



CENTRO UNIVERSITÁRIO CHRISTUS
MESTRADO ACADÊMICO EM CIÊNCIAS ODONTOLÓGICAS

ALEX OLIVEIRA DE MOURA

ENXAGUATÓRIOS ORAIS NO CONTROLE DO BIOFILME DE *Staphylococcus aureus*
SOBRE SUPERFÍCIE DE DISCOS DE TITÂNIO – ESTUDO *in vitro*.

FORTALEZA

2024

ALEX OLIVEIRA DE MOURA

ENXAGUATÓRIOS ORAIS NO CONTROLE DO BIOFILME DE *Staphylococcus aureus*
SOBRE SUPERFÍCIE DE DISCOS DE TITÂNIO – ESTUDO *in vitro*

Dissertação submetida ao Programa de Mestrado em Ciências Odontológicas do Centro Universitário Christus, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Área de Concentração: Ciências
Odontológicas
Linha de Pesquisa: Clínica Odontológica

Orientador: Prof. Dr. Tácio Pinheiro Bezerra

Co-orientadora: Prof. Dra. Ramille Araújo

Lima

**FORTALEZA
2024**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Centro Universitário Christus - Unichristus
Gerada automaticamente pelo Sistema de Elaboração de Ficha Catalográfica do
Centro Universitário Christus - Unichristus, com dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M929e Moura, Alex Oliveira de.
Enxagatúrios orais no controle do biofilme de *Staphylococcus aureus* sobre superfícies de disco de titânio – estudo in vitro. / Alex Oliveira de Moura. - 2024.
35 f. : il. color.

Dissertação (Mestrado) - Centro Universitário Christus - Unichristus, Mestrado em Ciências Odontológicas, Fortaleza, 2024.
Orientação: Prof. Dr. Tácio Pinheiro Bezerra.
Coorientação: Profa. Dra. Ramille Araújo Lima.
Área de concentração: Ciências Odontológicas.

1. *S. aureus*. 2. Peri-implantite. 3. Oxigênio. 4. Clorexidina. 5. Pneumonia associada à ventilação mecânica. I. Título.

CDD 617.6

ALEX OLIVEIRA DE MOURA

ENXAGUATÓRIOS ORAIS NO CONTROLE DO BIOFILME DE *Staphylococcus aureus*
SOBRE SUPERFÍCIE DE DISCOS DE TITÂNIO – ESTUDO *in vitro*

Dissertação de Mestrado para obtenção do grau
de Mestre em Ciências Odontológicas. Linha de
Pesquisa: Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Tácio Pinheiro Bezerra

Co-orientadora: Prof. Dra. Ramille Araújo

Lima

Aprovado em: 12/04/2024

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Tácio Pinheiro Bezerra
Centro Universitário Christus (Unichristus)

Profa. Dr. Fabrício Bitu Sousa
Centro Universitário Christus (Unichristus)

Profa. Dr. Marcelo Ferraro Bezerra
Universidade Federal do Ceará (UFC)
Avaliador Externo

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, a Jeová Deus, o dador da vida, por sempre ser fonte de força e consolo em todos os momentos de minha vida.

À minha amada e querida esposa Andrea Agaciana Bessa de Moura. Mulher forte, mãe dedicada e amorosa, que me abraça quando necessário, me ampara quando preciso, que ama, que cuida, que escuta e que demonstra a cada dia a escolha certa que fiz em minha vida. A amo profundamente.

Aos meus queridos André Bessa de Moura e Alan Bessa de Moura. Filhos queridos que suportaram minhas atividades na pós-graduação, que me deram e dão alegrias emocionantes e que me motivam a melhorar minha figura paterna dia a dia. Amo a eles incondicionalmente.

Aos meus pais José Augusto Barros de Moura e Irany Oliveira de Moura, que me forneceram o amor, o alimento, o abrigo, meus estudos e principalmente a base de minha personalidade. A eles que me ensinaram a ser direito, honesto e a tratar os outros com respeito. Ao meu irmão André Oliveira de Moura pelo companheirismo desde o nascimento. Amo vocês.

Aos familiares indiretos: Darlene Moura, Carlos Roberto, Alcina, Levi e tantos outros que acompanharam minha jornada.

Aos professores do programa de Mestrado Acadêmico da Unichristus (Danna, Paulinho, Abraão, Giovanni, Juliana Paiva, Rafael, Juliana Ximenes, Anya, Phillipe, George e Isabela) que compartilharam seu valioso conhecimento. Aos professores convidados (Carlos Eduardo, Vítor, Edson, Kátia, Janaína) também o meu obrigado.

Ao Prof. Dr. José Rocha, reitor da Unichristus, pelo incentivo a ingressar neste curso.

