



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS ODONTOLÓGICAS
INTEGRADAS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

VANESSA DE SOUSA

**EFEITO ANTIMICROBIANO DOS ANTISSÉPTICOS BUCAIS SOBRE *S. mutans*,
S. aureus E *E. faecalis***

Cuiabá, 2015

VANESSA DE SOUSA

**EFEITO ANTIMICROBIANO DOS ANTISSÉPTICOS BUCAIS SOBRE *S. mutans*,
S. aureus E *E. faecalis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Odontológicas, da Universidade de Cuiabá – UNIC como requisito parcial para a obtenção do título de mestre no Curso de Mestrado em Ciências Odontológicas Integradas.

Orientador: Prof. Dra. Cyntia Rodrigues de Araújo Estrela.

Cuiabá, 2015

FICHA CATALOGRÁFICA
Catálogo na Fonte

S725e Sousa, Vanessa de.
Efeito antimicrobiano dos antissépticos bucais sobre *S. mutans*, *S. aureus* e *E. faecalis* / Vanessa de Sousa – Cuiabá, 2015.
58 f.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas Integradas da Universidade de Cuiabá – UNIC, para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas.

Orientadora: Profª Drª Cyntia Rodrigues de Araújo Estrela.

1. Odontologia 2. Antisséptico bucal. 3. Efeito antibacteriano. I. Título.

CDU: 616.314

Normalização e Ficha Catalográfica

Valéria Oliveira dos Anjos
Bibliotecária – CRB1/1713

VANESSA DE SOUSA

**EFEITO ANTIMICROBIANO DOS ANTISSÉPTICOS BUCAIS SOBRE *S. mutans*,
S. aureus E *E. faecalis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Odontológicas, da Universidade de Cuiabá – UNIC como requisito parcial para a obtenção do título de mestre no Curso de Mestrado em Ciências Odontológicas Integradas.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof. Dra. Cyntia Rodrigues de Araújo Estrela

Co-orientador: Prof. Dr. Orlando Aguirre Guedes.

Membro Titular: Prof. Dr. Daniel de Almeida Decúrcio

Membro Titular: Prof. Dr. Álvaro Henrique Borges

Cuiabá, 17 de março de 2015

Conceito Final: _____

Ao meu pai, que torce pelo meu crescimento profissional com seu jeito recatado de ser.

A minha mãe, por estar presente em minha vida e me ajudar espiritualmente.

Ao meu esposo Luiz, pela presença fundamental em minha vida, pelo apoio, carinho e compreensão pelos momentos ausentes e muitas vezes impaciente de minha parte.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela fé que me conhece e me guia nos caminhos que escolho. Muito obrigada;

Aos meus irmãos, Valdo, Vânia, Vanilda, Valéria e Júnior, que torcem sempre pelo meu sucesso;

À minha orientadora Dra Cyntia Rodrigues de Araújo Estrela, pela dedicação, paciência e incentivo na minha orientação;

A minha colega e amiga Fernanda Assis, pelo auxílio e por me acolher como uma irmã em sua casa durante as etapas do mestrado, muito obrigada;

Aos meus colegas de mestrado, pela colaboração e convívio especialmente Fernanda Assis, Yolanda Barros e Fernanda Zanol pela amizade, apoio, incentivo e pelos momentos de descontração;

A todos os professores do mestrado, pela colaboração na conquista de mais conhecimentos;

Ao coordenador do mestrado Dr. Álvaro Henrique Borges pelo exemplo de dedicação ao trabalho e pelos ensinamentos;

E a todos aqueles, que embora não citados participaram direta ou indiretamente no decorrer de mais essa conquista em minha vida.

“Bom mesmo é ir a luta com determinação, abraçar a vida e viver com paixão, perder com classe e viver com ousadia, pois o triunfo pertence a quem se atreve e a vida é muito bela para ser insignificante”.

Charles Chaplin



RESUMO

RESUMO

SOUSA, V. **Efeito dos antissépticos bucais sobre *S. mutans*, *S. aureus* e *E. faecalis* usando dois métodos de pesquisa.** 2014. 58 f. Dissertação (Mestrado) – Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, Universidade de Cuiabá, Cuiabá, 2015.

O efeito antibacteriano de seis antissépticos bucais foi avaliado sobre *S. mutans*, *S. aureus* e *E. faecalis*, por meio dos testes de difusão em ágar e exposição direta. Para tanto, cepas de *S. mutans* (ATCC 27853), *S. aureus* (ATCC 6538) e *E. faecalis* (ATCC 29212) foram inoculadas em 7 mL de BHI e incubadas a 37°C por 24 horas. Para o teste de difusão em ágar, 18 placas de Petri com 20 mL de BHIA foram inoculadas com 0,1 mL das suspensões microbianas, com auxílio de swab esterilizados, de modo a se obter um crescimento confluyente. Cinquenta e quatro discos de papel com 9 mm de diâmetro foram imersos nas soluções experimentais de gluconato de clorexidina 0,12%, cloreto de cetilpiridínio a 0,07%, solução a base de óleos essenciais (Listerine Zero), cloreto de benzetônio 1,33 mg / cloridrato de lidocaína 25 mg, solução a base de óleos essenciais (Malvatricin), solução de clorexidina 0,12% + cetilpiridínio (Noplax) durante um minuto. A seguir, três discos de papel contendo uma das soluções irrigantes foram colocados sobre a superfície do BHIA. As placas foram mantidas por uma hora em temperatura ambiente e incubadas a 37°C por 48 horas. Os diâmetros dos halos de inibição microbiana foram medidos valendo-se de duas medidas de forma perpendicular entre si, sendo obtida a média de seus comprimentos. Para o teste de exposição direta, 216 cones de papel absorventes esterilizados nº50 foram imersos nas suspensões de bactérias por 5 minutos, e a seguir, foram colocados em placas de Petri e cobertos com 10 mL de uma das soluções testes. Em intervalos de 1, 5, 10 e 30 minutos, 54 cones de papel absorventes foram retirados do contato com as substâncias, transportados individualmente e imersos em 7 mL de Lethen Broth, e incubados a 37°C por 48 horas. O crescimento microbiano foi avaliado pela turbidez do meio de cultura. Um inóculo de 0,1 mL obtido do Lethen Broth foi transferido para 7 mL de BHI, e incubado nas mesmas condições descritas. O crescimento microbiano foi novamente avaliado pela turbidez do meio de cultura. O teste de difusão em agar apresentou halos de inibição maiores que 10 mm para todas as substâncias sobre bactérias. No teste por exposição direta o cloreto de cetilpiridínio, o gluconato de clorexidina e a clorexidina associada ao cetilpiridínio apresentaram efeito antibacteriano sobre todos os microrganismos testados somente após 10 minutos. As soluções antissépticas estudadas apresentaram potencial antibacteriano em suspensões planctônicas de *S. mutans*, *S. aureus* e *E. faecalis*.

Palavras-chave: Antissépticos bucais. Efeito antibacteriano. Ação antibacteriana. Efeito antimicrobiano.

UNIVERSIDADE DE CUIABÁ



ABSTRACT

ABSTRACT

SOUSA, V. **Effect of mouthwashes on *S. mutans*, *S. aureus* and *E. faecalis* using two research methods.** 2014. 58 f. Thesis (MA) - Graduate of Dental Science, University of Cuiabá, Cuiabá, 2015.

The antibacterial effect of six mouthwash was evaluated against *S. mutans*, *S. aureus* and *E. faecalis* by means of agar diffusion and direct exposure tests. For this, strains of *S. mutans* (ATCC 27853), *S. aureus* (ATCC 6538) and *E. faecalis* (ATCC 29212) were inoculated into 7 ml of BHI and incubated at 37 ° C for 24 hours. For the agar diffusion test, 18 Petri dishes with 20 ml of BHIA were inoculated with 0.1 ml of the microbial suspensions, using sterile swab, in order to obtain a confluent growth. Fifty-four paper disks with 9 mm diameter were immersed in the experimental solution of 0.12% chlorhexidine gluconate, cetylpyridinium chloride 0.07% solution based on essential oils (Listerine Zero), benzethonium chloride 1.33 mg / hydrochloride lidocaine 25 mg, solution-based essential oils (Malvatricin) chlorhexidine 0.12% + cetylpyridinium(Noplax) for one minute. Then three disks of paper containing one of the irrigating solutions were placed on the surface of BHIA. The plates were maintained for one hour at room temperature and incubated at 37 ° C for 48 hours. The diameters of the zones of microbial inhibition were measured making use of two measurements perpendicular to each other and obtained the average of their lengths. For direct exposure test, 216 cones sterile absorbent paper No. 50 were immersed in the bacterial suspension for 5 minutes, and then were placed in Petri dishes and covered with 10 ml of the test solutions. At intervals of 1, 5, 10 and 30 minutes cones 54 of absorbent paper were removed from contact with substances individually transported and immersed in 7 mL of Letheen Broth and incubated at 37 ° C for 48 hours. Microbial growth was assessed by turbidity of the culture medium. An inoculum of 0.1 ml of Letheen Broth obtained was transferred to 7 ml of BHI broth, and incubated under the same conditions described. Microbial growth was assessed again by the turbidity of the culture medium. The agar diffusion test showed zones of inhibition greater than 10 mm for all substaces against bactérias. In testing by direct exposure cetylpyridinium chloride, chlorhexidine gluconate and chlorhexidine associated with cetylpyridinium showed antibacterial effect on all microorganisms tested only after 10 minutes. The antiseptic solutions studied showed antimicrobial activity in planktonic suspensions of *S. mutans*, *S. aureus* e *E. faecalis*.

Keywords: Oral antiseptics. Antibacterial effect. Antibacterial. Antimicrobial effect.



ESTÁDIO DE CUIABÁ



LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Médias dos diâmetros dos halos de inibição microbiana das soluções testadas por meio de difusão em Agar (em milímetros).....	39
Tabela 2 -	Efeito antibacteriano das soluções analisadas em teste de exposição direta.....	40



LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

ADA	American Dental Association
ATCC	American Type Culture Collection
BAGN	Bacilos Aeróbios Gram-negativos
BHIA	Brain Heart Infusion Agar
BHI	Brain Heart Infusion
CAGP	Cocos Aeróbios Gram-positivos
CCP	Cloreto de cetilpiridínio
EUA	Estados Unidos América
IgA	Imunoglobulina A
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mm³	Milímetro cúbico
pH	Potencial hidrogênico
UTI	Unidade Terapia Intensiva
RJ	Rio de Janeiro
RS	Rio Grande do Sul
SP	São Paulo
UTI	Unidade Terapia Intensiva
°C	Graus Celsius
μL	Microlitro
μg	Micrograma
%	Porcentagem



SUMÁRIO

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	22
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
3.1	INDICADORES BIOLÓGICOS.....	34
3.2	SOLUÇÕES EXPERIMENTAIS.....	34
3.3	TESTE DE DIFUSÃO EM AGAR.....	35
3.4	TESTE DE EXPOSIÇÃO DIRETA.....	35
4	RESULTADOS.....	38
4.1	TESTE DE DIFUSÃO EM ÁGAR.....	38
4.2	TESTE DE EXPOSIÇÃO DIRETA.....	38
5	DISCUSSÃO.....	42
6	CONCLUSÃO.....	47
	REFERÊNCIAS.....	49



1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A cavidade bucal apresenta uma microbiota complexa sob o ponto de vista quantitativo e qualitativo. Foram identificadas mais de 700 espécies diferentes de microrganismos, incluindo bactérias, fungos, protozoários e vírus (BAMMANN; ESTRELA, 2004; PASTER et al., 2001; KOLENBRANDER et al., 2006).

