dentes. Tais resultados permitem sugerir que os antissépticos bucais exercem pouco efeito sobre a qualidade do processo de higienização quando comparados a um processo de remoção mecânico efetivo e eficiente do biofilme dentário. Em consonância, Casais *et al.*, em 2013, afirmam que o debridamento do biofilme em seus estágios iniciais garante uma higienização mais eficiente uma vez que retarda as próximas fases do processo de instalação do biofilme.

Após o processamento das amostras observou-se menores valores na contagem média UFC/ mL a partir da saliva dos indivíduos usuários de antissépticos nos meios AHM e AMS, destinados ao isolamento de bactérias gram positivas. A redução nesses valores foi mais expressiva no meio AHM, sendo acompanhada de um aumento na contagem média de unidades formadoras de colônias no meio EMB. A alteração desses valores permite inferir uma ação efetiva dos antissépticos bucais sobre a microbiota bucal. Segundo Lotufo *et al.* (2001) a microbiota bucal é constituída em sua grande maioria por organismos gram positivos, especialmente *Streptococcus spp*, e em uma menor frequência, por bactérias Gram negativas. Esses resultados permitem também confirmar a eficácia da ação dos antissépticos sobre os microrganismos relacionados ao processo de instalação e desenvolvimento da cárie (NOCE, 2011). O incremento observado nos números dos microrganismos Gram negativos acompanhado da redução do grupo anteriormente citado evidencia

o papel da microbiota autóctone como barreira à colonização e implantação de espécies patogênicas estranhas a essa microbiota ou mesmo a proliferação de espécies consideradas suplementar (DE LORENZO, 2004).

A quantificação, caracterização e análise da distribuição relativa dos isolados de acordo com sua macro morfologia sugere uma distribuição diferencial de morfotipos bacterianos entre os 2 grupos de indivíduos amostrados, em função do hábito de utilização ou não de antissépticos bucais. Essa distribuição evidencia uma maior variedade morfotípica nos indivíduos usuários regulares de antisséptico quando comparados aos indivíduos do grupo controle. Cabe ressaltar que a caracterização morfotípica não reflete dados de uma identificação de espécies ou grupos, uma vez que uma mesma espécie pode, de acordo as condições a que é submetida, apresentar características morfológicas colônias distintas (NEDER, 1992). Assim, pode-se afirmar que os componentes de uma microbiota bucal submetidos ao stress de pressão seletiva pelo uso de antissépticos tendem a expressar, em situações de isolamento, uma maior variabilidade morfotípica quando comparados ao grupo controle (MARSH, 2011).

No que tange a ocorrência geral dos morfotipos isolados, os dados apresentados permitiram observar a ação dos antissépticos reduzindo, ou até mesmo inibindo, o crescimento de alguns morfotipos o que poderia evidenciar uma redução bacteriana associada ao uso frequente de antissépticos bucais. Contudo, essa redução não ocorre considerando o caráter dinâmico das populações bacterianas autóctones e seu potencial regulador da colonização de um sítio anatômico (MARSH, 2010). Nesse sentido, foi observado uma relação diretamente proporcional entre o uso de antissépticos bucais e a modificação da comunidade bacteriana. Assim, neste estudo, foram identificados 12 morfotipos de ocorrência exclusiva no grupo dos usuários de antissépticos, 08 morfotipos de ocorrência exclusiva no grupo controle e 12 morfotipos, entre os grupos testados. Tais achados sugeriram o uso do antisséptico como uma ação promotora da alteração da comunidade bacteriana na cavidade bucal. Nesse sentido, foi observada uma relação direta entre a utilização de tal produto, a diminuição da população bacteriana e o aumento da variedade de morfotipos observados.

As observações quanto às identificações presuntivas dos isolados por grupos bacterianos demonstraram que um mesmo grupo bacteriano pode apresentar características morfológicas bastante diversas sob diferentes condições ambientais

e de estresse, como aquelas encontradas no ecossistema bucal. Tal fato já fora descrito por ZAWADZKI et al (2017) ao descrever a ação da temperatura, do pH, das condições de oxigenação e da disponibilidade de nutrientes como fatores que influenciam no crescimento da microbiota oral. Relvas (2015) destaca ainda a qualidade dos processos de higienização como critério para o estabelecimento de uma microbiota funcional. Os testes de identificações permitiram o agrupamento dos 32 morfotipos identificados em 05 grandes grupos bacterianos. As maiores contagens médias de UFC/mL foram nos grupos relacionados ao *Streptococcus viridans* e *Enterococcus*, seguidos pelos *Staphylococcus* coagulase negativa e *Staphylococcus aureus* e pelos Bacilos Entéricos Gram-Negativos. Tais contagens corroboram com o apresentado por Scannapieco (2013) ao caracterizar a ocorrência de grupos bacterianos na cavidade bucal. Esses valores seguiram a mesma tendência observada na distribuição por morfotipo. Assim, a redução populacional nos grupos SGV, ENT e SCP, microrganismos considerados normalmente inócuos quando controlados pelos métodos de higienização adequados, favoreceram a proliferação dos grupos dos SCN e, em menor proporção daqueles relacionados ao BGN. Grupos esses, relacionados a processos patogênicos. Os SCN, comum em mucosas e tecido epitelial, quando na cavidade bucal, exerce importante função na patogênese da doença periodontal e, segundo DOS SANTOS *et al.*, (2017) a ocorrência de microrganismos em grande quantidade, não comuns na cavidade bucal, favorecem a manutenção das infecções bucais. De maneira semelhante a proliferação dos BGN nos biofilmes pode contribuir para a inflamação periodontal, a endocardite bacteriana, halitose, infecção endodôntica e actinomicose podendo impactar negativamente a saúde geral de um indivíduo. (RELVAS, 2015).

A ocorrência dos SCP identificadas na presente pesquisa pode não corresponder aos achados da literatura em função do espécime clínico, saliva, ser obtido de regiões diferentes de seu sítio de colonização. Embora tal grupo já tenha sido descrito por Pace e Andrade (2007) no biofilme dentário de pacientes com doença periodontal.

## 7 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

A ação antimicrobiana dos antissépticos bucais foi evidenciada pela diminuição significativa na contagem média de UFC/mL nos participantes usuários de enxaguantes bucais.