Ao Prof. Dr. Fabrício Bitu, professor e coordenador deste curso, que me apoiou em momentos necessários e me ajudou a continuar.

À Profª Dra. Danna Moreira pelo incentivo e atenção prestada em nossas solicitações.

Ao Professor Gilmar Poli por ter me iniciado na implantodontia, por ter confiado no meu trabalho como professor e por ter me ajudado a dar os primeiros passos no ensino da pós-graduação.

Ao Professor José Galba de Meneses Gomes, meu “cumpade”, meu tutor dentro da odontologia, meu mestre, exemplo de ética e caráter acadêmico. À Dra Urânia Gomes pela atenção desde a infância.

Ao colega e Professor Fábio Gomes que caminhou comigo no início da carreira clínica, que dividiu dificuldades e consultório por anos.

Às alunas de Iniciação Científica Alanna, Larissa e Thaís, pela valorosa contribuição durante a pesquisa.

Aos meus colegas professores do Colégio Christus, membros das coordenações e supervisão que acompanharam essa jornada.

Aos Coordenadores de Pós-Graduação que acreditam no meu trabalho, Marcelo Ferraro, Sormani Queiroz, Renata Brito, Leandro Sales, Alan Queiroz, Manoel Mello e Carlos Tavares.

Aos meus professores da disciplina de didática do ensino superior, Prof^a Áurea, Prof^a Mirley, Prof^a Josy e Prof. Lindolfo que me permitiram dividir com eles a sala de aula no mestrado acadêmico da Unichristus.

Aos funcionários da Secretaria do Mestrado Acadêmico de Odontologia e do laboratório de Microbiologia da Unichristus pela valorosa disposição e trabalho.

À Janaína Paulino, minha atendente, que divide o dia a dia do consultório e trabalha com destreza e amor.

Aos amigos de mestrado, Samara Kelly e Lucas Maia pelos momentos de seriedade, descontração e pela amizade. Grato pelo apoio e incentivo.

Ao meu colega de faculdade, Luiz Salviano, aos meus colegas de especialização, Eliseu Amaral, Malu Cavalcante e ao grande Dr Luciano Nunes pela amizade de longas datas.

Ao setor científico da Blue M Brasil na pessoa da Prof^a Dr^a Tatiana Deliberador por ter contribuído com os produtos e materiais para a realização da pesquisa laboratorial desta dissertação.

À Neodent por ter fornecido as amostras na forma de discos de titânio para o desenvolvimento da pesquisa desta dissertação.

À Prof^a Dr^a Lidiany Azevedo que contribuiu com as correções deste trabalho na qualificação e à Prof^a Dr^a Mônica Studart Moreira que aceitou meu convite, embora tenha ficado doente no dia anterior e não pode comparecer. Ao Prof. Dr. Marcelo Ferraro e ao Prof Fabrício Bitu por terem aceitado participar da banca com 1 dia de antecedência.

À Prof^a Dr^a Ramille Araújo Lima, co-orientadora deste trabalho, pela paciência, pela dedicação nos experimentos, pelo esforço e tempo dedicados a ajudar em toda a fase laboratorial. Por ensinar e demonstrar habilidade técnica e intelectual nas orientações da pesquisa que culminaram nesta dissertação.

Ao colega e orientador Prof. Dr. Tácio Pinheiro Bezerra. Obrigado pelo tempo disponibilizado, pela atenção, pelas revisões, e por ter colaborado com suas ponderações e observações na execução deste trabalho.

Muito obrigado.