A colonização da cavidade bucal e suas estruturas ocorrem por meio do contato com a microbiota materna (lactobacilos, corinebacterias, estreptococos e leveduras) e objetos. Gradativamente essa microbiota fica abundante e diversificada podendo conter 10^8 a 10^{11} bactérias/mL (TRABULSI, et al., 2002; PANNUTI, 2003; SAFDAR, CRINICH, MAKI, 2005). Loesche (1997) destacou que a microbiota bucal apresenta uma série de alterações no decorrer da vida do indivíduo. Até o rompimento dos dentes por volta dos 6º a 9º meses de vida, o *Streptococcus salivarius* é a bactéria predominante da microbiota normal. Esta colonização da cavidade oral é específica e envolve um processo de interação bacteriana com os receptores dos tecidos do hospedeiro. 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 (FERNANDES; FERNANDES FILHO, 2000).

Cabe salientar que a microbiota oral co-existe harmonicamente com o hospedeiro, ou seja, mantém uma homeostasia. Esta microbiota pode expressar seu potencial de patogenicidade, quando houver um desequilíbrio, levando ao desenvolvimento de diferentes patologias (SCHONFELD, 1992; MARSH, 2000, 2003; BAMMANN; ESTRELA, 2003, 2004, 2009; TORTORA et al., 2005, 2009).

Várias doenças da boca foram identificadas (NEVILLE et al., 2002). Todavia, dentre estas, nota-se elevadas prevalências da cárie dental, doenças periodontais e infecções endodônticas.

A cárie dental é considerada uma doença infectocontagiosa, caracterizada por solubilizar os minerais do esmalte. Entre os principais microrganismos, que aumentados em número na placa microbiana levam ao seu surgimento, destacam-se o *Streptococcus mutans*, o *Lactobacilos sp.* e o *Actinomyces sp.* (LOESCHE, 1993).

Dentre os diversos microrganismos que compõe a microbiota endodôntica, o *E. faecalis* se mostrou potencialmente importante nas infecções endodônticas (MOLLANDER et al., 1998; SUNDQVIST et al., 1998; PORTENIER et al., 2003).

Outro microrganismo muito importante, porém que tem sido discretamente estudado pela odontologia é o *S. aureus*. Este microrganismo coloniza preferencialmente a nasofaringe, pele e mucosa, especialmente a mucosa nasal. Pode também estar relacionado a várias outras condições patológicas e é considerado um dos mais importantes causadores de toxinfecções alimentares (CASTRO et al., 1984, FIGUEROA et al., 2002; RODRIGUES, 2006).

Smith et al. (2001) justificaram a importância de se atentar à cavidade bucal como reservatório de *S. aureus*. Para tanto relataram importantes evidências da participação desta bactéria em infecções estomatológicas como queilite angular, algumas infecções endodônticas, osteomielite dos maxilares, parotidites e mucosite. Na população saudável, o aumento da idade parece estar relacionado com o aumento na incidência de *S. aureus* na cavidade bucal, sendo que a presença de próteses e a redução do fluxo salivar provavelmente colaboram para essa alteração (KAKLAMANOS et al., 2005).

As doenças periodontais podem ser classificadas em gengivite, periodontite crônica, periodontite agressiva, doença periodontal necrosante e abscesso periodontal (SOCRANSKY; HAFFAJEE, 2005a). A periodontite crônica, segundo a Academia Americana de Periodontia, pode ser definida como uma inflamação gengival que se estende aos tecidos de suporte adjacentes. A doença é caracterizada pela perda de inserção devido à destruição do ligamento periodontal e dos tecidos ósseos de suporte (PERSON, 2005). Na doença periodontal foi identificada uma associação entre espécies bacterianas. (SOCRANSKY et al., 1998; SOCRANSKY; HAFFAJEE, 2002; SOCRANSKY; HAFFAJEE, 2005a,b).

Outro aspecto de relevância à microbiota bucal relaciona-se à presença de bactérias no sangue (bacteremia) que constitui um meio pelo qual as infecções locais se espalham para órgãos distantes. Normalmente é transitória, devido a uma resposta vigorosa do sistema imune quando a bactéria é detectada no sangue (VILLORIA; COSTINHA, 2013).

Um dos recursos para o controle da microbiota bucal é o emprego de colutórios (enxaguatórios) bucais, que têm sido utilizados como agentes antibacterianos com o intuito de reduzir os microrganismos e prevenir sua disseminação. Eles são de uso fácil, refrescante, possuem acesso os microrganismos da cavidade bucal mesmo em áreas de maior dificuldade (ASADOORIAN, 2006; LIMA JÚNIOR et al., 2005; JARDIM; JARDIM, 1998; CIANCIO, 2004, 2007).

Neste sentido, várias substâncias têm sido preconizadas para realização desta antissepsia. Dentre estas, a clorexidina é uma substância cujo efeito antibacteriano foi amplamente estudado, sendo, portanto, indicada para este fim. Outras substâncias também indicadas para a antissepsia bucal são os amônios quaternários, que também se mostram substâncias com efeito antimicrobiano (LAWRENCE, 1960; SCHROEDER et al., 1962; GJERMO et al., 1970; BONESVOLL; GJERMO, 1978; PELCZAR-JR et al., 1993; QUIRYNEN et al., 1999; SLOTS; RAMS, 1992; SLOTS; TAUBMAN, 1996; LOESCHE, 1993; HAPS et al., 2008; BUSSCHER et al., 2008; TORTORA et al., 2009; ALVES et al., 2012; ESTRELA et al., 2012; MORAN et al., 2001; OSSO et al., 2013).



2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

A cavidade bucal é a principal porta de entrada dos microrganismos existentes no meio externo para o interior do corpo humano (MINS et al., 2005). De todos os sítios do corpo humano, a cavidade bucal é aquela que apresenta a maior quantidade e diversidade de microrganismos. As características anatomo-fisiológicas da boca são responsáveis por esta diversidade, uma vez que a boca apresenta diferentes tipos de tecidos e estruturas (GRANER et al., 2005).

A microbiota da boca encontra-se distribuída em quatro ecossistemas bucais: epitélio bucal, dorso da língua, superfície dentária supragengival e superfície dentária e epitelial subgengival, além da saliva, que por estar em contato com os tecidos bucais também pode apresentar células provenientes de diferentes sítios da boca (SHEARER, 1996; UMEDA, 1998; MARSH, 2000, 2003; SPRATT; PRATTEN, 2003; TANNER et al., 2006). Uliana et al. (2003) relataram a presença de 400 a 500 diferentes espécies de microrganismos anaeróbios, aeróbios facultativos e microaerófilos na microbiota bucal.

A saliva é uma secreção complexa composta por 99% de água e 1% de moléculas orgânicas e inorgânicas. Entre as funções da saliva pode-se citar a lubrificação dos tecidos bucais, a manutenção da integridade das mucosas, o efeito tampão, ajuda na digestão dos alimentos através de enzimas, ação antimicrobiana e auxílio importante no paladar e na fonação (LYENA-PUY, 2006). Algumas substâncias encontradas na saliva atuam como mecanismo de defesa. A lisozima promove a lise da parede celular de bactérias gram positivas; a lactoferrina causa depleção de ferro; a lactoperoxidase é uma enzima bacteriostática; as glicoproteínas interferem na agregação bacteriana e a IgA interfere na aderência bacteriana (SPENCE, 1991; DENNESEN et al., 2003; PEREIRA, 2003).

Socransky e Haffajee (1992) relataram que na cavidade bucal existem aproximadamente 550 a 600 espécies diferentes de bactérias, além de vírus e fungos. A composição desta microbiota depende de diversos fatores, tais como o pH do meio, a disponibilidade de nutrientes e água, a anatomia das estruturas bucais, o fluxo salivar e a presença ou ausência de substâncias antimicrobianas presentes na saliva. Desta forma, pode-se entender que a microbiota bucal é diversificada e

complexa e pode estar aderida aos dentes e/ou a mucosas e demais estruturas da boca.

A microbiota bucal aderida aos tecidos duros e moles da boca é denominada placa bacteriana. Trata-se de um aglomerado de bactérias aderidas aos tecidos e embebidas em uma matriz extracelular (polissacarídeos, exopolissacarídeos) e saliva (ABOPREV, 2001; PEREIRA, 2003; MARINHO; ARAÚJO, 2007). Atualmente a placa bacteriana recebeu a denominação de biofilme. O biofilme é uma comunidade cooperativa, bem organizada de células microbianas aderidas a uma superfície (NASCIMENTO et al., 2006). Dentre as bactérias mais comumente encontradas no biofilme pode-se citar *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrius*, *Lactobacillus spp*, *Actinomyces ssp*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Actinomyces actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Treponema spp*. Além destas podem ser encontrados também vírus e fungos (AMARAL, 2001; SCANNAPIECO, BUSH, PAJU, 2003).

Carranza e Newman (1996) relataram que o processo de formação da placa pode ser dividido em 3 fases. Na primeira fase ocorre a formação da película dental, representando a fase inicial em que as superfícies dos tecidos da cavidade bucal são cobertas por uma película de glicoproteína derivada de componentes salivares e do fluido gengival, bem como por células bacterianas. Na segunda fase, ocorre a colonização inicial das superfícies dentárias, predominantemente por microrganismos facultativos Gram positivos. Essa placa amadurece e ocorre uma transição do ambiente aeróbio para um meio altamente privado de oxigênio, em que prevalecem as bactérias Gram negativas anaeróbias. Na terceira fase ocorre a colonização secundária e a maturação da placa. Nesta fase os microrganismos que não iniciaram a colonização das superfícies limpas dos dentes aderem a células bacterianas que já estão na massa da placa, através de um processo conhecido como co-agregação.

Os microrganismos da cavidade bucal estabelecem relações entre si e com o hospedeiro (MAGER et al., 2003), podendo estas ser de natureza benéfica para ambos, relação de antibiose, ou com a ocorrência de algum tipo de desequilíbrio, a antibiose. Esta é uma característica comum em muitas doenças infecciosas (SCHONFELD, 1992; MARSH, 2000, 2003; BAMMANN; ESTRELA, 2003, 2004, 2009; TORTORA et al., 2005, 2009).