A diferente ocorrência de morfotipos entre os grupos de estudo sugere uma ação promotora da alteração da comunidade bacteriana na cavidade bucal pelo uso de enxaguante bucal. Nesse sentido, foi observada uma relação direta entre a utilização de tal produto a diminuição da população bacteriana e o aumento do número de morfotipos bacterianos. Assim, ao reduzir a população dos morfotipos gram positivos, encontrados em maioria em uma cavidade bucal saudável, o enxaguante favorece o incremento de morfotipos gram-negativos. Assim, indivíduos usuários de enxaguantes teriam uma cavidade bucal com menor ocorrência de agentes bacterianos, porém com uma maior riqueza destes.

Após identificação presuntiva, diferente do ocorrido anteriormente, não foram encontrados grupos bacterianos de ocorrência exclusiva no grupo teste ou no controle sendo encontradas apenas variações nos números de UFC/mL relacionada ao hábito de utilização ou não de enxaguante bucal. Nos indivíduos usuários de enxaguante bucal a diminuição de contagem média de representantes dos grupos SGV, ENT e SCP foi acompanhada de um aumento na ocorrência de contagem média de representantes dos grupos dos bastonetes BGN e dos SCN. Tal achado evidencia a ação dos enxaguantes como moduladores da população bacteriana e mostra que, embora não afetem a diversidade bacteriana da cavidade bucal, exercem papel determinante na proliferação de grupos, até então, suplementares a microbiota bucal, indicando um possível processo de disbiose.

Os resultados encontrados permitem sugerir que a utilização regular de enxaguantes altera a microbiota bucal podendo influenciar no mecanismo de regulação saúde x doença e resultar em processos infecciosos tanto por colonização de espécies exógenas como por proliferação de espécies residentes. Contudo, outros estudos são necessários para entender melhor a relação causal entre os enxaguantes bucais e a microbiota bucal.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHOUAK, W.; HEULIN, T.; PAGES, J.M. Multiple facets of bactéria Iporins. FEMS MicrobiolLett.v.199, p.1-7, 2001.

ADDY, M. Oral hygiene products: potential for harm to oral and systemic health? Periodontology 2000. v. 48, n. 1, p. 54–65. 2008.

ALVES, D.; COSTA, A.L.; ALMEIDA, R.F.; CARVALHO, J.F.C.; FELINO, A. Cloreto de cetilpiridínio - revisão da literatura. Rev Port Estomatol Med Dent Cir Maxilofac.v.53, n.3, p.181-189. 2012.

APOLÔNIO, A.C. M; GAIA, L.G.S.; COUTINHO, S. C. In: APOLÔNIO, A. C. M. (Org). Microbiologia bucal e aplicada.1 ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2018. Cap.6, p.65-73.

\_\_\_\_\_ ; PAULA, T. O; MACHADO, A. B. F. In: APOLÔNIO, A. C. M. (Org).Microbiologia bucal e aplicada.1 ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2018. Cap.10, p.105-110.

ARENDORF, T.M.; WALKER, D.M. The prevalence and intra-bucal distribution of Candida albicans in man. Arch. Bucal Bio., Elmsford. v.25, p.1-10. 1980.

ASADOORIAN, J. CDHA position paper on commercially available over-the-counter oral rinsing products. 2006. Disponível em: <[https://www.researchgate.net/publication/238727227\\_CDHA\\_Position\\_Paper\\_on\\_Commercially\\_Available\\_Over-the-Counter\\_Bucal\\_Rinsing\\_Products](https://www.researchgate.net/publication/238727227_CDHA_Position_Paper_on_Commercially_Available_Over-the-Counter_Bucal_Rinsing_Products)>. Acesso em: 25 mar. 2018.

BARNETT, M.L. The role of therapeutic antimicrobial mouthrinses in clinical practice: control of supragingival plaque and gingivitis. Journal of the American Dental Association. v. 134, n.6, p.699–704. 2003.

BAKER-AUSTIN, C.; WRIGHT, M. S.; STEPANAUSKAS, R.; MCARTHUR, J.V. 2006.Co-selection of antibiotic and metal resistance. TRENDS in Microbiology.v.14, n. 4, p. 176-182.

BENSON, P.E; PARKIN, N.; DYER, F.; MILLETT, D. T.; FURNESS, S.; GERMAIN, P. Fluorides for the prevention of early tooth decay (demineralised white lesions) during fixed brace treatment. Cochrane database of systematic reviews. v. 12, n. 2, 2013.

BORDEN LC, CHAVES ES, BOWMAN JP, FATH BM. The effect of four mouthrinses on bucalmalodour.*Compendium*.v.23, n. 6, p. 531-46. 2002.

BORDIN, D. Determinantes da condição percebida de saúde bucal e da adesão ao autocuidado em adultos brasileiros. Araçatuba, 2017. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba.

BURTON, G.R.W.; ENGELKIRK, P.G. Microbiology for the health sciences. 7th ed. Baltimore (MD): Lippincott Williams and Wilkins; 2004.

CALVO, J.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L. Antimicrobial mechanisms of action. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* v.27, n. 1, p. 44-52. 2009.

CHAPMAN, J.S. Disinfectant resistance mechanism, cross-resistance, and co-resistance. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v.51, p. 271-276. 2003.

CASAI, P. M. M; MOREIRA, I.S.; MOREIRA, L.G.P.; OLIVEIRA, M. L. L.; RIBEIRO, E. D. P.; RAPP, G.E. Dental bacterial plaque as a biofilm. *Rev Fac Odontol Univ Fed Bahia* 2013; v. 43, n. 1. 61-66.

DAVOGLIO, R.S. AERTSI. D.R.G.C; ABEGGII, C.; FREDDOI, S. L.; MONTEIRO, L. Fatores associados a hábitos de saúde bucal e utilização de serviços odontológicos entre adolescentes. *Cad. Saúde Pública*, v.25, n.3, p.655-667, 2009.

DE LORENZO, J.L.; MAYER, M.P.A. In: DE LORENZO, J.L. (Org). *Microbiologia para o estudante de odontologia*. São Paulo, SP: Atheneu, cap.3. p.33-42. 2004.