RESUMO

O *Staphylococcus aureus* é um dos micro-organismos oportunistas presente na peri-implantite, assim como o patógeno gram positivo mais prevalente na pneumonia associada à ventilação mecânica. Este estudo teve por objetivo analisar o efeito antimicrobiano de enxaguatórios orais no biofilme de *S. aureus* em superfícies de discos de titânio. Para isso, *Staphylococcus aureus*, cepa ATCC 25923, foi utilizada como inóculo para formação de biofilme em discos de titânio com e sem tratamento de superfície. Os discos foram divididos em 4 grupos com 9 unidades em cada e o experimento foi realizado em triplicata. Após ativação e ajuste do inóculo, os discos foram imersos na solução cérebro-coração para formação do biofilme. Os grupos foram separados respectivamente em solução salina 0,89% NaCl, solução de oxigênio 0,003%, solução de oxigênio 0,006% e digluconato de clorexidina 0,12%. Os discos foram tratados com as respectivas soluções por 2 dias e 2 vezes ao dia com o tempo de 1 minuto para cada aplicação. Após a última aplicação, os discos foram coletados, foi realizada a diluição seriada para plaqueamento e contagem de unidades formadoras de colônias. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e comparados entre grupos por meio dos testes ANOVA seguido do pós-teste de Turkey. Para as análises adotou-se um nível de confiança de 95%. Os resultados em Log UFC/mL nos discos sem tratamento de superfície (salina - $7,78 \pm 0,38$, solução oxigênio 0,003% - $7,44 \pm 0,28$, solução de oxigênio 0,006% - $7,68 \pm 0,47$ e clorexidina 0,12% - $6,76 \pm 2,61$) e os resultados nos discos com tratamento de superfície (salina - $7,43 \pm 0,52$, solução oxigênio 0,003% - $7,25 \pm 0,33$, solução de oxigênio 0,006% - $7,52 \pm 0,18$ e clorexidina 0,12% - $7,50 \pm 0,30$) revelaram que não há diferença estatística significativa ($p > 0,05$) na contagem de UFCs recuperadas dos biofilmes de *S. aureus* quando submetidos às diferentes soluções testadas. Em conclusão, as soluções testadas não demonstraram eficácia antimicrobiana frente aos biofilmes maduros de *S. aureus* formados em discos de titânio com e sem tratamento de superfície. Quando comparada a ação dos produtos que liberam oxigênio e da clorexidina com o controle negativo (solução salina) também não houve diferença.

Palavras-chave: clorexidina; oxigênio; *S. aureus*; peri-implantite; pneumonia associada à ventilação mecânica.

ABSTRACT

The *Staphylococcus aureus* is one of the opportunistic microorganisms in peri-implantitis as well as the most prevalent gram positive pathogen in ventilator-associated pneumonia. This study has the aim to analyze the antimicrobial effect of mouthwashes on *S. aureus* biofilm on titanium discs surfaces. *Staphylococcus aureus*, strain ATCC 25923, was used as an inoculum for biofilm formation on titanium discs with and without surface treatment. The disks were divided into 4 groups with 9 units each and the experiment was carried out in triplicate. After activation and adjustment of the inoculum, the discs were immersed in the brain-heart solution to form the biofilm. The groups were respectively separated into saline solution 0.89% NaCl, 0.003% oxygen solution, 0.006% oxygen solution and 0.12% chlorhexidine digluconate. The discs were treated with the respective solutions for two days and twice a day with a time of 1 minute for each application. After the last application, the discs were collected and serial dilution was performed for plating and counting of colony-forming units. Data were subjected to the Shapiro-Wilk normality test and compared between groups using ANOVA tests followed by Turkey 's post-test . For the analyses, a confidence level of 95% was adopted. The results in Log CFU/mL on discs without surface treatment (saline - $7,78 \pm 0,38$, oxygen solution 0,003% - $7,44 \pm 0,28$, oxygen solution 0,006% - $7,68 \pm 0,47$ and chlorhexidine 0,12% - $6,76 \pm 2,61$) and the results on discs with surface treatment (saline - $7,43 \pm 0,52$, oxygen solution 0,003% - $7,25 \pm 0,33$, oxygen solution 0,006% - $7,52 \pm 0,18$ and chlorhexidine 0,12% - $7,50 \pm 0,30$) revealed that there is no statistically significant difference ($p > 0.05$) in the count of CFUs recovered from *S. aureus* biofilms when subjected to the different solutions tested. In conclusion the tested solutions did not demonstrate antimicrobial efficacy against mature biofilms of *S. aureus* formed on titanium discs with and without surface treatment. When comparing the action of products that release oxygen and chlorhexidine with the negative control (saline solution) there was also no difference.

Key words: chlorhexidine; oxygen; *S. aureus*; peri-implantitis; ventilator-associated pneumonia.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Discos de titânio estéreis sem tratamento de superfície, em suas embalagens.....	17
Figura 2 - Modelo esquemático de protocolo de ativação da cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 e aquisição da placa de estoque.....	18
Figura 3 - Disco de titânio de superfície não tratada sendo imerso no poço com a suspensão de micro-organismos para formação de biofilme.....	19
Figura 4 - Poços com as formulações controle e experimentais.....	19
Figura 5 - Disco de titânio de superfície tratada recebendo a lavagem com solução salina 0,89% previamente ao mergulho dentro das soluções a serem testadas.....	20
Figura 6 – Disco de titânio recebendo o tratamento com a solução BE (enxaguante oral que libera oxigênio 0,003%) por 1 minuto (2 vezes ao dia)	20
Figura 7 - Disco de titânio recebendo a lavagem pós-tratamento (2 mergulhos em solução salina 0,89%)	21
Figura 8 - Disco de titânio sendo transferido para o poço com BHI caldo após o segundo tratamento do dia.....	21
Figura 9 - Plaqueamento pelo método da gota em BHI ágar.....	22
Figura 10 - Placas com as UFCs 24 horas após o plaqueamento.....	22
Figura 11 - Diferença visual na turbidez do caldo BHI após a remoção dos discos para o último tratamento.....	24