Socransky e Haffajee (1992) classificaram os microrganismos como patógenos em potencial ou não. Para um microrganismo ser considerado patógeno, deve estar associado a uma doença; ser evidenciado em número elevado nos sítios doentes; estar ausente ou em número reduzido nos sítios que demonstrem resolução clínica; induzir resposta do hospedeiro na forma de uma alteração celular ou resposta imune humoral; ser capaz de causar doença em modelos de animais experimentais; demonstrar fatores de virulência responsáveis por permitir ao microrganismo causar destruição dos tecidos do hospedeiro.

Várias patologias foram identificadas na cavidade bucal (NEVILLE et al., 2002). Entretanto, dentre estas, nota-se elevada prevalência da cárie dental, doenças periodontais e infecções endodônticas.

A cárie dental é a principal doença bucal de origem bacteriana. É uma doença infectocontagiosa e multifatorial, caracterizada pela destruição local dos tecidos dentários causada pela ação de bactérias específicas, que realizam a fermentação dos carboidratos da dieta, produzindo ácidos orgânicos que causam a queda do pH, e, conseqüentemente, a desmineralização dos tecidos dentários (PINTO, 2005). Desta maneira, o hospedeiro suscetível, a microbiota específica e a dieta cariogênica representam fatores importantes e imprescindíveis na etiologia do processo de cárie dental. Entre os principais microrganismos, que aumentados em número na placa microbiana levam ao surgimento de cárie dentária, destacam-se o *Streptococcus mutans*, o *Lactobacilos sp.* e o *Actinomyces sp* (LOESCHE, 1993).

O *Streptococcus mutans* é considerado o microrganismo mais cariogênico encontrado no biofilme dental, devido sua capacidade de usar a dieta a base de carboidratos para sintetizar polissacarídeos extracelulares, além da sua capacidade acidúrica e acidogênica. Os polissacarídeos extracelulares são importantes fatores de virulência do *S. mutans* por promoverem aderência bacteriana à superfície dentária (SCHILLING et al., 1992; TRAHAN, 1995), contribuir para a integridade estrutural do biofilme dentário (KOO et al., 2009; XIAO et al., 2010) e, conseqüentemente, induz ao aumento da desmineralização do esmalte (CURY et al., 2000).

Os principais habitats do *S. mutans* são boca, faringe e intestino (LOESCH, 1986). Apesar desta bactéria não estar presente em elevada quantidade

no biofilme, apresenta papel central na etiologia da cárie (HAMADA et al., 1980; NEWBRUM, 1988; MARSH, 2003). O *S. mutans* é um coco Gram positivo, que além de ser conhecido patógeno dentário é considerado causador de bacteremia e endocardite (INABA et al., 2010).

Destacam-se, entre os agentes agressores da polpa dentária, os microrganismos responsáveis pelo processo da cárie dentária. Podem-se observar duas situações distintas quanto ao tipo de infecção endodôntica. Infecções primárias (iniciais) aparecem em necroses pulpares não submetidas a tratamento (com ou sem rarefação periapical). Caracterizam-se por apresentar uma infecção polimicrobiana com bactérias anaeróbias Gram-negativas. Já as infecções secundárias ocorrem em dentes submetidos a tratamentos endodônticos associados a insucessos. Observa-se neste caso o predomínio de bactérias facultativas Gram positivas (NAIR, 2004). Dentre os diversos microrganismos que compõem a microbiota endodôntica, o *Enterococcus faecalis* apresenta importante papel nas infecções endodônticas (MOLLANDER et al., 1998; SUNDQVIST et al., 1998; PORTENIER et al., 2003).

O *E. faecalis* apresenta fatores de virulência que incluem enzimas líticas, citolisinas, substância de agregação e ácido lipoteicóico. Este microrganismo apresenta a capacidade de aderir às células do hospedeiro e de expressar proteínas que permitem a competição com outras células bacterianas (STUART et al., 2006).

Orstavik et al. (1990) demonstraram que o *E. faecalis* invade os túbulos dentinários, coloniza a luz do canal radicular e sobrevive, sem o suporte de outras bactérias, característica que não é comum a todas bactérias. Gonçalves et al. (2004) apontaram o *E. faecalis* como a espécie mais prevalente na microbiota subgengival de pacientes com periodontite crônica e pacientes com severa imunossupressão. O *E. faecalis* é o microrganismo mais comumente isolado de dentes com infecções pós-tratamento endodôntico (SEDGLEY et al., 2005).

Russel et al. (1999) e Sumi et al. (2002) verificaram que o biofilme de dentes e próteses pode funcionar como reservatório estável para patógenos respiratórios, inclusive para o *S. aureus*. Este fato pode facilitar a colonização por estes microrganismos da orofaringe, sua consequente aspiração e o desenvolvimento de pneumonia, especialmente entre idosos institucionalizados e debilitados por outros complicadores sistêmicos.

Os estudos na literatura odontológica relacionados ao *S. aureus* foram motivados fundamentalmente pela vontade de melhor compreender a ecologia da cavidade bucal (BUERIS et al., 2005; SMITH et al., 2003), pela preocupação com a biossegurança (PEREIRA et al., 1999) pela possibilidade de participação dessa bactéria em alterações patológicas da cavidade bucal (MOLINA, 2008), e ainda pela ameaça, especialmente para os idosos, de aspiração desse patógeno e desenvolvimento de pneumonia (SUMI et al., 2002; RUSSEL et al., 1999). Porém estudos vêm mostrando que essa espécie bacteriana é também passível de controle através da higiene bucal regular (CASTRO et al., 2000).

O *S. aureus* tem se destacado em razão de sua versatilidade de adaptação e sobrevivência em ambientes hostis por longos períodos como, por exemplo, no tempo prolongado de viabilidade na saliva ou sangue tornando assim, este microrganismo, um dos agentes bacterianos patogênicos mais frequentes em infecções cruzadas nos consultórios odontológicos (GUIMARÃES JUNIOR, 2001; CUNHA et al., 2002; MOTTA, 2005; ROSSI et al., 2008).

A boca é reconhecidamente uma fonte de microrganismos que podem levar a bacteremia, porém os *S. aureus* tem sido pouco detectados em pacientes com bacteremia associada a procedimentos dentários (SMITH et al., 2001).

O *S. aureus* tornou-se um paradigma das infecções hospitalares devido a sua frequência elevada e a sua patogenicidade que o capacitam a produzir doenças tanto em indivíduos imunocomprometidos quanto em indivíduos saudáveis; sua fácil disseminação intra-hospitalar e resistência a antibióticos. O paciente que adquire *S. aureus* no hospital pode apresentar colonização da narina, pele, brônquios ou reto, ou ainda apresentar infecções de todo nível de gravidade, desde superficiais e limitadas até infecções sistêmicas graves (BURNETT et al., 1978; MARANGONI, 1997). A contaminação por este microrganismo nos hospitais é muito mais comum e decorrente da susceptibilidade dos pacientes ali internados (CAVALCANTI et al., 2006; SANTOS et al., 2007; TRABULSI et al., 2008).

O biofilme é, sabidamente, o fator iniciante do desenvolvimento de cáries e gengivites, sendo seu controle uma prática de higiene bucal (MOORE et al., 1984). O controle do biofilme é um conjunto de medidas que tem por objetivo sua desorganização e a prevenção de sua recorrência, podendo ser realizado através de

meios mecânicos ou químico (BUISCHI et al.,1999). Entretanto, conseguir um controle aceitável desta placa na maioria dos pacientes não é tarefa fácil. Muitas vezes, os habituais métodos mecânicos de remoção não são suficientes. Neste caso, existem evidências científicas de que os enxaguatórios bucais (métodos químicos) podem desempenhar um papel chave e de valor significativo como coadjuvantes dos métodos mecânicos para prevenção e tratamento das doenças periodontais. Entretanto, em nenhum caso devem substituir os métodos mecânicos de remoção da placa, e sim atuar como auxiliares do mesmo (ADDY; MOORAN, 1997; ROJAS et al., 2005).

O controle químico do biofilme é considerado um coadjuvante na prevenção e terapêutica das cáries e das doenças periodontais. Logo pode ser feito tanto de forma profilática, como terapêutica. O controle químico profilático do biofilme é empregado quando os atos mecânicos são ineficientes. Este tipo de controle leva em consideração que as bactérias fazem parte da microbiota da cavidade bucal e, seu objetivo, não é a eliminação das mesmas, mas, sim evitar que ocorra um desequilíbrio (MASH, 1992).O controle terapêutico é utilizado quando o indivíduo apresenta uma microbiota desequilibrada, tanto em relação a cárie ou a periodontite, com o objetivo de propiciar o reequilíbrio da microbiota e sua harmonia com o hospedeiro (CURY,1997).

A eficácia do controle da placa bacteriana, e conseqüentemente da cárie dentária, através do emprego de agentes antimicrobianos já foi demonstrada por diversos autores em estudos *in vitro* e *in vivo*. (GJERMO et al., 1970; CURTIS; DOOLEY, 1979).

O uso dos enxaguatórios bucais remonta a meados de 1800 e foi se consolidando com o tempo devido às dificuldades com a escovação. Eles são de usos fácil, refrescantes, possuem acesso aos microrganismos da cavidade bucal mesmo em áreas de maior dificuldade (ASADOORIAN, 2006; LIMA JÚNIOR et al., 2005; JARDIM; JARDIM, 1998; CIANCIO, 2004, 2007).

A eficácia dos antissépticos orais é atribuída à sua atividade antimicrobiana, preferencialmente em produtos de efeito intra-oral prolongado, definido como substantividade ou habilidade de um agente ativo de colar na superfície do tecido a ser tratado e de ser liberado com o tempo, provendo atividade

antibacteriana sustentada (ASADOORIAN, 2006; BASCONES et al., 2002). As propriedades de um antisséptico ideal incluem: estabilidade, baixa tensão superficial, poder germicida e letalidade em baixas concentrações, ausência de toxicidade e poder de penetração. No entanto, nenhum produto disponível no mercado possui todos os requisitos acima citados, o que justifica os efeitos colaterais ou a pouca eficiência apresentada por alguns (MONFLIN et al., 2000).

A clorexidina é o agente antimicrobiano mais empregado para o controle do biofilme e gengivites (BAEHNI et al., 2003). Ela vem demonstrando ter propriedades antimicrobianas de longa duração (ação residual) devido a rara capacidade de se ligar reversivelmente às superfícies dentais, hidroxiapatita e mucinas salivares. Assim, o gluconato de clorexidina adsorve-se nos tecidos dentais (hidroxiapatita) e em mucinas salivares sendo liberado quando sua concentração no meio é reduzida. Esta possibilidade de se formar reservas de clorexidina na superfície dental da qual ela é lentamente liberada e capaz então de prevenir a colonização bacteriana e inibir o desenvolvimento do biofilme (ROLLA et al., 1970; KOMOROWSKI et al., 2000; BASRANI et al., 2002; ZAMANY et al., 2003; GOMES et al., 2006; SOARES et al., 2007).