DENYER, S.P.; STEWART, G.S.A.B. Mechanisms of action of disinfectants. *International Biodeterioration and Biodegradation*.v.41, p. 261–268. 1998.

DEWHIRST, F.E.; CHEN, T.; IZARD, J.; PASTER, B.J.; TANNER, A.C.; YU, W.H.; LAKSHMANAN, A.; Wade, W.G. The human oral microbiome. *J. Bacteriol.* v. 192, n. 19, p. 5002-17. 2010. Disponível em: < <https://jb.asm.org/content/192/19/5002.long>>. Acesso em: 23 maio. 2018.

DIAS, V.C.; RESENDE, J.A.; BASTOS, A.N.; DE ANDRADE BASTOS, L.Q.; DE ANDRADE BASTOS, V.Q.; BASTOS, R.V.; DINIZ, C.G.; DA SILVA, V.L. Epidemiological, Physiological, and Molecular Characteristics of a Brazilian Collection of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb Drug Resist.*, v. 23, n. 7, p. 852-863. 2017.

DI CESARE, A.; ECKERT, E. M.; CORNO, G. Co-selection of antibiotic and heavy metal resistance in freshwater bacteria. *J. Limnol.* v. 75, s. 2, p. 59-66. 2016.

DINIZ, P.A.; LIMA C.F.; FERNANDES, E.E; JOIAS, R.P; RODE, S.M. Percepção dos pacientes em uso de enxaguatórios bucais: óleos essenciais e cloreto de cetilperidíneo. *Rev Assoc Paul Cir Dent.* v. 68, n. 3, p.245-9. 2014.

DIVARIS, K.; PREISSER, J. S.; SLADE, G. D. Surface-specific efficacy of fluoride varnish in caries prevention in the primary dentition: results of a community randomized clinical trial. *Caries research.* v. 47, n. 1, p. 78-87. 2012.

DOS SANTOS, C. T.; MILÉO, F. C.; CAMPAGNOLI, E.B.; SOUZA PINTO, S. C.; ESMERINO, L. A.; LEITE, E. L. Evaluation of the oral microbiota in elderly patients admitted to the Intensive Care unit and Clinical Hospital. *Rev. Espacios.* 38 (3). 2017. Disponível em: <<http://www.revistaespacios.com/a17v38n03/a17v38n03p25.pdf>>. Acesso em: 19 jan. 2019.

ECHEVERRIA, J.J.; SANZ, M. Controle mecânico da placa supragengival. In: Lindhe J, Lang NP Tratamento de periodontia clínica e implantologia bucal. 4 ed. São Paulo: Guanabara Koogan. 2005; Cap.21. p. 435-49.

FERNANDES, P. Antibacterial discovery and development-the failure of success? Nat. Biotechnol. v.24, p.1497-50. 2006.

FILALI, B. K.; TAOUFIK, J.; ZEROUAL, Y.; DZAIRI, F. Z.; TALBI, M.; BLAGHEN, M. 2000. Waste water bacterial isolates resistant to heavy metals and antibiotics, Current Microbiology, v. 41, p.151-156.

FISHER, J.F.; MEROUEH, S.O.; MOBASHERY, S. Bacterial resistance to betalactam antibiotics: compelling opportunism, compelling opportunity. Chem. Rev., v.105, p. 395-424, 2005.

FLEMMING, H.C.; WINGENDER, J.; SZEWZYK, U.; STEINBERG, P.; RICE, S.A.; KJELLEBERG, S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. Nature Reviews Microbiology. v. 14, p. 563–575. 2016

FREDRICKS D. N. Microbial ecology of human skin in health and disease. J Investig Dermatol Symp Proc. v. 6. p. 167-9. 2001;

FREITAS, A. O. A.; MARQUEZAN, M.; NOJIMA, M. C. G.; ALVIANO, D. S.; MAIA, L. C. The influence of orthodontic fixed appliances on the oral microbiota: A systematic review. Dental Press J. Orthod, Maringá , v. 19, n. 2, p. 46-55, Apr. 2014 . Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2176-94512014000200046&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2176-94512014000200046&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em: 18 jan. 2019.

FONT, E. Antisépticos y desinfectantes. Offarm.v.20, p. 55-64. 2001.

GAO Z, TSENG C.H.; PEI Z.; BLASER, M.J. Molecular analysis of human forearm superficial skin bacterial biota. 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1815283/>>. Acesso em: 3abr 2018.

GAO, B.; TU, P.; BIAN, X.; CHI, L.; RU, L.; Hongyu; K.. Profound perturbation induced by triclosan exposure in mouse gut microbiome: a less resilient microbial community with elevated antibiotic and metal resistomes. 2017. Disponível em: <<https://bmcpharmacoltoxicol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40360-017-0150-9>>. Acesso em: 23 mar. 2018.

GEBRAN, M.P; GEBERT, A.P.O. Controle químico e mecânico de placa bacteriana. Tuiuti: Ciência e Cultura, Curitiba, n.26, v.3, p.45- 58, 2002.

GHANNOUM, M.A.; JUREVIC, R.J.; MUKHERJEE, P.K.; CUI F.; SIKAROODI, M.; NAQVI, A.; GILLEVET, P.M. Characterization of the bucal fungal microbiome (Mycobiome) in healthy individuals. 2010. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plospathogens/article/file?id=10.1371/journal.ppat.1000713&type=printable>>. Acesso em: 23 maio 2018.

GILMAN, A.G. Bases Farmacológicas da Terapêutica. 10 ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill Inter america do Brasil LTDA. p. 859-875. 2003.

GOH, E.B.; YIM, G.; TSUI, W.; MCCLURE, J.; SURETTE, M.G.; DAVIES, J. Transcriptional modulation of bacterial gene expression by sub inhibitory concentrations of antibiotics. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., v.99, p. 17025-30, 2002.

GOMES, F.; FONSECA, R.; CARUSO, T.; QUINTELLA, H. M. Análise do perfil de compra dos consumidores de produtos de higiene bucal. UERJ. Rio de Janeiro, 2007.

GONÇALVES, E. M.; PORTELA FILHO, E. P.; ARAGÃO, P. R. C.; PONTE SEGUNDO, T. C.; LIMA, D. L. F. Grau de conhecimento dos cirurgiões-dentistas na prescrição de colutórios e dentifrícios. R. Periodontia. v.20, n. 4, p. 51- 55. 2010.