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 Média e Desvio-padrão da contagem de UFCs em biofilme maduro de *Staphylococcus aureus* nos diversos grupos experimentais – discos de titânio sem tratamento de superfície.....23
- Gráfico 2 Média e Desvio-padrão da contagem de UFCs em biofilme maduro de *Staphylococcus aureus* nos diversos grupos experimentais – discos de titânio com tratamento de superfície.....25

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

BE	Solução de oxigênio ativo 0,003%
BI	Solução de oxigênio ativo 0,006%
BHI	Ágar infusão cérebro-coração
CHX	Clorexidina
ERO	Espécie reativa de oxigênio
mL	Mililitros
PAV	Pneumonia Associada à Ventilação Mecânica
PDT	Terapia Fotodinâmica
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
UTIP	Unidade de Terapia Intensiva Pediátrica

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	10
2.	JUSTIFICATIVA.....	14
3.	OBJETIVOS.....	15
4.	METODOLOGIA.....	16
4.1	Tipo de Estudo.....	16
4.2	Local do Estudo.....	16
4.3	Amostra.....	16
4.4	Delineamento experimental.....	17
4.5	Preparo e ajuste do inóculo.....	18
4.6	Formação do biofilme.....	19
4.7	Aplicação das formulações controles e experimentais.....	19
4.8	Coleta do biofilme.....	21
4.9	Aplicação de testes estatísticos.....	22
5.	RESULTADOS.....	23
6.	DISCUSSÃO.....	26
7.	CONCLUSÃO.....	32
8.	REFERÊNCIAS.....	33

1. INTRODUÇÃO

A literatura científica odontológica confirma que as infecções polimicrobianas relacionadas ao acúmulo de biofilme são a principal razão para desencadear a resposta inflamatória local do hospedeiro nas adjacências de implantes dentais osseointegráveis (ARCIOLA; CAMPOCCIA; MONTANARO, 2018; FU; WANG, 2020; SAHRMANN *et al.*, 2020).

A mucosite peri-implantar é uma condição patológica nos tecidos moles ao redor dos implantes e seus componentes onde visualizamos sangramento e/ou supuração. Em casos avançados, pode ocorrer perda óssea progressiva, caracterizando a peri-implantite. O tratamento dessas condições é desafiador devido à ampla composição microbiana, estrutura do biofilme e limitação de acesso à macro e microgeometria das superfícies dos implantes dentais, o que dificulta uma abordagem direcionada para a erradicação do biofilme (ARCIOLA; CAMPOCCIA; MONTANARO, 2018; BELIBASAKIS; MANOIL, 2021).

No desenvolvimento da doença peri-implantar, é comum serem identificadas várias espécies de procariotos como *Porphyromonas gingivalis*, *Tennerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia* e *Fusobacterium spp.* Porém, a microbiota pode sofrer amadurecimento, modificação e evolução. Assim, outros procariotos podem ser identificados no biofilme, tais como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloace*, *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Peptostreptococcus micra* e *Pseudomonas spp* (MOMBELLI; DÉCAILLET, 2011; PERSSON; RENVERT, 2014; SAHRMANN, *et al.*, 2020).

Sabe-se que pneumonia associada à ventilação mecânica, sigla PAV, é definida como uma infecção nosocomial no parênquima pulmonar em pacientes expostos à ventilação mecânica invasiva por pelo menos 48 horas, e que não estava presente no momento da intubação. Essa pneumonia é especialmente comum em pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs). A PAV é uma preocupação crescente no sistema de saúde devido ao seu impacto no prognóstico da condição inicial e ao custo significativo do seu manejo. O fator de risco mais importante para PAV são as condições médicas subjacentes dos pacientes incluindo suas comorbidades e a gravidade da doença (KALIL *et al.*, 2016; OSMAN *et al.*, 2020; PAPAZIAN; KLOMPAS; LUYT, 2020;).

Em recente estudo, autores compararam a prevalência de PAV antes (ano de 2013) e após implementarem um protocolo de higiene oral (ano de 2014). No ano anterior à aplicação do protocolo, dos 229 pacientes internados na UTI, 16,59% desenvolveram PAV. No ano

seguinte, dos 329 pacientes, 11,25% desenvolveram PAV. Ao aplicar o teste odds ratio = 0,64 (IC 95%: 0,39 – 1,04), observou-se que houve tendência a menor risco de desenvolvimento de PAV após aplicação de higiene bucal. Além disso, houve redução nos casos de infecção por *S. aureus* (GALHARDO *et al.*, 2020).