A clorexidina é um antibacteriano de largo espectro do grupo dos biguanidas com alto poder desinfetante. O mecanismo de ação antibacteriano da clorexidina começa com a ligação na parede celular da bactéria. Ocorrendo o aumento da permeabilidade da parede celular do microrganismo, permitindo que o agente antimicrobiano penetre no citoplasma e promova o rompimento da membrana celular e perda dos componentes intracelulares (RECHE, 2005).

A clorexidina tem sido utilizada em diferentes fórmulas para o controle da placa dental. No Brasil, ela é mais frequentemente encontrada em enxaguatórios na concentração de 0,12%, mas também pode ser usada na concentração de 0,2% (BASTOS et al., 2004). Inúmeros estudos demonstraram a eficiência do gluconato de clorexidina 0,12% na redução da formação do biofilme. Entretanto o uso diário desta solução apresenta efeitos colaterais indesejáveis como manchas nos dentes e na língua, perda do paladar e sensação de queimação na mucosa bucal. Por isso, outras formulações têm sido desenvolvidas para melhorar esses aspectos, mantendo-se o adequado controle da formação da placa bacteriana na cavidade bucal (SOUZA, 2007). Embora a clorexidina seja reconhecida como agente

antimicrobiano mais eficiente sobre a placa dental, seu gosto extremamente amargo é uma limitação nos preparos farmacêuticos. No entanto, algumas substâncias adoçantes e flavorizantes usados nas formulações podem inibir a atividade antibacteriana da clorexidina (CURY, 2000).

Outros enxagatários apresentam em sua composição óleos essenciais. A atividade bactericida desses enxagatários tem sido mostrada em estudos *in vitro* e em estudos clínicos sobre bactérias Gram positivas e Gram negativas, assim como sobre leveduras (FINE et al., 2005). A ação antimicrobiana sobre bactérias está associada à capacidade desses agentes de romper a membrana celular bacteriana ou inibir a atividade de enzimas culminando na morte celular dos microrganismos (LOTUFO et al., 2009). Seu efeito bactericida é atribuído a sua habilidade de se difundir rapidamente, dentro de aproximadamente 30 segundos, pela estrutura do biofilme dental (OUHAYOUM, 2003).

O enxagatário bucal Malvatricin é popularmente conhecido como fitoterápico pelo fato de apresentar malva em sua preparação. Tem como componentes ativos a tirotricina e o quinosol. Segundo a bula fornecida pelo fabricante, esse antisséptico tem indicações de uso para aftas, dor de garganta e afecções da boca. O Formulário Nacional de Fitoterápicos define fitoterápico como medicamentos obtidos empregando-se exclusivamente matérias primas ativas vegetais, excluindo assim o Malvatricin desta categoria (BRASIL, 2010).

Alguns estudos têm sugerido que o Malvatricin pode apresentar eficácia antimicrobiana, tanto *in vitro* (MONFRIN et al., 2000; DRUMOND et al., 2004), quanto *in vivo* (WEYNE, 2003). O Malvatricin é um produto que apresenta antibióticos em sua formulação (tirotricina (gramicidina 20 a 25% e tirocidina cerca de 60%), atuando sobre bactérias Gram-negativas e com ação tópica duradoura (MONFRIN; RIBEIRO, 2000). Considerando a sua composição, existem estudos que sugerem que estes produtos não sejam utilizados com fins de controle do biofilme dental, tanto sistêmica quanto topicamente, uma vez que apresentam efeitos colaterais específicos importantes, tal como a resistência bacteriana (GENCO, 1991, SLOTS et al., 1990).

O cloreto de cetilpiridínio, assim como o cloreto de benzalcônio e o cloreto de benzetônio são compostos de amônio quaternário. Estas substâncias apresentam atividade antimicrobiana relacionada a parte catiônica da molécula (carga positiva da

molécula) (PELCZAR-JR et al., 1993), semelhantemente ao mecanismo de ação da clorexidina (GRANJERO et al., 1993; MENDES et al., 1995; MONFRIN; RIBEIRO, 2000; TORTORA et al., 2009; BUSSCHER et al., 2008; ESTRELA et al., 2012).

O cloreto de cetilpiridínio reduz os microrganismos da placa bacteriana, entretanto apresenta algumas desvantagens, tais como a liberação rápida e a possibilidade de ser neutralizado. Seu uso prolongado, da mesma forma que ocorre com a clorexidina, pode promover a sensação de queimação, descoloração dentária e da língua, ulceração da mucosa e aumento na formação de tártaro em função de este composto promover o aumento dos níveis de cálcio e fósforo (SIMÕES et al., 2011).

Estrela et al. (2012) analisaram o efeito antimicrobiano do cloreto de cetilpiridínio (CCP) em canais radiculares infectados por *E. faecalis*. Os resultados mostraram que o cloreto de cetilpiridínio reduziu o número de bactérias, porém foi observada a presença deste microrganismo nos canais radiculares após o processo de desinfecção do canal radicular.

Quando se analisa a saúde bucal como estado de harmonia, normalidade ou higidez da boca deve-se considerar que ela só tem significado quando acompanhada em grau razoável de saúde geral do indivíduo (QUELUZ et al., 2000). Camargo (2005) considera que a condição bucal altera a evolução e a resposta ao tratamento médico, assim como a saúde bucal fica comprometida pelo estresse e pelas interações medicamentosas. Ainda, segundo este autor a boca abriga microorganismos que alteram a qualidade, a quantidade e o pH de saliva e que facilmente podem chegar à corrente circulatória, expondo o paciente a maior risco de infecção.

Sob este ponto de vista, verifica-se que no ambiente hospitalar não são realizados somente procedimentos cirúrgicos, mas também a supervisão dos pacientes internados em relação à manutenção da saúde bucal e a prevenção das doenças, incentivando a higienização e a constante inspeção da boca e estruturas associadas (PIMENTEL, 2011).

Dentre as doenças sistêmicas que acumulam mais evidências científicas da sua relação com as periodontais, estão às doenças respiratórias. Vários estudos indicam que as periodontopatias podem influenciar o curso das infecções

respiratórias destacando-se as pneumonias (SCANNAPIECO, 2002). A pneumonia é uma infecção debilitante. Nos hospitais, a pneumonia nosocomial exige atenção especial, é a segunda causa de infecção hospitalar e é responsável por taxas de morbidade e mortalidade em pacientes de todas as idades (SCANNAPIECO et al., 2004).

Os pacientes mais vulneráveis a essa importante infecção são aqueles internados em Unidades Terapia Intensiva (UTI) em especial os que estão sob ventilação mecânica (NAKATANI et al., 2003). Estudos recentes mostraram que a quantidade de biofilme em pacientes da UTI, aumenta com o tempo de internação, paralelamente ao aumento de patógenos respiratórios que colonizam o biofilme (SCANNAPIECO et al., 2004).

Vários aspectos comprometem a higienização da cavidade bucal e favorecem ainda mais o crescimento microbiano com as dificuldades e/ou impossibilidade do auto cuidado, a presença do tubo traqueal, que dificulta o acesso à cavidade bucal e conseqüente formação do biofilme (BRENNAN et al., 2004). Assim, a medicina periodontal surgiu baseada em estudos que conferem a doença periodontal uma relação direta com diversas morbidades sistêmicas, tais como aterosclerose, infarto agudo do miocárdio, nascimentos prematuros, baixo peso no nascimento, problemas respiratórios, gastrites, endocardites e bacteremias (MUNRO et al., 2004).

Quando a condição respiratória do paciente deteriora a ponto de ser necessária a intubação, recursos como a ventilação mecânica podem levar ao paciente a um risco de microaspiração de patógenos até o trato respiratório inferior (CUTLER et al., 2005). O tubo orotraqueal por si só proporciona uma superfície inerte, na qual diferentes microrganismos podem aderir, colonizar e crescer, formando biofilme cujos componentes podem ser broncoaspirados (RAGHAVENDRAN et al., 2007).

Vários estudos vem determinando a higiene bucal como uma medida significativa para reduzir a pneumonia associada a ventilação mecânica (BERALDO et al., 2008). Fourrier et al. (1998) observaram que após cinco dias de internação em UTI, os pacientes que desenvolveram pneumonia nosocomial tinham sua etiologia bacteriana associada com a composição da placa bacteriana. Outro aspecto de relevância à microbiota bucal relaciona-se à presença de bactérias no sangue

(bacteremia), que constitui um meio pelo qual as infecções locais se espalham para órgãos distantes. Normalmente é transitória, devido a uma resposta vigorosa do sistema imune quando a bactéria é detectada no sangue. À sua vez, a endocardite infecciosa representa uma infecção rara, porém séria, envolvendo as válvulas cardíacas ou as superfícies endoteliais do coração (AMARAL et al., 2009; VILHORA; COSTINHA, 2013).

Considerando a importância do papel das bactérias em frequentes doenças que ocorrem na boca e as possíveis influências destes microrganismos em outras infecções, inclusive sistêmicas, a análise da atividade antibacteriana das soluções antissépticas disponibilizadas no mercado representam aspectos de importância microbiana.

O presente estudo apresenta como objetivo avaliar o efeito antimicrobiano dos antissépticos bucais sobre *E. faecalis*, *S.aureus* e *S. mutans* por meio dos testes de difusão em agar e exposição direta.



3 MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 INDICADORES BIOLÓGICOS

Para o presente estudo foram utilizados três amostras de microrganismos obtidas da *American Type Culture Collection*.

1. *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212)
2. *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538)
3. *Streptococcus mutans* (ATCC 27853)

As cepas foram inoculadas em 7 mL de *Brain Heart Infusion* (BHI; Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA) e incubadas a 37°C por 24 horas. Os três microrganismos indicadores foram cultivados na superfície do *Brain Heart Infusion Agar* (BHIA; Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA) seguindo as mesmas condições da incubação. Células microbianas foram suspensas em solução fisiológica para dar uma concentração final de cerca de 3×10^8 células/mL, semelhante ao tubo nº 1 da escala *MacFarland*.

3.2 SOLUÇÕES EXPERIMENTAIS

As soluções testadas neste experimento foram: 1º- gluconato de clorexidina a 0,12% (Colgate Periogard®, Colgate-Palmolive Ind. e Com. Ltda, S.B. Campo, SP, Brasil), 2º- cloreto de cetilpiridínio a 0,07% (Oral B Pro Saúde Clinical Protection® The Procter & Gamble manufacturing Company, 2200 Lower Road, Iowa City, IA 52240 EUA), 3º- solução a base de óleos essenciais (Listerine Zero®, Johnson & Johnson Ind. Ltda, S. J. Campos, SP, Brasil), 4º- cloreto de benzetônio 1,33 mg / cloridrato de lidocaína 25 mg (spray antisséptico Hertz®, Kley Hertz S. A., Porto Alegre, RS, Brasil), 5º- solução a base de óleos essenciais (Malvatricin®, Laboratório Daudt Oliveira Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), 6º- solução de clorexidina 0,12% + cetilpiridínio (Noplak Max®, Laboratório Daudt Oliveira Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil).