GONZÁLEZ, L.L.; PÉREZ, M. I. G.; MENÉNDEZ, M. E. L.; LLUCH, N. A.; AGUSTÍ, M. L. M.; CACHAFEIRO, S. P. Introducción a los antisépticos. 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0212656714700551>>. Acesso em: 23 mar. 2018.

GRANJEIRO, J.M. O cloreto de cetilpiridínio e a placa bacteriana: uma revisão. R. Assoc Paul CirDent. v. 46, n. 5, p. 857-60. 1993.

GUIMARÃES, D.O.; MOMESSO L.S.; PUPO, M.T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. Química Nova. v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

GUNSOLLEY, J.C. Clinical efficacy of antimicrobial mouthrinses. Journal of Dentistry, v. 38, n. 1, p. 6–10. 2010.

HE, X.; SHI, W. Oral Microbiology: Past, Present and Future. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2949409/pdf/ijos2009a.pdf>>. Acesso em: 23 maio 2018.

HE X.; HU W.; HE J.; GUO L. Community-based interference against integration of Pseudomonas aeruginosa in to human salivary microbial biofilm. 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3327514/pdf/nihms355884.pdf>>. Acesso em: 23 maio 2018.

JAWETZ, E.; MELNICK, J.L.; ADELBERG, E.A.; BROOKS, G.F.; BUTEL, J.S.; ORNSTON, N.L.; Microbiologia Médica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

JENKINS, S.; ADDY, M.; WADE, W.; NEWCOMBE, R.G. The magnitude and duration of the effects of some mouthrinse products on salivary bacterial counts. J Clin Periodontol. v.21, p. 397–401. 1994.

JENKINSON, H.F.; LAMONT R.J. Oral microbial communities in sickness and health. Trends Microbiol. v.13, n. 12, p. 589-595. 2005.

JENSEN JL, KARATSAIDIS A, BRODIN P. Salivary secretion: stimulatory effects of chewing-gum versus paraffin tablets. *Eur J Oral Sci.* v.106, n.4, p. 892-6. 1998.

JORGE, A.O. Ecologia Bucal. In: Jorge, A.O. *Microbiologia Bucal*. São Paulo. Santos Livraria Editora. p.1-19. 1998.

\_\_\_\_\_. Ecologia da Flora Bucal. In: Jorge, A.O. *Microbiologia Bucal*. São Paulo. Santos Livraria Editora. p.264-274. 1998.

\_\_\_\_\_. Regulação e Controle da Microbiota Bucal. In: Jorge, A.O. *Microbiologia Bucal*. São Paulo. Santos Livraria Editora. p.21-30. 1998.

KRETH J.; MERRITT J.; QI F. Bacterial and host interactions of oral streptococci. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2903342/pdf/dna.2009.0868.pdf> Acesso em: 23 de maio 2018.

KOSIEWICZ, M.M.; ZIRNHELD A.L.; ALARD, P. Gut microbiota, immunity, and disease: a complex relationship. 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3166766/pdf/fmicb-02-00180.pdf>>. Acesso em: 3 abr 2018.

KUBO, F. M. M.; MIALHE, F.L. Fio dental: da dificuldade ao êxito na remoção do biofilme interproximal. *Arq Odontol.* v. 47, n. 1, p. 51-55. 2011.

LAMBERET, P.A. Bacterial resistance to antibiotics: modified target sites. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, v.57, p.1471-85, 2005.

LANG N.P., MOMBELLI A., ATTSTRÖM R. Placa e cálculo dentais. In: Lindhe, J. *Tratado de periodontia clínica e implantologia bucal*. 3ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. Cap.03, p.67-91. 1999.

LENANDER-LUMIKARI M, JOHANSSON I, VILJA P, SAMARANAYAKE LP. Newer saliva collection methods and saliva composition: a study of two Salivette kits. *BucalDis*.v.1, n.2, p. 86-91. 1995.

LESZCZYŃSKA, A.; BUCZKO. P.; BUCZKO, W.; PIETRUSKA, M. Periodontal pharmacotherapy - an updated review. *Advances in Medical Sciences.* v. 56, n. 2, p. 123–131. 2011.

LEUNG, W.K.; DASSANAYAKE R.S.; YAU, J.Y.; JIN, L.J., YAM, W.C.; SAMARANAYAKE, L.P. Bucal colonization, phenotypic, and genotypic profiles of *Candida* species in irradiated, dentate, xerostomic nasopharyngeal carcinoma survivors. *J Clin Microbiol.* v. 38, n. 6, p. 2219-26. 2000. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC86768/>>. Acesso em: 2 maio 2018.

LINDHE, J. *Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Bucal*. 4 ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. p.450-77. 2005.

LOTUFO, R. F. M.; PANNUTI, C. M.; SARAIVA, M. C. Bacteroides forsythus: sensibilidade a antimicrobianos em amostras de pacientes portadores de periodontite. *Pesqui Odontol Bras*, v. 1, p. 47-50. 2001.

MACIAS, J.H.; RUIZ, S.; MACIAS, A.E.; ALVAREZ J. A. Substantive effect of chlorhexidine. *Journal of Hospital Infection*.v.90, n.1, p.82–83.2015.

MADEIRA, M. F.M; QUEIROS-JUNIOR, C.M. In: APOLÔNIO, A. C. M. (Org). *Microbiologia bucal e aplicada*.1 ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2018. Cap.9, p.95-104.

MANDEL, I. D. Chemotherapeutic agents for controlling plaque and gingivitis. *Jornal of Clinical Periodontology*.v.15, n. 8, p. 488-98. 1988.

MANIVANNAN, G. Antiseptic Agents. In: Manivannan, G. (Ed.). *Disinfection and Decontamination Principles, Applications and Related Issues*. United States of America, CRC Press, pp.136-141.2008.

MARCOTTE, H.; LAVOIE M.C.; Bucal microbial ecology and the role of salivary imunoglobulin A.1998. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC98907/>>. Acesso em: 3 abr 2018.