Uma análise em Shanghai de 194 pacientes com PAV demonstrou uma mortalidade geral de 32,47%. Os patógenos respiratórios isolados desses pacientes incluíram 212 cepas bacterianas e 54 cepas fúngicas. Os principais patógenos procariotos foram *Acinetobacter baumannii* (33,96%), *Klebsiella pneumoniae* (23,58%), *Pseudomonas aeruginosa* (19,81%) e *Staphylococcus aureus* (7,08%) (HUANG *et al.*, 2018).

Já foi demonstrado que o *S. aureus* é o patógeno gram positivo de maior prevalência na pneumonia associada à ventilação mecânica e apresenta um sério risco clínico devido ao amplo potencial patogênico de virulência (CHASTRE; FAGON, 2002; TILOUCHE *et al.*, 2021).

As doenças peri-implantares têm sido tratadas por métodos não cirúrgicos e terapias cirúrgicas que se concentram no controle ou remoção do biofilme acumulados nas superfícies dos implantes para restaurar um estado de saúde peri-implantar, muitas vezes associada a procedimentos de regeneração óssea.

Tratamentos cirúrgicos e mecânicos (implantoplastia, curetas plásticas, escovas de titânio) são propostos para controlar a peri-implantite. Existe também a possibilidade de controle químico como adjuvante. Vários produtos e soluções tem sido indicados para isso. A literatura menciona o uso de digluconato de clorexidina 0,12%, enxaguatórios orais e géis enriquecidos com oxigênio, e o ácido cítrico (CORDEIRO *et al.*, 2021; SHIBLI *et al.*, 2021; PAWANE *et al.*, 2023).

A clorexidina (CHX) é um antimicrobiano de amplo espectro bastante utilizado em ambientes de saúde. A CHX causa danos celulares. Ela atravessa a parede celular ou membrana externa, por difusão passiva, e, subsequentemente, ataca o citoplasma bacteriano por trazer dano à delicada membrana semipermeável, seguido por vazamento de constituintes intracelulares. O vazamento não é o responsável pela inativação celular e, sim, uma consequência da morte celular. Altas concentrações de clorexidina também causam coagulação dos constituintes intracelulares (MCDONNELL; RUSSELL, 1999).

Embora considerada padrão ouro no controle de biofilmes orais, uma recente revisão sistemática concluiu que a clorexidina altera a topografia da superfície dos implantes dentários e causa citotoxicidade celular. Isso, por sua vez, pode dificultar o potencial de reosseointegração e, consequentemente, causar falha do implante dentário. Sendo assim,

trabalhos incentivam a implementação de outros agentes antimicrobianos no controle de biofilme oral (KRISHNAMOORTHY; NARAYANA; BALKRISHANAN, 2022).

Além de ação mecânica e química no controle da microbiota na peri-implantite, estudos também já demonstraram o uso de probióticos como método de inibição do crescimento de micro-organismos. Moraes *et al.* (2019) usaram discos de titânio com superfície tratada que foram colonizados por *Staphylococcus aureus* e testados em contato com suspensões probióticas de *Lactobacillus brevis* e *Bifidobacterium bifidum*, sendo comparados a um grupo controle, sem probióticos. As amostras foram incubadas por 24h e então foram realizadas as diluições e a contagem das unidades formadoras de colônia (UFC) para *Staphylococcus aureus*. Após análise estatística dos dados, observou-se que a adição de ambos os probióticos resultaram em redução significativa ($p < 0,05$) de UFCs, quando comparados ao controle. Concluiu-se que os probióticos analisados (*Lactobacillus brevis* e *Bifidobacterium bifidum*) reduziram consideravelmente o crescimento do patógeno *Staphylococcus aureus* e que, além disso, a cepa de *Lactobacillus brevis* apresentou efeito inibidor superior ao da cepa *Bifidobacterium bifidum* (MORAES *et al.*, 2019).

A pressão seletiva de antibióticos em cepas bacterianas, especialmente em condições patológicas crônicas, tem feito com que a busca por agentes antimicrobianos alternativos seja constante. Produtos à base de oxigênio ativo vem sendo comercializados e estudados no controle de biofilme de alguns micro-organismos envolvidos na microbiota da peri-implantite (SHIBLI *et al.*, 2021; PAWANE *et al.*, 2023).

A oxigenoterapia tópica, que apresenta Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) é muito mais prática porque pode ser feita em casa, é mais barata e tem efeitos colaterais mínimos. As ERO são moléculas e íons que contêm oxigênio, que foram reduzidas com adição de elétrons para apresentarem um formato altamente reativo. As ERO como o peróxido de hidrogênio, ânions superóxidos e radicais hidroxila são considerados antimicrobianos uma vez que reagem com grupamentos químicos tiol em proteínas, DNA e em paredes celulares bacterianas (DUNNILL *et al.*, 2017; DRYDEN, 2018).