3.3 TESTE DE DIFUSÃO EM AGAR

Para o teste de difusão em ágar, 18 placas de Petri com 20 ml de BHIA foram inoculadas com 0,1 ml da suspensão microbiana, com o auxílio de swabs esterilizados. O inóculo foi espalhado na superfície do meio de cultura, de modo a obter um crescimento confluyente. Cinquenta e quatro discos de papel com 9 mm de diâmetro foram imersos nas soluções experimentais durante 1 minuto. Para cada placa contendo o meio de cultura (BHIA) foram colocados 3 discos de papel. As placas foram mantidas por 1 hora a temperatura ambiente, e então, foram incubadas a 37°C por 48 horas. Os diâmetros das zonas de inibição microbiana foram medidos com paquímetro digital os discos de papel contendo as substâncias. Foram feitos controles positivos e negativos, mantendo-se três placas inoculadas e três placas sem inoculação, com períodos e condições de incubação idênticas. Todos os experimentos foram realizados em condições assépticas e em triplicata.

3.4 TESTE DE EXPOSIÇÃO DIRETA

Para o teste de exposição direta, duzentos e dezesseis cones de papel absorventes esterilizados nº 50 (Tanari, Tanariman Indústria, Ltda., Manacaru, AM, Brasil) foram imersos nas suspensões de microrganismos por 5 minutos, e foram colocados em placas de Petri e cobertos com uma das seis soluções testadas. Em intervalos de 01, 05, 10 e 30 minutos, cinquenta e quatro cones de papel absorventes foram retirados do contato com as substâncias, transportados individualmente, e imersos em 7mL de *Lethen Broth* (LB, Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA), um meio contendo neutralizadores ou acrescido de tiosulfato de sódio (P.A., Art Laboratories, Campinas, SP, Brasil) e Tween 80 em concentrações apropriadas, e subseqüentemente, incubados a 37°C por 48 horas. O grupo controle negativo foi composto por 7mL de *Lethen Broth* (LB, Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA) esterilizado, enquanto o grupo controle positivo foi composto por tubos de ensaio contendo 7mL de *Lethen Broth* (LB, Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA) adicionado de 0,1 mL de cada suspensão microbiana.

O crescimento microbiano foi analisado pela turbidade do meio de cultura.

Subseqüentemente, um inóculo de 0,1 mL obtido do *Lethen Broth* foi transferido para 7 mL de BHI, sob condições de incubação idênticas. A coloração de Gram foi usada nas culturas de BHI para verificar contaminação e crescimento, sendo examinados macro e microscopicamente. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e em condições assépticas.

UNIVERSIDADE DE CUIABÁ



4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 TESTE DE DIFUSÃO EM ÁGAR

As soluções antissépticas testadas apresentaram efeito antimicrobiano sobre os indicadores biológicos testados. Os halos de inibição variaram em função da solução testada ou do indicador biológico. Os resultados do teste de difusão em ágar estão apresentados na Tabela 1.

4.2 TESTE DE EXPOSIÇÃO DIRETA

As soluções de cloreto de cetilpiridínio, gluconato de clorexidina e clorexidina 0,12% associada ao cetilpiridínio apresentaram efeito antimicrobiano sobre todos os indicadores biológicos somente após 10 minutos. Os resultados do teste de exposição direta estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 1 - Médias dos diâmetros dos halos de inibição microbiana das soluções testadas por meio de difusão em Agar (em milímetros).

Substâncias/microrganismos	<i>E. faecalis</i> CAGP	<i>S. aureus</i> CFGP	<i>S. mutans</i> CAGP
Gluconato de Clorexidina 0,12%	15	20	30
Cloreto de Cetilpiridínio 0,07%	13	13	25
Solução à base de óleos essenciais – Listerine Zero [®]	10	10	11
Cloreto Benzetônio / Lidocaína	17	18	18
Solução a base de óleos essenciais-Malvatricin [®]	10	25	10
Solução de clorexidina 0,12% + cetilpiridínio – Noplak Max [®]	15	19	30

(CAGP = cocos aeróbios Gram-positivos; CFGP = cocos facultativos Gram-positivos.)

Tabela 2 - Efeito antibacteriano das soluções analisadas em teste de exposição direta.

Substâncias/microrganismos	1 min	5 min	10 min	30 min
Gluconato de Clorexidina 0,12%				
E. faecalis	+++	+++	---	---
S. aureus	+++	---	---	---
S. mutans	---	---	---	---
Cloreto de Cetilpiridínio 0,07%				
E. faecalis	+++	+++	---	---
S. aureus	+++	---	---	---
s. mutans	+++	---	---	---
Solução à base de óleos essenciais – Listerine Zero®				
E. faecalis	+++	+++	+++	---
S. aureus	+++	+++	---	---
s. mutans	---	---	---	---
Cloreto Benzetônio / Lidocaína				
E. faecalis	+++	+++	+++	+++
S. aureus	+++	+++	+++	+++
s. mutans	+++	+++	+++	---
Solução à base de óleos essenciais - Malvatricin®				
E. faecalis	+++	+++	+++	+++
S. aureus	+++	+++	+++	+++
s. mutans	+++	+++	+++	---
Solução de clorexidina 0,12% + cetilpiridínio – Noplak Max®				
E. faecalis	+++	+++	---	---
S. aureus	+++	---	---	---
s. mutans	---	---	---	---
+++ presença de crescimento		---- ausência de crescimento		

UNIVERSIDADE DE CUIABÁ



5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

A cavidade bucal é um ambiente séptico do organismo, com presença de uma microbiota complexa do ponto de vista quantitativo e qualitativo. Esta microbiota está distribuída nos quatro principais ecossistemas orais - epitélio bucal, dorso da língua, superfície dentária supragengival e superfícies dentárias - e epitelial subgengival, além da saliva, que apesar de não apresentar microbiota própria apresenta os microrganismos de todos os ecossistemas bucais e ainda microrganismos transientes, ou seja, que não fazem parte desta microbiota e ali se encontram transitoriamente (LOESCHE, 1993; BAMMANN; ESTRELA, 2009).

O controle dos microrganismos da cavidade bucal pode ser conseguido por meio da higienização da cavidade bucal e também através do uso de enxaguatórios bucais, o que possibilita considerável redução da população microbiana (ADDY; MORAN, 1997).

Várias soluções têm sido sugeridas para estas finalidades, no entanto, os enxaguatórios mais estudados recentemente incluem o gluconato de clorexidina e o cloreto de cetilpiridínio (LAWRENCE, 1960; SCHROEDER *et al.*, 1962; GJERMO *et al.* 1970; BONESVOLL; GJERMO, 1978; PELCZAR-Jr *et al.*, 1993; QUIRYNEN *et al.*, 1999; HAPS *et al.*, 2008; BUSSCHER *et al.*, 2008; TORTORA *et al.*, 2009; ALVES *et al.*, 2012; OSSO *et al.*, 2013).

Anteriormente à discussão dos resultados obtidos por este estudo, faz-se necessário esclarecer a metodologia. Para a avaliação da atividade antimicrobiana de algum agente, em geral, existem três técnicas, *in vitro*: o método de diluição, que produz um resultado quantitativo; o método de difusão em ágar, que dá uma zona de inibição em torno do agente e o método de exposição direta, que fornece informações qualitativas (ESTRELA *et al.*, 2005; BAMMANN; ESTRELA, 2009).

A metodologia foi baseada em estudos prévios (ESTRELA *et al.*, 2003, 2005). No teste de difusão em ágar, observa-se a medida dos halos de inibição de crescimento microbiano. Fatores como concentração do ágar, temperatura, pH, ausência de pré-incubação, ressecção do meio de cultura, manutenção por períodos que excedam os permitidos para a correta análise, favorecendo assim a obtenção de resultados discutíveis, porém foram controlados neste estudo. Este

método é muito utilizado em microbiologia, e também padrão para antibiograma.

A opção por estas técnicas ocorreu em função de serem simples, reprodutíveis e eficazes. Além do mais, permitem alcançar microrganismos com diferentes características morfo-tinto-respiratórias (ESTRELA et al., 2005).

Os microrganismos selecionados para este estudo estão presentes em algumas das situações, respectivamente: cárie dentária, canais radiculares infectados e infecções hospitalares. Estes microrganismos já foram estudados anteriormente, e são: *Streptococcus mutans*, um coco gram positivo; *Enterococcus faecalis*, bactéria Gram-positiva facultativa que apresenta destaque como agente de elevada capacidade patogênica e *Staphylococcus aureus* (LOESCHE, 1993; MARSH, 2003; ESTRELA et al., 2003, 2005; SLOTS; TAUBMAN, 1996; MOLANDER et al., 1998; SUNDQVIST et al., 1998; LOVE, 2001; PORTENIER et al., 2003, ESTRELA et al., 2012; RODRIGUES, 2006; MARSHALL et al., 1995, AMERICAN..., 2001). Estes microrganismos também podem ser responsáveis por infecções de lesões cutâneas, abscessos, infecções de feridas, pneumonia, síndrome do choque tóxico, endocardite, osteomielite, etc (AMERICAN..., 2001).

Os enxaguatórios bucais são recomendados no auxílio da redução da microbiota bucal, principalmente quando os métodos mecânicos de remoção da placa não são eficazes, assim eles podem atuar como auxiliares (MASH, 1992; ADDY; MOORAN, 1997; ROJAS et al., 2005).

Em recente estudo, Garrote et al. (2013) avaliaram o efeito antibacteriano de alguns antissépticos bucais sobre bactérias facultativas. As soluções testadas foram o cloreto de cetilpiridínio 0,07%, cloreto de cetilpiridínio 0,075%, gluconato de clorexidina 0,12% e cloreto de benzalcônio 0,13%. Os autores verificaram que as soluções antissépticas estudadas apresentaram efeito antibacteriano por contato direto frente *S. mutans*, *E. faecalis* e *P. aeruginosa*.

Estrela et al. (2003) determinaram a concentração inibitória mínima da clorexidina a 2%, para inibir *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *C. albicans* e uma mistura destes microrganismos, a partir de uma série de diluições na proporção de 1:10. Os resultados mostraram que a clorexidina a 2% mostrou concentração inibitória mínima de 0,000002% para *S. aureus*; 0,002% para *P. aeruginosa*; 0,02% para *E. faecalis*, *B. Subtilis*, *C. albicans* e para a mistura.

O cloreto de cetilpiridínio também é bastante empregado em bochechos devido às suas propriedades antimicrobianas. Moreira *et al.* (2009) demonstraram *in vitro* a sua efetividade sobre o *S. mutans*, *E. faecalis*, *S. aureus* e bactérias da saliva, confirmando o seu principal alvo de ação, sobre bactérias Gram positivas.

Andrade *et al.* (2011) determinaram a concentração inibitória mínima de alguns antissépticos bucais sobre os seguintes microrganismos: *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* e *Pseudomonas aeruginosa*. Os autores verificaram que para o *S. mutans*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli* e *C. albicans*, o cloreto de cetilpiridínio apresentou concentração inibitória mínima de 0,0125%, enquanto para a *P. aeruginosa* a concentração inibitória mínima foi igual a 0,0333.