MARSH, P.D; Dental Plaque as a Microbial Biofilm. *Caries Res*. v. 38, n. 3, p. 204-11. 2004. Disponível em: <<https://www.karger.com/Article/Abstract/77756>>. Acesso em: 3 abr. 2018.

\_\_\_\_\_ ; MARTIN, M. The mouth as a microbial habitat. In: *Buccal Microbiology. Aspects of Microbiology*, v 1. Churchill Livingstone, 2009. Boston, MA.

\_\_\_\_\_ ; Controlling the buccal biofilm with antimicrobials. *Journal of Dentistry*, v. 38, n. 1, p. 11-15. 2010.

\_\_\_\_\_ ; DEVINE, D.A. How is the development of dental biofilms influenced by the host? *J.Clin Periodontol*. v,38, s. 11, p.28–35. 2011.

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

MAYA, J.J.; RUIZ1, S.J.; PACHECO, R.; VALDERRAMA, S. L.; VILLEGAS, M. V. I.. Papel de la clorexidina em la prevención de las infecciones asociadas a la atención em salud. *Infectio*. v.15, n. 2. p.98–107. 2011.

MENDES, L. G. A.; BIAZEVIC, M. G. H.; MICHEL-CROSATO, E.; MENDES, O.A.; Dental caries and associated factors among Brazilian adolescents: a longitudinal study. *Brazilian Journal of Oral Sciences*, p. 1614-1619. 2016.

MONFRIN, R.C.P.; RIBEIRO, M.C. Avaliação in vitro de enxaguantes bucais sobre a microbiota da saliva. R. Assoc. Paul. Cir. Dent., São Paulo, v.54, n.1, p.401-407, 2000.

MUNRO, C.L.; GRAP, M. J. Oral health and care in the intensive care unit: state of the science. Am J Crit Care. v.13, n. 1. p. 25-33. 2004. Disponível em; <<http://ajcc.aacnjournals.org/content/13/1/25.full.pdf+html>>. Acesso em: 18 maio 2018.

NALÇACI R, SÖNMEZ IS. Evaluation of oral malodor in children. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. v.106, n. 3, p.384-8. 2008.

NEDER R.N. Microbiologia: manual de laboratório. São Paulo, Nobel, 1992.

NORMANNO, G.; LA SALANDRA, G.; DAMBROSIO, A.; QUAGLIA, N. C.; CORRENTE, M.; PARISI, A.; SANTAGADA, G.; FIRINU, A.; CRISSETTI E.; CELANO, G.V. Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. Int J Food Microbiol. v. 20, n. 115, s. 3, p. 290-296. 2007.

NORMARK, H., NORMARK S. Evolution and spread of antibiotic resistance. J. Intern Medicine 2002; 252: 91-106.

OBOLSKI, U.; DELLUS-GUR, E.; STEIN, G.Y.; HADANY, L. Antibiotic cross-resistance in the lab and resistance co-occurrence in the clinic: Discrepancies and implications in *E.coli*. Infect Genet Evol. v. 40, P.155-161. 2016.

OSMAN, O.; TANGUICHI, H.; IKEDA, K.; PARK, P.; TANABE-HOSOI, S.; NAGATA, S. Copper-resistant halophilic bacterium isolated from the polluted Maruit Lake, Egypt. J. Appl. Microbiol. v. 108, p. 1459–1470. 2010.

PACE, M.A.; ANDRADE, D. Avaliação clínica e microbiológica da cavidade bucal de pacientes críticos com entubação orotraqueal de um hospital de emergência [tese]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo; 2007.

PARASKEVAS, S. Randomized controlled clinical trials on agents used for chemical plaque control. Int J Dent Hyg.v.3, p. 162–78. 2005.

PEREIRA, R.S.; DIAS, V.C.; FERREIRA-MACHADO, A.B.; RESENDE, J.A.; BASTOS, A.N.; ANDRADE BASTOS, L.Q.; ANDRADE BASTOS, V.Q.; BASTOS, R.V.; DA SILVA, V.L.; DINIZ, C.G. Physiological and molecular characteristics of carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter aerogenes*. J Infect Dev Ctries. v. 10, n. 6, p.592-599. 2016.

PIETRUSKA, M.; PANICZKO, A.; WASZKIEL, D.; PIETRUSKI, J.; BERNACZYK, A. Efficacy of local treatment with chlorhexidine gluconate drugs on the clinical status of periodontium in chronic periodontitis patients. Advances in medical sciences. v. 51, p.162–165. 2006.

RAMOS, I. A.; LEITE, R. B.; MENEZES, K. M.; JOVITO, V.C.; CAVALCANTI, Y. W.; DE ALMEIDA, L. F. D.; DE CASTRO, R. D.; CAVALCANTI, A. L. Efeito inibitório de enxaguatórios bucais sobre o crescimento de *Lactobacilos casei*. 2012. Disponível em: <<http://revodonto.bvsalud.org/pdf/rbo/v69n1/a24v69n1.pdf>>. Acesso em: 5 abr. 2018.

RAUTEMAA, R.; LAUHIO, A.; CULLINAN, M.P.; SEYMOUR, G.J. Oral infections and systemic disease—an emerging problem in medicine 2007. Disponível em: <[https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X\(14\)62562-3/pdf](https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X(14)62562-3/pdf)>. Acesso em: 5 abr. 2018.

RELVAS, V.F.S.R. Efeitos do uso de antissépticos na flora bucal. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Fernando Pessoa.

RILEY, P.; LAMONT, T.; Triclosan/copolymer containing toothpastes for bucal health. 2013. Disponível em: <<http://cochranelibrary-wiley.com/doi/10.1002/14651858.CD010514/epdf>>. Acesso em: 5 mar. 2018.

ROBERTS A.P.; MULLANY P. Oral biofilms: a reservoir of transferable, bacterial, antimicrobial resistance. *Journal Expert Review of Anti-infective Therapy*. v.8, n. 12, p. 1441-1450. 2010.

RUSSELL, A.D. Antibiotic and biocide resistance in bacteria: introduction. *J Appl Microbiol*. v.92, sup.1S-3S. 2002.

SANTOS, K. S.; VASCONCELOS, M. G.; VASCONCELOS, R. G. Flúor: mecanismo de ação e prescrição terapêutica para diferentes situações clínicas. *Odontol. Clín.-Cient., Recife*, v. 18, n. 1, p. 7-13. 2019.