O oxigênio pode desempenhar um papel na redução da gravidade da inflamação crônica, como a da peri-implantite, e ajudar a quebrar e desorganizar o biofilme devido às suas propriedades oxidativas, o que significa que ele pode reagir com componentes celulares dos micro-organismos, incluindo proteínas, lipídios e ácidos nucleicos. Enxaguantes orais à base de oxigênio tem por característica possuírem o perborato de sódio, que é um agente oxidante suave, barato, estável ao ar e possui alta afinidade pela água. A quebra do perborato de sódio leva à formação de peróxido de hidrogênio que, por sua vez, se decompõe em

água e oxigênio ativo, sendo este último o fator primordial na cicatrização tecidual e na ação antimicrobiana (DRYDEN, 2018; DELIBERADOR *et al.*, 2020).

2. JUSTIFICATIVA

É fato que pacientes internados em UTIs por mais de 48h e com ventilação mecânica apresentam forte risco de desenvolverem pneumonia associada à ventilação mecânica (PAPAZIAN; KLOMPAS; LUYT, 2020) e que entre os micro-organismos envolvidos na PAV, o *Staphylococcus aureus* é a bactéria gram positiva de maior prevalência (HUANG *et al.*, 2018; TILOUCHE *et al.*, 2021).

Foi demonstrado que o *S. aureus* pode colonizar implantes dentários nas fases iniciais após sua instalação (FÜRST *et al.*, 2007) e um recente estudo mostrou que houve tendência de menor risco ao desenvolvimento da PAV após aplicação de higiene bucal. Além disso, houve redução nos casos de infecção por *S. aureus* (GALHARDO *et al.*, 2020).

A prescrição e o consumo excessivo de agentes antimicrobianos têm levado a uma intensa tolerância aos antibióticos e ao surgimento de micro-organismos resistentes.

Os fatos supracitados e a dificuldade de higienização oral mecânica em pacientes intubados nos levam à necessidade da procura por enxaguantes orais para o controle de biofilmes de *Staphylococcus aureus* em implantes e próteses sobre implantes de pacientes internados em UTI com uso de ventilação mecânica. Tais pacientes podem apresentar exposição de componentes protéticos, plataformas e até roscas de implantes dentais favorecendo assim a instalação de micro-organismos e evolução para biofilme com microbiota participante da PAV.

Dessa forma, busca-se prevenir PAV com agentes tópicos, baratos e de fácil aplicação, com conseqüente declínio da mortalidade e redução de custos hospitalares.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Analisar, *in vitro*, o efeito antimicrobiano de enxaguantes orais na redução do biofilme de *S. aureus* formados na superfície de discos de titânio com e sem tratamento de superfície.

3.2 Objetivos Específicos

3.2.1 - analisar a eficácia de enxaguantes orais com liberação de oxigênio em diferentes concentrações (0,003% e 0,006%) e digluconato de clorexidina 0,12% na redução de biofilme de *S. aureus* formados em discos de titânio com e sem tratamento de superfície, através da contagem de unidades formadoras de colônias (UFCs).

3.2.2 - comparar a eficácia dos enxaguantes testados com o controle negativo (solução salina) na redução de biofilme de *S. aureus* formados em discos de titânio com e sem tratamento de superfície, através da contagem de UFCs.

4. METODOLOGIA

4.1 Tipo de estudo

O estudo proposto foi uma pesquisa experimental, laboratorial, *in vitro*.

4.2 Local do estudo

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Microbiologia do Centro Universitário Christus (Unichristus), no Campus Parque Ecológico.

4.3 Amostra

Para este estudo, foram utilizados discos de titânio grau 4 de pureza com dimensões de 6 mm x 4 mm (Neodent – Curitiba/PR - Brasil). As amostras foram de dois tipos: discos com tratamento de superfície (discos tratados) e discos sem tratamento de superfície (discos lisos).

Segundo o fornecedor dos discos para esta pesquisa (Neodent – Curitiba/PR - Brasil), suas linhas de implantes dentais recebem dois tipos de tratamento de superfície: uma com jateamento de óxido de titânio e ataque ácido (superfície Neoporos®) e outra com o mesmo jateamento e ataque ácido, mas seguido de ativação da superfície para obter hidrofiliabilidade (superfície Acqua®) conforme o padrão de fabricação do fornecedor. Os discos utilizados neste experimento foram os de superfície hidrofílica e os sem tratamento de superfície, ambos em embalagens estéreis (Figura 1).