O Listerine, um produto à base de óleos essenciais, é aceito pela American Dental Association (ADA) para o controle da placa bacteriana e gengivite. Este produto é um composto fenólico, cuja ação antimicrobiana ocorre através de danos à parede celular bacteriana, o que acarreta a inibição dos sistemas enzimáticos e redução dos lipopolissacarídeos (MENDES *et al.*, 1995; PAN *et al.*, 1999; RAMOS *et al.*, 2012). O resultado obtido neste estudo no teste de difusão em agar, respectivamente: *E. faecalis* – 10mm, *S. aureus* – 10mm e *S. mutans* – 11mm podem ter ocorrido em função da difusão desta substância no meio de cultura, um fenômeno que depende das características físico-químicas da substância analisada, como já relatado na literatura (MOREIRA *et al.*, 2009). No teste por exposição direta verificou-se que no período de 30 minutos, este enxaguatório apresentou ação antimicrobiana sobre todos os microrganismos analisados.

O Malvatricin é um composto que apresenta em sua formulação a malva, a tirotricina e o quinosol. Seu efeito antimicrobiano já foi relatado por diferentes autores (MONFRIN *et al.*, 2000; WEYNE *et al.*, 2003; DRUMOND *et al.*, 2004). Moreira *et al.* (2012) observaram o efeito isolado da tirotricina, ela inibiu o crescimento de *Lactobacillus spp*, mas não apresentou efeito antimicrobiano sobre o *S. mutans* e sobre um pool de microrganismos da cavidade bucal; e quanto ao quinosol, os autores verificaram que esta substância apresentou elevada atividade antimicrobiana, semelhante, ao efeito da clorexidina, sobre os microrganismos testados.

O cloreto de benzetônio, um composto de amônio quaternário catiônico

apresenta atividade antimicrobiana. O cátion da molécula estimula a ligação com composto aniônico na superfície da bactéria, permitindo a alteração da integridade da membrana citoplasmática, além da inativação das enzimas sobre esta membrana, que como consequência pode resultar desnaturação de proteínas (TORTORA *et al.*, 2009; BUSSCHER *et al.*, 2008; ESTRELA *et al.*, 2012). Entretanto, há estudos que ressaltam a sua ação tóxica (SOUZA-MACHADO *et al.*, 2008).

O controle dos microrganismos bucais apresenta relevância, quando se considera a possibilidade destes microrganismos invadirem e colonizarem órgãos distantes e provocarem infecções sistêmicas. A análise da atividade antibacteriana dos enxaguatórios bucais disponíveis no mercado se justifica na tentativa da manutenção da harmonia entre o hospedeiro e a complexa microbiota da cavidade bucal.

Os resultados deste estudo mostraram que as soluções analisadas apresentaram efeito antimicrobiano sobre os indicadores biológicos testados. No teste de difusão em ágar, os halos de inibição variaram em função da solução antisséptica ou do indicador biológico. No teste de exposição direta, as soluções de cloreto de cetilpiridínio, gluconato de clorexidina e a associação da clorexidina 0,12% ao cetilpiridínio apresentaram efeito antimicrobiano sobre a maioria dos microrganismos utilizados somente após 10 minutos.



6 CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, e respeitando-se a metodologia empregada, é possível concluir que pelo teste de difusão em agar apresentaram halos de inibição em todos os indicadores biológicos *S. mutans*, *S. aureus* e *E. faecalis*, sendo que houve maior atividade antimicrobiana as soluções antissépticas gluconato de clorexidina 0,12% sobre o *S. mutans*, solução de clorexidina 0,12% + cetilpiridínio (Noplax) sobre o *S. mutans* e a solução à base de óleos essenciais (Malvatricin) sobre o *S. aureus*. Pelo teste de exposição direta, as soluções de cloreto de cetilpiridínio 0,07%, gluconato de clorexidina 0,12% e solução de clorexidina 0,12% + cetilpiridínio (Noplax) apresentaram efeito antimicrobiano sobre os indicadores biológicos testados somente após 10 minutos.



REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ADDY, M; MORAN, J. Clinical indications for the use of chemical adjuncts to plaque control: chlorhexidine formulations. **Periodontol** **2000**, v. 15, p. 52-4, 1997.
- ALVES, D. et al. Cetylpyridinium chloride - a literature review. **Rev Port Estomatol Med Dent Cir Maxill**, v. 53, p. 81-9, 2012.
- AMARAL, C. F. S. **Infecção hospitalar**. Rio de Janeiro: Medsi, 2001. p. 235.
- AMARAL, S. M.; CORTÊS, A. Q.; PIRES, F. R. Pneumonia nosocomial: importância do microambiente oral. **J Bras Pneumol**, v. 35, p. 1116-24, 2009.
- AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS. Comitê de doenças infecciosas. **Red, Book 2000**: relato de comitê de doenças infecciosas. Rio de Janeiro: EPUC, 2001. v. 3, p.514-26.
- ANDRADE, I. P. et al. Minimal inhibitory concentration of mouthwash on oral microorganisms. **Rev Bras de Pesq em Saúde**, v. 13, n. 3, p. 10-6, 2011.
- ASADOORIAN, J. CDHA position paper on commercially available over-the-counter oral rinsing products. **Canadian Journal of dental hygiene (CJDH)**, v. 40, n. 4, p. 1-13, 2006.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ODONTOLOGIA PREVENTIVA (ABOPREV). **Promoção de saúde bucal**. 2. ed. São Paulo: Artes Médicas, 2001. p. 131-40.
- BAEHNI, P. C; TAKEUCHI, Y. Anti plaque agents in the prevention of biofilm. **Associated Oral Diseases**, v. 1, n. 9, p. 23-9, 2003.
- BAMMANN, L. L.; ESTRELA, C. Microbiological aspects in endodontics. In: ESTRELA, C. **Endodontic Science**. São Paulo: Artes Médicas, 2009.
- BASCONES, A. M; MUDARRA, S. M; PEREA, E. P. Antissépticos em el tratamiento de la enfermedad periodontales. **Avances en Periodoncia e Implantologia Oral**, v. 14, p. 1-16, 2002.
- BASRANI, B. et al. Substantive antimicrobial activity in chlorhexidine- treated human root dentin. **Oral Med Oral Pathol Oral Radio Endo**, v. 94, p. 240-5, 2002.
- BASTOS, J. R. M. et al. Chlorhexidine use at dentistry. **Salusvista**, v. 23, n. 1, p. 15-24, 2004.
- BERALDO, C. C; ANDRADE, D. Higiene bucal com clorexidina na prevenção de pneumonia associada a ventilação mecânica. **J Bras Pneumol.**, v. 34, n. 9, p. 707-14, 2008.
- BONESVOLL, P.; GJERMO, P. A comparison between chlorhexidine and some quaternary ammonium compounds with regard to retention, salivary concentration and plaque-inhibiting effect in the human mouth after mouth rinses. **Archs Oral Biol.**, v. 23, p. 289-94, 1978.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopéia Brasileira**. Brasília: ANVISA, 2010.

BRENNAN, M. T. et al. The role of oral microbial colonization in ventilator. **Associated Pneumonia Oral Surg Oral Med Oral Pathol. Oral Radiol Endod.**, v. 98, n. 6, p. 665-72, 2004.

BUERIS, V. et al. Oral incidence of *Staphylococcus aureus* and antimicrobials agents resistance. **Braz J Oral Sci**, v. 4, p. 676-9, 2005.

BUISCHI, Y. P.; AXELSSON, P. Controle mecânico de placa dental realizado pelo paciente. In: BEZERRA, A. C. et al. **ABOPREV: Promoção de saúde buccal**. 2. ed. São Paulo: Artes médicas, 1999. p. 113-28.

BURNETT, G. W.; SCHERP, H. W.; SCHUSTER, G. S. **Microbiologia oral e doenças infecciosas**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1978. p. 399-409.

BUSSCHER, H. J. et al. Surfactive and antibacterial activity of cetylpyridinium chloride formulations *in vitro* and *in vivo*. **J Clin Periodontol**, v. 35, p. 547-54, 2008.

CAMARGO, E. C. **Odontologia hospitalar é mais do que cirurgia bucomaxilofacial**. Maio 2005. Disponível em: <<http://www.jornaldosite.com.br/arquivo/anteriores/elainecamargo/artelainecamargo98.html>>. Acesso em: 22 jan. 2015.

CARRANZA, F. A.; NEWMAN, M. G. **Periodontia clínica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

CASTRO, M. M. M. V.; IARIA, S. T. *Staphylococcus aureus* enterotoxigênio no vestibule nasal de manipuladores de alimentos em cozinhas de hospitais do município de João Pessoa, PB. **Rev. Saúde Pública**, v. 18, p. 235-45, 1984.

CASTRO, S. L. et al. Avaliação *in vitro* da sensibilidade de microorganismos a antisépticos bucais. **J Bras Endo/Perio**, v. 1, p. 65-71, 2000.

CAVALCANTI, S. M. M. et al. Estudo comparativo da prevalência de *Staphylococcus aureus* importado para as unidades de terapia intensiva do hospital Universitário de Pernambuco. Brasil. **Rev Bras Epidemiologia**, v. 9, p. 436-46, dez. 2006.

CIANCIO, S. G. **Improving Our Patients' Oral Health: the role of a triclosan/copolymer/fluoride dentifrice**. Compendium of Continuing Education in Dentistry: Enhancing oral health, 2007.

CIANCIO, S. G. Mouthrinses can be an effective adjunct to mechanical cleaning in the fight against plaque. **Dimensions of Dental Hygiene**, v. 2, n. 11, p. 24-9, 2004.

CUNHA, A. C. A. P.; ZOLLNER, M. S. A. C. Presença de microrganismos de gênero *Staphylococcus* e *Candida* aderidos a máscaras faciais utilizados em atendimentos odontológicos. **Revista Biociências**, v. 8, n. 1, p. 95-101, jun./jul. 2002.

CURY, J. A. Avaliação do efeito do dentifrício contendo triclosan- gantrez- zinco-pirofosfato na gengivite experimental e humanas. **Revista Periodontia**, v. 6, p. 20-4,

1997.

CURY, J. A. et al. Effect of saccharin on antibacterial activity of chlorhexidine gel. **Braz Dent J**, v. 11, n. 1, p. 29-34, 2000.

CUTLER, C. J; DAVIS, N. Improving Oral care in patients receiving mechanical ventilation. **Am J Crit Care**, v. 14, n. 5, p. 389-94, 2005.

DENNESEN, P. et al. Inaofuate salivary flow and poor mucosal status in intubated intensive care unit patients. **Crit Care Med.**, v. 31, n. 3, p. 781, 2003.

DRUMOND, M. R. S. et al. Estudo comparativo *in vitro* da atividade antibacteriana de produtos fitoterápicos sobre bactérias cariogênicas. **Pesq Bras Odontoped Clin Integ.**, v. 4, n. 1, p. 33-8, jan./abr. 2004.