SCANNAPIECO, F.A. The buccal microbiome: Its role in health and in bucal and systemic infections. *Clin.Micro. News*. v.35, n.20, p.163–169. 2013.

SCHIMIDT, F.R. The challenge of multidrug resistance: actual strategies in the development of novel antibacterials. *Appl Microbiol Biotechnol*. v. 63, n. 4, p. 335-343. 2004.

SEILER,C.; BERENDONK, T.U. Heavy metal driven co-selection of antibiotic resistance in soil and water bodies impacted by agriculture and aquaculture. *Front Microbiol*. v. 3. 2012.

SEMENOFF, T. A. D. V.; SEMENOFF-SEGUNDO, A.; BIASOLI, E. R. Efetividade antimicrobiana in vitro de enxaguatórios bucais frente aos microrganismos *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. 2008. Disponível em: <<http://revistaseletronicas.pucrs.br/ojs/index.php/fo/article/viewFile/2293/3434>>. Acesso em: 19 abr. 2018.

STEENBERGHE D, AVONTROODT P, PEETERS W, PAUWELS M, COUCKE W, LIJNEN A. Effect of different mouthrinses on morning breath. *J Periodontol*.v.72, n.9, p.1183-91. 2001.

SUMMERS, A. O. Generally overlooked fundamentals of bacterial genetics and ecology. *Clinical Infectious Diseases*. v.34, sup. S85-S92. 2002.

SUTTON, S. V.; BENDER, G. R.; MARQUIS, R.E. Fluoride inhibition of proton-translocating ATPases of oral bacteria. *Infection and immunity*. v.55, n. 11, p. 2597-2603. 1987.

TAVARES, W. Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos. São Paulo, SP: Atheneu, 2002.

THOMAS, D. W.; GREER, F.R. American Academy of Pediatrics Committee on Nutrition: American Academy of Pediatrics Section on Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition. Probiotics and prebiotics in pediatrics. *Pediatrics*, 2010; Disponível em: <<http://pediatrics.aappublications.org/content/pediatrics/126/6/1217.full.pdf>>. Acesso em: 18 abr 2018.

TOLENTINO, E. S.; CHINELLATO, L. E. M.; TARZIA, O. Avaliação da aceitação de pacientes em relação ao uso de antissépticos bucais e estudo do pH das diferentes soluções. 2010. Disponível em: <<http://revista.aborj.org.br/index.php/rbo/article/view/140/140>> Acesso em: 19 abr 2018.

TORRES, C.R.G. *et al.* Agentes antimicrobianos e seu potencial de uso na Odontologia. PGR: Pós-Grad. R. Odontol., São José dos Campos, v.2, n.2, p.43-52, 2000.

UREÑA, J.L. Determinantes ecológicos bucais. In: UREÑA, J. L. *Microbiología Bucal*. 2 ed. Madrid, McGraw Hill, p. 525-540. 2002.

\_\_\_\_\_. Composición y ecología de la microbiota bucal. In: UREÑA, J.L. *Microbiología Bucal*. 2 ed. Madrid, McGraw Hill, p. 515-525. 2002.

VAN DER OUDERAA, F.J.G. Anti-plaque agents. Rationale and prospects for prevention of gingivitis and periodontal disease. *J Clin Periodontol*, v.18; p. 447-454. 1991. Disponível em: <[http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-051X.1991.tb02315.x/epdf?r3\\_referer=wol&tracking\\_action=preview\\_click&show\\_checkout=1&purchase\\_referrer=www.ncbi.nlm.nih.gov&purchase\\_site\\_license=LICENS E\\_DENIED](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-051X.1991.tb02315.x/epdf?r3_referer=wol&tracking_action=preview_click&show_checkout=1&purchase_referrer=www.ncbi.nlm.nih.gov&purchase_site_license=LICENS E_DENIED)>. Acesso em: 13 jun. 2017.

WALSH, C. Antibiotics: Actions, Origins, Resistance. *Protein Science*. 2003. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2286585/pdf/0133059.pdf>>. Acesso em: 21 jun. 2018.

WANNACHER, L. Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: Uma Guerra perdida? n.1, v. 4. 2004. Disponível em: [http://www.sbfc.org.br/site/admin/conteudo/pdfs/33692\\_83366.pdf](http://www.sbfc.org.br/site/admin/conteudo/pdfs/33692_83366.pdf).

WEBBER, M.A.; WHITEHEAD, R.N.; MOUNT, M.; LOMAN, N.J.; PALLAN, M.J.; PIDDOCK, L.J. Parallel evolutionary pathways to antibiotic resistance selected by biocide exposure. *J Antimicrob Chemother.*, v. 70, n. 8, p. 2241-2248. 2015.

WITT, J.; RAMJI, N.; GIBB, R.; DUNAVENT, J.; FLOOD, J.; BARNES, J. Antibacterial and antiplaque effects of a novel, alcohol-free oral rinse with cetylpyridinium chloride. 2005. Disponível em: <<https://pdfs.semanticscholar.org/4be2/881041fb32c9e7d3cc3a25a2c390f4d16257.pdf>>. Acesso em: 4 abr. 2018.

WRIGHT, G.D. Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and -modification. *Adv. Drug Deliv.Rev.*, v.57, p.1451-70, 2005.

\_\_\_\_\_. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nat. Rev. Microbiol.* v.5, p.175-86. 2007.

YEE, A.L.; GILBERT, J A. Is triclosan harming your microbiome? *Science.* V.353, sup. 6297, p. 348-349. 2016.

ZANATTA, F.B.; RÖSING, C.K. Clorexidina: mecanismo de ação e evidências atuais de sua eficácia no contexto do biofilme supragengival. *Scientific-A.* v.1, n. 2, p. 35-43. 2007.

ZAWADZKI, P. J.; PERKOWSKI, K.; , PADZIK, M.; MIERZWIŃSKA-NASTALSKA, E.; SZAFLIK, J. P.; CONN, D. B.; CHOMICZ, L. "Examination of Oral Microbiota Diversity in Adults and Older Adults as an Approach to Prevent Spread of Risk Factors for Human Infections,". 2017. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/bmri/2017/8106491/>>. Acesso em: 13 out. 2018.