Com as características mencionadas acima, os discos de superfície tratada, procuram mimetizar as superfícies dos implantes dentais, e os discos sem tratamento de superfície mimetizam as superfícies lisas e polidas dos componentes protéticos.

Os discos (de cada superfície – tratados e não tratados) foram aleatorizados nos grupos descritos a seguir. Foram utilizados 36 discos de cada superfície, divididos em 4 grupos, totalizando 9 unidades amostrais por grupo que foram utilizadas nas três replicatas técnicas do experimento, ou seja, foram utilizados 12 discos com 3 unidades para cada grupo em três momentos experimentais diferentes.

Figura 1 – Discos de titânio estéreis sem tratamento de superfície, em suas embalagens.



Fonte: arquivo do autor

4.4 Delineamento experimental

Os seguintes grupos foram testados nesse estudo:

- Salina: solução salina 0,89% NaCl - controle negativo.
- BE: solução de oxigênio ativo com concentração de 0,003%.
- BF: solução de oxigênio ativo com concentração de 0,006%.
- CHX: solução de digluconato de clorexidina 0,12%.

As soluções utilizadas no experimento foram obtidas dos produtos comerciais Blue M® enxaguatório oral, Blue M® fluido bucal e Periogard®. Ambas as soluções de Blue M® são enxaguatórios orais de uso tópico, sem flúor, sem álcool e apresentam liberação de oxigênio ativo a partir da decomposição do perborato de sódio.

O Blue M® enxaguatório oral (BE) apresenta, segundo o fabricante, a seguinte composição: água, glicerina, mel, lauril sulfato de sódio, PVP, citrato de sódio, aromatizante, perborato de sódio, ácido cítrico, salicilato de metila, xylitol, lactoferrina, sulfato de magnésio, limoneno e CI42090. Este produto libera oxigênio na concentração de 0,003% (cerca de 20 mg O₂/L).

O Blue M® fluido bucal (BF) apresenta, segundo o fabricante, a seguinte composição: água, glicerina, citrato de sódio, ácido cítrico, perborato de sódio, gluconato de sódio, goma de celulose, metilparabeno de sódio e sacarina sódica. Este produto libera 0,006% de oxigênio (cerca de 40 mg O₂/L).

Segundo o fabricante, Periogard® é uma solução que contém gluconato a 0,12% (ou digluconato formulado para uma base livre de clorexidina na concentração de 0,067%) e os seguintes componentes inativos: água, glicerina, etanol, polisorbato 20, composição aromática com sabor predominante de menta, sacarinato de sódio, FD&C Blue, nº1. O nome químico do gluconato de clorexidina é: 1,1-bis hexametileno (5-p-clorofenil biguanida) di-D-Gluconato.

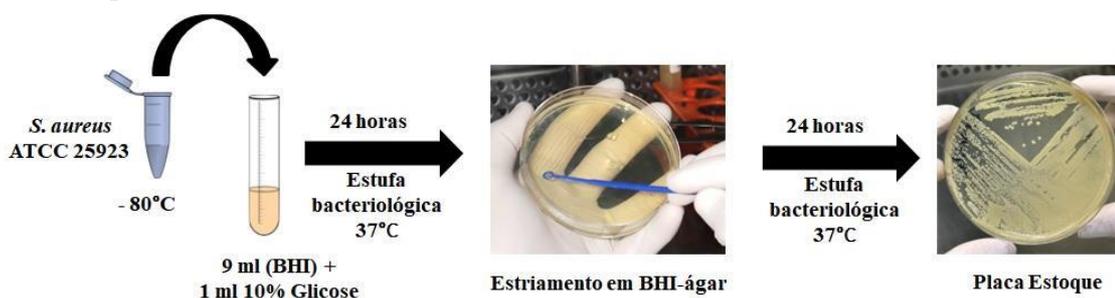
4.5 Preparo e ajuste do inóculo

Staphylococcus aureus, cepa ATCC 25923, foi utilizada como inóculo a fim de proporcionar formação de biofilme.

Para tanto, foram primeiramente semeados em placas de BHI ágar por 24h a 37°C, em estufa bacteriológica. Para confecção dessas placas, foram retirados 200 µl da cepa congelada em meio de cultura BHI-glicerol (Brain Heart Infusion) (KASVI – São José dos Pinhais – PR - Brasil) e transferidos para tubos contendo meio de cultura BHI suplementado com glicose (concentração final de glicose 1%). Os tubos foram armazenados em estufa bacteriológica a 37°C por 24h.

Após 24h, realizou-se estriamento por esgotamento desse caldo previamente inoculado em placas de BHI ágar e a placa foi armazenada por 24h em estufa bacteriológica a 37°C. Assim, foi obtida a placa estoque (Figura 2).