ESTRELA, C. et al. A preliminary study of the antibacterial potential of cetylpyridinium chloride in root canals infected by *E. faecalis*. **Braz Dent J.**, v. 23, p. 645-53, 2012.

ESTRELA, C.; ESTRELA, C. R. A. **Controle de infecção em odontologia**. São Paulo: Artes Médicas, 2003. 188 p.

ESTRELA, C.; PIMENTA, F. C.; ESTRELA, C. R. A. Testes microbiológicos aplicados à pesquisa. In: ESTRELA, C. **Metologia científica**. São Paulo: Artes Médicas, 2005. p. 295-326.

FERNANDES, A.; FERNANDES, M. A. V. F. **Infecção hospitalar e suas interfaces na área de saúde**. São Paulo: Atheneu, 2000. v. 1. 953 p.

FIGUEROA, G. et al. Portacion de Stapylococcus aureus enterotoxigênicos in manipuladores de alimentos. **Rev Med Chil.**, v. 130, p. 859-64, 2002.

FINE, D. H. et al. In vitro antimicrobial effectiveness of na essential oil- containing mouth rinse 12h after a single use and 14 days use. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 32, p. 335-40, 2005.

FOURRIER, F. et al. Colonization of dental plaque: a Source of nosocomial infections in intensive care units patients. **Crit Care Med.**, v. 22, p. 301-8, 1998.

GARROTE, M. S. et al. Antibacterial effect of oral antiseptics on facultative bacteria. Stomatos. **ULBRA**, v. 19, p. 28-39, 2013.

GENCO, R. J. Antibiotics in the treatment of human periodontal diseases. **J Periodontol**, v. 52, n. 9, p. 545-58, Sep. 1991.

GJERMO, P.; BAASTAD, K. L.; RÖLLA, G. The plaque-inhibiting capacity of 11 antibacterial compounds. **J Periodont Res.**, v. 5, p. 102-109, 1970.

GOMES, B. P. F. A. et al. In vitro evolution of the antimicrobial activity of calcium hydroxide combined with chlorhexidine gel used as intracanal medicament. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.**, v. 102, n. 4, Oct. 2006.

GONÇALVES, L. S. et al. Association of chronic periodontitis HIV- infected Brazilians under. HAART. **Oral Surg Oral Med Oral pathol Oral Radiol Endod.**, v. 97, p. 196-203, 2004.

GRANER, R. O. M. et al. **Aspectos microbiológicos da placa**. Piracicaba: UNICAMP, 2005. p. 4.

GRANJERO, J. M. et al. O cloreto de cetilpiridínio e a placa bacteriana: uma revisão. **R Assoc Paul Cir Dent.**, v. 46, n. 5, p. 857-860, 1993.

GUIMARÃES JÚNIOR, J. **Biossegurança e controle de infecção cruzada em consultórios odontológicos**. São Paulo: Santos, 201. p. 68-72.

HAMADA, S.; SLADE, H. D. Biology Immunology and cariogenicity of Streptococcus mutans. **Microbiological reviews**, v. 44, n. 2, p. 331-84, Jun. 1980.

HAPS, S. et al. The effect of cetylpyridinium chloride-containing mouth rinses as adjuncts to toothbrushing on plaque and parameters of gingival inflammation: a systematic review. **Int J Dent Hyg.**, v. 6, n. 4, p. 290-30, 2008.

INABA, H.; AMARO, A. Roles of oral bacteria in cardiovascular diseases- From Molecular Mechanisms to clinical cases: Implication of Periodontal Diseases in Development of Systemic Diseases. **Journal of pharmacological Sciences**, v. 113, n. 2, p. 103-9, 2010.

JARDIM, P. S.; JARDIM, E. G. J. Influência da remoção mecânica da placa bacteriana associada ao uso diário de solução fluoretada. **RGO**, v. 46, n. 2, p. 79-84, 1998.

KAKLAMANOS, E. G. et al. Transient oral microflora in greeks attending day centers for the elderly and residents in homes for the elderly. **Gerontology**, v. 22, p. 158-67, 2005.

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

KOMOROWSKI, R. et al. Antimicrobial substantivity of chlorhexidine treated bovine root dentin. **J Endod**, v. 26, n. 6, Jun. 2000.

KOO, H.; XIAO, J.; KLEIN, M. I. Extracellular polysaccharides matrix- na often forgotten virulence factor in oral biofilm research. **Int J Oral Sci**, v. 1, n. 4, p. 229-34, Dez. 2009.

LAWRENCE, C. A. Antimicrobial activity in vitro of chlorhexidine. **J Amer Pharmaceut Ass.**, v. 49, n. 11, p. 731-34, 1960.

LIMA JÚNIOR. J. F. et al. O uso de fitoterápicos e a saúde bucal – Phytotherapeutic Agent's Use and Oral Health. **Saúde em Revista**, v. 7, n. 16, p. 11-17, 2005.

LOESCHE, W. J. **Cárie dental: uma infecção tratável**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 1993. 349 p.

- LOESCHE, W. J. Ecologia da flora oral. In: NISENGARD, R. J.; NEWMAN, M. G. **Microbiologia oral e imunologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. p. 264-74.
- LOESCHE, W. J. Role of Streptococcus Mutans in human dental decay. **Microbiol Mol Biol Rev.**, v. 50, p. 353-380, 1986.
- LOTUFO, R. F. M. et al. Controle químico do biofilme dentário supragengival: Revisão de literatura. **Revista Periodontia**, v. 19, n. 1, p. 34-42, 2009.
- LOVE, R. M. Enterococcus faecalis: mechanism for its role in endodontic failure. **Int Endod J.**, v. 34, p. 399-406, 2001.
- LYENA-PUY, C. The role of saliva in maintaining oral health and as an aid to diagnosis. **Med Oral Pathol Oral Cir Bucal**, v. 11, p. 449-55, 2006.
- MAGER, D. L. et al. Distribution of selected bacterial species on intraoral surfaces. **J Clin Periodontol.**, v. 30, p. 644-54, 2003.
- MARANGONI, D. V. **Staphylococcus aureus**. Infecções hospitalares: prevenção e controle. São Paulo: Sarvier, 1997. p. 573-89.
- MARINHO, B. V. S.; ARAÚJO, A. C. S. O uso de enxaguatório bucais sobre a gengivite e o biofilme dental. **International Journal of Dentistry**, v. 6, n. 4, p. 124-31, 2007.
- MARSH, P. D. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? **Microbiology-Sgm.**, n. 149, p. 279-94, 2003.
- MARSH, P. D. Oral ecology and its impact on oral microbial diversity. In: KURAMITSU, H. K.; ELLEN, R. P. **Oral bacterial ecology**. Wymondham Horizon Scientific Press, 2000. p. 11-65.
- MARSH, P. D. Plaque as a biofilm: pharmacological principles of drug delivery and action in the sub- and supragingival environment. **Oral Diseases**, v. 9, p. 16-22, 2003.
- MARSH, P. D; MARTIN, M. **Oral microbiology**. 3. ed. London: Chapman le Hall, 1992. P. 129-40.
- MARSHALL, J. R. **Manual de laboratório clínico: microbiologia**. São Paulo: Santos, 1995.
- MENDES, M. M. S. G. et al. Agentes químicos para o controle da placa bacteriana. **Periodontia**, v. 5, n. 2, p. 253-6, 1995.
- MOLANDER, A. et al. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. **Int Endod J**, v. 31, p. 1-7, 1998.
- MOLINA, F. P. **Associação de Enterococcus faecalis, Cândida albicans e Escherichia coli em canais radiculares e avaliação dos efeitos de extratos e endotoxinas**. 2008. (Dissertação) - Faculdade de Odontologia de São José dos

Campos, UNESP, São José dos Campos, 2008.

MONFRIN, R. C. P; RIBEIRO, M. C. Avaliação *in vitro* de antissépticos bucais sobre a microbiota da saliva. **R Assoc Paul Cir Dent.**, v. 54, n. 1, p. 401-7, Set./Out. 2000.

MOORE, W. E. C. et al. Bacteriology of experimental gingivitis in children. **Infect Immun.**, v. 46, p. 1-6, 1984.

MORAN, J. et al. Comparative effects of quaternary ammonium mouthrinses on 4-day plaque regrowth). **J Clin Periodontol.**, v. 27, n. 1, p. 37-40, 2001.

MOREIRA, A. C. A. et al. Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de antissépticos bucais. **R Cli Med Biol.**, v. 8, n. 2, p. 153-61, maio/ago. 2009.

MOTTA, R. E. L. **Prevalência resistência e patogenicidade de *Staplylococcus aureus* colhidos nos ambientes odontológico**. 2005. Tese (Doutorado) - Faculdade Odontologia Piracicaba, Piracicaba, 2005.

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.

NAIR, P.N.R. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. **Critic. Rev. Oral Biol. Med.**, v.15, n.6, p.348-81, 2004.

NAKATANI, J.; ROCHA, R. T. **Pneumonia adqueida na comunidade e no hospital**. São Paulo: Artes Médicas, 2003. p. 1453-1461.

NASCIMENTO, D. F. F.; SILVA. A. M.; MARCHINI, L. O papel das bactérias orais em doenças sistêmicas. **Revista ABO Nacional**, v. 14, n. 2, p. 117-122, 2006.

NEVILLE, B. W. et al. **Oral Maxilofacial Pathology**. 2. ed. Philadelphia, USA: WB Saunders Company, 2002. p. 616–8.

NEWBRUM, E. **Cariologia**. 2. ed. São Paulo: Santos, 1988. 326 p.

ORSTAVIK, K. D.; HAAPASALO, M. Desinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. **Endod Dent Traumatol.**, n. 6, p. 142-50, 1990.

OSSO, D.; KANANI, N. Antiseptic mouth rinses: an update on comparative effectiveness, risks and recommendations. **J Dent Hyg.**, v. 87, n. 1, p. 10-8, 2013.

OUHAYOUN, J. P. Penetrating the plaque biofilm: impact of essential oil mouthwash. **J Clin Periodontol.**, v. 30, Suppl. 5, p. 10-12, 2003. Supplement.

PAN, P. H., FINNEGAN, M. B., STURDIVANT, L. et al. Comparative antimicrobial activity of an esencial oil and an amine fluoride/stannous fluoride mouthrinse in vitro. **J Clin Periodontol.**, v. 26, p. 474-6, 1999.

PANUTTI, C. M. Effect of a 0,5 chlorxedine gel on dental plaque superinfecting in mentally handicapped patients. **Pesqui Odontol Bras.**, v. 17, n. 3, p. 228-33, Jul./Sep. 2003.