## **APÊNDICE A - Parecer Consubstanciado do Cep**

### **DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** ENXAGUANTES BUCAIS: INTERAÇÃO COM MICROBIOTA E INTERFERÊNCIA NA RESISTÊNCIA BACTERIANA AOS ANTIMICROBIANOS

**Pesquisador:**Ana Carolina Mbucais Apolônio

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 79766317.9.0000.5147

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de Juiz de Fora – ICB

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

### **DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 2.422.594

#### **Apresentação do Projeto:**

Apresentação do projeto está estruturado de forma objetiva. Descreve as bases científicas que justificam o estudo.

#### **Objetivo da Pesquisa:**

Este estudo tem como objetivo geral, avaliar interferência de enxaguantes bucais na diversidade microbiana e susceptibilidade a antimicrobianos na cavidade bucal.

Apresenta compatibilidade com a proposta de estudo.

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

O risco que o projeto apresenta é caracterizado como risco mínimo, considerando que os indivíduos não sofrerão qualquer dano ou prejuízo na realização das intervenções propostas. Cita que o participante pode ter um incômodo com a coleta de saliva, mas que procurará amenizar com a coleta sendo realizada por especialista. Os benefícios esperados estão adequadamente descritos.

#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O projeto está estruturado, delineado e fundamentado, sustenta os objetivos do estudo. A metodologia está descrita de forma objetiva. Apresentou todos os documentos necessários conforme protocolo do Comitê. Orçamento da pesquisa: informa que o Laboratório de Fisiologia e Genética Molecular Bacteriana do ICB/UFJF

cobrirá as despesas, pois já possui a maioria dos recursos necessários. O que não for coberto ficará a cargo do pesquisador. O projeto encontra-se em consonância com os princípios éticos norteadores da ética na pesquisa científica envolvendo seres humanos elencados na resolução 466/12 do CNS e com a Norma Operacional Nº 001/2013 CNS.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Apresentou o termo de Consentimento Livre e Esclarecido, objetivo e com as informações devidas. Relata que preservará o sigilo das informações e o anonimato dos participantes. Atende as normas da resolução 466/2012 - CNS.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Diante do exposto, o projeto está aprovado, pois está de acordo com os princípios éticos norteadores da ética em pesquisa estabelecido na Res. 466/12 CNS e com a Norma Operacional Nº 001/2013 CNS. Data prevista para o término da pesquisa: Fevereiro de 2019.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa CEP/UFJF, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 466/12 e com a Norma Operacional Nº 001/2013 CNS, manifesta-se pela APROVAÇÃO do protocolo de pesquisa proposto. Vale lembrar ao pesquisador responsável pelo projeto, o compromisso de envio ao CEP de relatórios parciais e/ou total de sua pesquisa informando o andamento da mesma, comunicando também eventos adversos e eventuais modificações no protocolo.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

<b>Tipo Documento</b>	<b>Arquivo</b>	<b>Postagem</b>	<b>Autor</b>	<b>Situação</b>
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1025698.pdf	04/12/2017 11:07:08	Ana Carolina Mores Apolônio	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_Priscila.docx	04/12/2017 10:55:37	Ana Carolina Mores Apolônio	Aceito
Outros	EXAMECLINICO.docx	04/12/2017 10:54:15	Ana Carolina Mores Apolônio	Aceito

Outros	FICHAPARACOLETAEINF ORMACOE S.docx	04/12/2017 10:53:54	Ana Carolina Mores Apolônio	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório /Biobanco	Decbiorrepositorio.pdf	08/11/2017 10:00:02	Ana Carolina Mores Apolônio	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Decinfraestrutura.pdf	08/11/2017 09:59:31	Ana Carolina Mores Apolônio	Aceito
Folha de Rosto	olhaderosto.pdf	08/11/2017 09:57:27	Ana Carolina Mores Apolônio	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	07/11/2017 17:01:30	Ana Carolina Mores Apolônio	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

JUIZ DE FORA, 07 de Dezembro de 2017  
**Patrícia Aparecida Fontes Vieira**  
**(Coordenador)**

## **APÊNDICE B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

O Sr. (a) está sendo convidado (a) **como** voluntário (a) a participar da pesquisa **“ENXAGUANTES BUCAIS: INTERAÇÃO COM MICROBIOTA E INTERFERÊNCIA NA RESISTÊNCIA BACTERIANA AOS ANTIMICROBIANOS”**. Para tanto, pedimos a sua autorização para a coleta, o depósito, o armazenamento, a utilização e descarte do material biológico humano **do tipo saliva**, cuja a utilização está vinculada somente a este projeto de pesquisa. Nesta pesquisa pretendemos realizar uma comparação entre as bactérias presentes na boca de pessoas que fazem uso de soluções para bochecho com aquelas presentes na boca de voluntários que não utilizam tais produtos. Para esta pesquisa adotaremos os seguintes procedimentos: sua saliva será coletada em um frasco plástico descartável apropriado e, em seguida será transportada, em contato com o gelo, ao laboratório de microbiologia, onde permanecerá até sua análise. Após a análise todas as amostras serão destruídas de maneira adequada conforme recomendação dos órgãos de controle. Esta pesquisa é considerada uma pesquisa de risco mínimo, mas eventuais desconfortos decorrentes do procedimento de coleta serão minimizados por um examinador qualificado. A pesquisa contribuirá para a geração de dados que poderão servir de base para ações educativas e conscientização sobre a utilização das soluções para bochecho, além de servir como referência para estratégias que visem estimular a reflexão sobre a utilização contínua dessas substâncias.

Para participar deste estudo o Sr. (a) não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Apesar disso, caso sejam identificados e comprovados danos provenientes desta pesquisa, o Sr.(a) tem assegurado o direito à indenização. O Sr. (a) terá o esclarecimento sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se a participar e a qualquer tempo e sem quaisquer prejuízos, pode retirar o consentimento de guarda e utilização do material biológico armazenado no Biorrepositório, valendo a desistência a partir da data de formalização desta. A sua participação é voluntária, e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que o Sr. (a) é atendido (a). O pesquisador tratará a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Os resultados obtidos pela pesquisa, a partir de seu material

biológico, estarão à sua disposição quando finalizada. Seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a sua permissão.

O (A) Sr. (a) não será identificado (a) em nenhuma publicação que possa resultar.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias originais, sendo que uma será arquivada pelo pesquisador responsável, no Laboratório de Fisiologia e Genética Molecular Bacteriana do ICB/UFJF, e a outra será fornecida ao Sr. (a).

Os dados, materiais e instrumentos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de 5 (cinco) anos e após esse tempo serão destruídos. Os pesquisadores tratarão a sua identidade com padrões profissionais de sigilo, atendendo a legislação brasileira (Resoluções Nº 466/12; 441/11 e a Portaria 2.201 do Conselho Nacional de Saúde e suas complementares), utilizando as informações somente para os fins acadêmicos e científicos.

Eu, \_\_\_\_\_, portador do documento de Identidade \_\_\_\_\_ fui informado (a) dos objetivos da pesquisa **“ENXAGUANTES BUCAIS: INTERAÇÃO COM MICROBIOTA E INTERFERÊNCIA NA RESISTÊNCIA BACTERIANA AOS ANTIMICROBIANOS”**, de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar. Declaro que concordo em participar desta pesquisa. Recebi uma via original deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Juiz de Fora, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20 .

Assinatura do Participante

Assinatura do (a) Pesquisador (a)

**Nome do Pesquisador Responsável:** Prof. Dr. Ana Carolina MbucaisApolônio. **Endereço:** ICB/ Depto. de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia./ Avenida José Lourenço Kelmer, s/n – Campus Universitário, Bairro São Pedro. CEP:36036-900 - Juiz de Fora – MG. **Fone:** (32) 2102-3213. **E-mail:** carolinaapolonio@gmail.com

## APÊNDICE C – Ficha Clínica

Higiene bucal:    ( ) BOA    ( ) REGULAR    ( ) RUIM

Respirador bucal? ( ) SIM    ( ) NÃO

Sente frequentemente a boca “seca”? ( ) SIM    ( ) NÃO

\*Cáries: \_\_\_\_\_ Quantas? \_\_\_\_\_ Impacção alimentar: \_\_\_\_\_

\*Cálculo: \_\_\_\_\_ SanGramento

gengival: \_\_\_\_\_

\*Gengivite: \_\_\_\_\_ Feridas

cirúrgicas: \_\_\_\_\_

\*Periodontite: \_\_\_\_\_

\*Comunicação buco-sinusal ou buco-nasal: \_\_\_\_\_

\*Alteração nas mucosas: ( ) lábios ( ) mucosa jugal ( ) língua    ( ) assoalho

( ) palato ( ) região amigdaliana ( ) gengivas

\*OBS.: \_\_\_\_\_

---

### Percepção quanto à utilização dos enxaguantes bucais

Q1: Questão 1 - O enxaguante proporciona sensação de refrescância?

Q2: Questão 2 - Tem sensação de queimação ou ardência?

Q4: Questão 3 - O sabor do enxaguante é agradável?

Q5: Questão 4 - Por que você acha importante usar o enxaguante bucal?

**Data da coleta:** \_\_\_\_\_

**Local da coleta:** \_\_\_\_\_

## APÊNDICE D - Ficha de Coleta de Informações

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_  
Nº de identificação: \_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_ Sexo: \_\_\_\_ Escolaridade: \_\_\_\_

Renda Familiar:  < 1 sal mínimo  3 a 4 sal mínimos  
 1 a 2 sal mínimos  4 a 5 sal mínimos  
 2 a 3 sal mínimos  >5 sal mínimos

Com que frequência escova os dentes?

1 x ao dia (pela manhã ou a noite)  3 x ao dia (manhã, tarde e noite)  
 2 x ao dia (manhã e  Sempre que termino uma refeição

Faz uso de dentifrício (pasta de dente)?  Sim  Não

Se sim, qual ou quais?

---

Quantas vezes?

Faz uso de fio dental?  Sim  Não  
Quantas vezes?

Faz uso de enxaguante bucal?  Sim  Não  
Se sim, qual ou quais?

Quantas vezes?

Substitui a escovação e o fio dental por esse produto?  Sim  Não  
Com que frequência?

Quais critérios utiliza para a compra de produtos de higiene bucal?

---

---

### SAÚDE GERAL

Apresenta algum problema de saúde?

Digestivo/Intestinal/Hepático/Pulmonar/Cardíaco/Renal/Diabetes/Hipertensão/Reumatismo/Problema ginecológico/Alergia/ Doença auto-imune.

\*Algum problema que não foi perguntado?

Apresenta intolerância à lactose, doença de Crohn, Síndrome do intestino irritável, ou alguma outra?  Sim  Não

Qual? \_\_\_\_\_

Apresentou algum quadro de desordem intestinal recentemente?

Quando? \_\_\_\_\_  Sim  Não

Está fazendo uso de algum medicamento?

Qual? \_\_\_\_\_

Fez uso de antimicrobiano(s)/antibióticos recentemente?  Sim  Não

**Se sim, qual ou quais?**

**Há quanto tempo?**

**Quando foi a última vez que foi ao dentista?**

**O que o dentista fez?**

**Sua gengiva sangra quando você usa o fio dental?**  Sim  Não

**Usa algum tipo de prótese?**  Sim  Não

**Usa aparelho ortodôntico?**  Sim  Não

**Faz uso de bebida alcóolica?**  Sim  Não

**Quantas vezes?**

- |  |   |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> Quase todos os dias     | <input type="checkbox"/> 3 a 4 vezes por semana |
| <input type="checkbox"/> Uma vez por dia ou mais | <input type="checkbox"/> 1 vez por mês          |
| <input type="checkbox"/> 1 a 2 vezes por semana  | <input type="checkbox"/> 2 a 3 vezes por mês    |

**Fuma?**  Sim  Não

**Quantas vezes?**

- |  |   |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> Quase todos os dias     | <input type="checkbox"/> 3 a 4 vezes por semana |
| <input type="checkbox"/> Uma vez por dia ou mais | <input type="checkbox"/> 1 vez por mês          |
| <input type="checkbox"/> 1 a 2 vezes por semana  | <input type="checkbox"/> 2 a 3 vezes por mês    |

**Observações:**

---

---

---