- PASTER, B. J. et al. Bacterial diversity in human subgingival plaque. **J Bacterol.**, v. 183, p. 3770-83, 2001.
- PELCZAR-JR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiology**: concepts and applications. New York: McGraw-Hill, 1993. p. 210-28.
- PEREIRA, A. C. **Odontologia em saúde coletiva**: planejando ações e promovendo saúde. Porto Alegre: ARTMED, 2003. p. 440.
- PEREIRA, M. L. et al. Staphylococci from dental personnel. **J Braz Dent.**, v. 10, p. 39-45, 1999.
- PERSON, G. R. Site-based versus subject-based periodontal diagnosis. **Periodontology 2000**, v. 39, p. 145-63, 2005.
- PIMENTEL, P. **Odontologia hospitalar**: o novo paradigma do Hospital central do exército. 2011. Disponível em: <<http://medicinaoral.org/blog/2011/10/19>>. Acesso em: 22 nov. 2014.
- PINTO, V. G. **Saúde buccal coletiva**. 4. ed. São Paulo: Santos, 2005. p. 541.
- PORTENIER, I.; WALTIMO, T.; HAAPASALO, M. *Enterococcus faecalis* – The root canal survivor and “star” in post-treatment disease. **Endod Top.**, v. 6, p. 135-59, 2003.
- QUELUZ, D. P.; PALUMBRO, A. Integração do odontológico no service de saúde em uma equipe multidisciplinar. **Jornal de assessoria e prestação de serviços ao odontólogo**, v. 3, n. 19, p. 40-6, jun. 2000.
- QUIRYNEN, M. et al. The effect of periodontal therapy on the number of cariogenic bacteria in different intra-oral niches. **J Clin Periodontol.**, v. 26, p. 322-7, 1999.
- RAGHAVENDRAN, K.; MYLOTTE, J. M.; SCANNAPIECO, F. A. Nursing home-associated pneumonia, hospital-acquired pneumonia and ventilator-associated pneumonia: the contribution of dental biofilms and periodontal inflammation. **Periodontol 2000**, v. 44, p. 164-77, 2007.
- RAMOS, I. A. et al. Efeito inibitório de enxaguatórios bucais sobre o crescimento de *Lactobacilos casei*. **Rev Bras Odontol.**, v. 69, n. 1, p. 107-10, jan./jun. 2012.
- RECHE, N. S. G. **Controle da placa dental em deficientes mentais com o uso da clorexidina**. 2005. Dissertação (Mestrado em Clínica Odontológica – Odontopediatria) - Universidades de Marília-UNIMAR, Marília, 2005.
- RODRIGUES, A. H. **Aportaciones al estudio de la actividad antimicrobiana de los antisépticos y desinfectantes tesi doctoral in ciencias de la salut**. Departament de Genética I Microbiologia. Barcelona: Universitat Autònoma de Barcelona, 2006. 235 p.
- ROJAS, F. J. E; SANTOS-ALEMANY, A. Colutoris para el control de placa y gingivitis basados en la evidencia científica. **RCOE**, v. 10, n. 4, p. 445-52, 2005.

ROLLA, G.; LOE, H.; SCHIOTT, C. R. The affinity of chlorhexidine for hydroxyapatite and salivary mucins. **J Periodontol Rev.**, v. 5, n. 2, p. 90-5, 1970.

ROLLA, G.; MELSEN, B. On the mechanism of the plaque inhibition by chlorexidine. **J Dent Res.**, n. 54, p. 57-62, 1975.

ROSSI, D.; DEVIENNE, K. F.; RADDI, M. S. G. Influência da fluidos biológicos na sobrevivência de stapylococcus aureus sobre diferentes superficies seca. **Rev Ciências Farmaceuticas Básicas e Aplicada**, v. 29, n. 2, p. 211-14, 2008.

RUSSEL, S. L. et al. Respiratory pathogen colonization of the dental plaque of institutionalized elders spec care. **Dentist.**, v. 19, p. 128-34, 1999.

SAFDAR, N.; CRNICH, C. J.; MAKI, D. G. The pathogenesis of ventilator – associated pneumonia: its relevance to developing effective strategies for prevention. **Respire Car.**, v. 50, n. 6, p. 725-39, Jun. 2005.

SANTOS, A. L. et al. Stapylococcus aureus: visitando um cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 4, n. 6, p. 413-23, dez. 2007.

SCANNAPIECO, F. A. **Relação entre doença periodontal e doenças respiratórias**. São Paulo: Santos, 2002. p. 83-97.

SCANNAPIECO, F. A.; BUSH, B. R.; PAJU, S. Associtons between periodontal disease and stroke: A systematic review. **Ann. Periodontol**, v. 8, n. 1, p. 38-69, Dec. 2003.

SCANNAPIECO, F. A.; ROSSA JÚNIOR, C. Doenças periodontais versus doenças respiratórias. In: _____. **Periodontia médica**. São Paulo: Senac, 2004. p. 391-409.

SCHILLING, K. M.; BROWER, W. H. Glucans synthesized in situ experimental salivary pellicle function as specific bindings sites for streptococcus mutans. **Infect Immun.**, v. 60, n. 1, p. 284-95, Jan. 1992.

SCHONFELD, S. E. Oral microbial ecology. In: SLOTS, J.; TAUBMAN, M. A. **Contemporary oral microbiology and immunology**. St. Louis: Mosby – Year Book, 1992. p. 267-74.

SCHROEDER, H. E.; MARTHALER, T. M.; MUHLEMANN, H. R. Effects of some potencial inhibitors on early calculus formation. **Helv Odont Acta**, v. 6, p. 6-9, 1962.

SEDGLEY, C. M. et al. Quantative real- time PCR detection of oral Enterococcus faecalis in humans. **Arch oral Biol.**, v. 50, p. 575-83, 2005.

SHEARER, B. G. Biofilm and the dental office. **J Am Dent Ass**, v. 127, p. 181-89, 1996.

SIMÕES, R. C. S. et al. Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de enxaguatórios bucais. **Rev Bras Odontol.**, v. 68, n. 1, p. 91-4, jan./jun. 2011.

SLOTS, J.; RAMS, T. E. Antibiotics in periodontal therapy: advantages and

disadvantags. **J Clin Periodontol.**, v. 17, n. 7, p. 479-93, Aug. 1990.

SLOTS, J.; RAMS, T. E. Mechanisms of oral colonization. In: SLOTS, J.; TAUBMAN, M. A. **Contemporary Oral Microbiology and Immunology**. St. Louis: Mosby, 1992. p. 283-98.

SLOTS, J.; TAUBMAN, M. A. **Contemporary oral microbiology and immunology**. 1. ed. St Louis: Mosby, 1996. 649 p.

SMITH, A. J. et al. Stapylococcus aureus in the oral cavity: a three-year retrospective analysis of clinical laboratory data. **J Br Dent.**, v. 195, p. 701-3, 2003.

SMITH, A. J.; JACKSON, M. A.; BAGGI, J. The ecology of stapylococcus species in the oral cavity. **J Med Microbiol.**, v. 50, p. 940-6, 2001.

SOARES, J. A. et al. Residual antibacterial activity of chlorhexidine digluconate and camphorated P- monochlorophenol in calcium hydroxide- based root canal dressing. **Braz Dent J.**, v. 18, n. 1, 2007.

SOCRANSKY, S. S. et al. Microbial complexes in subgingival plaque. **J Clin Periodontol.**, v. 25, n. 2, p. 134-44, 1998.

SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. **Periodontology 2000**, v. 28, p. 12-55, 2002.

SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D. Microbiologia da doença periodontal. In: LINDHE, J.; KARRING, T.; LANG, N. P. **Tratado de periodontia clínica e implantodontia oral**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,. 2005a. p. 105- 47.

SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D. Periodontal microbial ecology. **Periodontology 2000**, v. 38, p. 135-87, 2005b.

SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. **J Periodontol.**, v. 63, p. 322-31, 1992.

SOUZA, E. L. C. **Comparação do digluconato de clorexidina 0,12% sem xylitol com álcool e com xylitol sem álcool para controle do biofilme oral e efeitos adversos associados**. 2007. Dissertação (Mestrado de Reabilitação Oral) - Universidade Veiga de Almeida, Rio de Janeiro, 2007. p. 78-84.

SOUZA-MACHADO, A. et al. Toxic effects attributed to benzalkonium chloride on nasal mucosa and mucociliar activity. **Rev Bras Alerg Immunopatol.**, v. 31, n. 1, p. 2, 2008.

SPENCE, A. P. **Anatomia humana básica**. 2. ed. Tambaré: Manole, p. 59-62, 1991.

SPRATT, D. A.; PRATTEN, J. Biofilms and the oral cavity. **Environm Scien and Biol Technol.**, v. 2, p. 109-20, 2003.

STUART, C. H. et al. Enterococcus faecalis: Its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment failure and retreatment. **J Endod.**, v. 32, n. 2, p. 93-8, 2006.

SUMI, Y. et al. Colonization of denture plaque by respiratory pathogens in dependent elderly. **Gerontology**, v. 19, p. 25-9, 2002.

SUNDQVIST, G. et al. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative retreatment. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.**, v. 85, p. 86-93, 1998.

TANNER, A. C. R. et al. Subgingival and tongue microbiota during early periodontitis. **J Dent Res.**, v. 4, p. 318-23, 2006.

TIMMERMAN, M. F.; VAN DER WEIJDEN, G. A. Risk factors of periodontitis. **Int J Dent Hygiene**, v. 4, p. 2-7, 2006.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiology**: An introduction. 10th. ed. San Francisco: Benjamin Cummings, 2009. 960 p.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. O mundo microbiano e você. In: _____. **Microbiologia**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. p. 1-25.

TRABULSI, L. R. et al. **Microbiologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneus, 2002. p. 199-201.

TRABULSI, L. R. et al. **Microbiologia**. 5. ed. São Paulo. Atheneus, 2008. p. 276.

TRAHAN, L. Xylitol: a review of its action on mutan sheptococci and dental plaque-its clinical significante. **Int Dent.**, v. 45, p. 77-92, 1995.

ULIANA, R. M. B; BRIQUES, W. Halitose: Conceitos básicos sobre diagnóstico microbiologia. Causa tratamento. **Anais...** Conclave Odontológico Internacional de Campinas, 15, 2003. Campinas, n. 104, mar./abr. 2003.

UMEDA, M. et al. The utility of whole saliva to detect the oral presence of periodontopathic bacteria. **J Periodontal.**, v. 69, p. 828-33, 1998.

VILLORIA, G. E. M.; COSTINHA, L. H. C. Antissépticos bucais no controle da bacteremia de origem oral. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**, v. 12, p. 76-88, 2013.

WEYNE, S. Avaliação clínica de dois enxaguatórios bucais: malvatricin e flogoral. **Odontis**, v. 3, n. 8, p. 3-4, abr./jun. 2003.

XIAO, J.; KOO, H. Structural organizations and dynamics of exopolysacchride matrix and microcolonies formation by *Streptococcus mutans* in biofilms. **J Appl Microbiol.**, v. 108, n. 6, p. 2103-13, Jun. 2010.

ZAMANY, A.; SAFAKI, K.; SPANGBERG, L. S. W. The effect of chlorhexidine as na endodontic disinfectant. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.**, v. 96, n. 5, p. 578-81, 2003.