Figura 2. Modelo esquemático de protocolo de ativação da cepa de *S. aureus* ATCC 25923 e aquisição da placa de estoque.



Fonte: arquivo do autor.

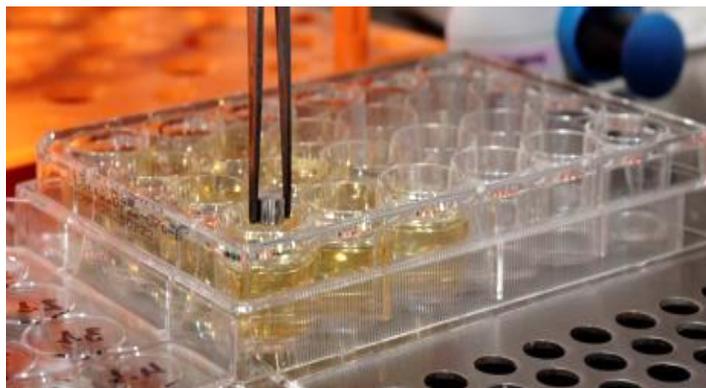
Da placa estoque, foram retiradas 5 unidades formadoras de colônias (UFC) e estas transferidas para um tubo contendo 10 ml de BHI glicosado (glicose de concentração final 1%). Os tubos permaneceram por 24h em estufa bacteriológica. Após este período, os tubos foram retirados da estufa e foi realizado o ajuste da concentração da cepa correspondente à concentração de 6×10^8 UFC/ml (protocolo adaptado de SIDRIM *et al.*, 2017).

Uma placa de 24 poços foi utilizada para o experimento. Em cada poço foi adicionado 0,5 ml do inóculo ajustado e 1,5 ml de caldo BHI glicosado. Dessa forma, os 2 ml finais em cada poço terão a concentração final de microrganismos de $1-2 \times 10^8$ UFC/ml (protocolo adaptado de SIDRIM *et al.*, 2017).

4.6 Formação do biofilme

Os discos de titânio foram imersos nos poços contendo o caldo de cultura inoculado com *Staphylococcus aureus* e depois armazenados em estufa bacteriológica a 37°C por 24h (Figura 3).

Figura 3 – disco de titânio de superfície não tratada sendo imerso no poço com a suspensão de micro-organismos para formação de biofilme.

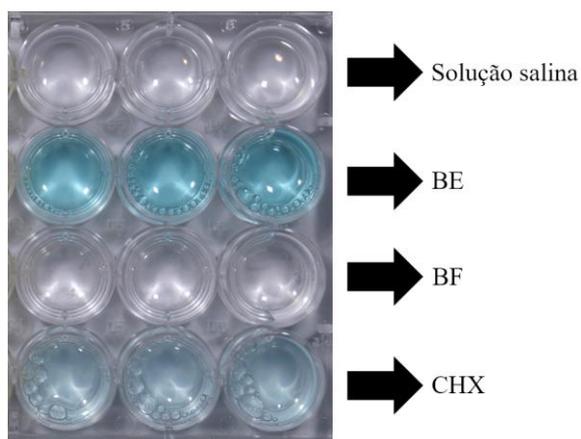


Fonte: arquivo do autor

4.7 Aplicação das formulações controles e experimentais

Após 24h, a placa foi retirada da estufa e os discos de titânio foram transferidos para novos poços, estes contendo 2 ml das formulações, de acordo com os grupos delineados no item 4.4 (Figura 4).

Figura 4 – Poços com as formulações controle e experimentais.



Legenda: Solução salina (controle negativo): solução NaCl 0,89%; BE: enxaguatório oral que libera oxigênio concentração de 0,003% (Enxaguatório Blue M®); BF: enxaguatório oral que libera oxigênio na concentração de 0,006% (Fluido bucal Blue M®); e CHX: Clorexidina - digluconato de clorexidina 0,12%.

Fonte: próprio autor

Os discos de titânio com os biofilmes foram tratados por imersão nas soluções por 1 minuto, 2 vezes ao dia (protocolo adaptado de SOUSA *et al.*, 2015). Nas duas aplicações os discos foram lavados por imersão (duas vezes) em solução salina 0,89%, antes e logo após da aplicação nas soluções experimentais, e em seguida transferidos para uma nova placa de 24 poços contendo caldo BHI glicosado (Figuras 5 a 8). Essa placa foi armazenada em estufa bacteriológica a 37°C até o momento do segundo tratamento do dia. Os discos foram imersos nas soluções de forma semelhante ao descrito anteriormente para a primeira aplicação do dia. Em seguida, as placas foram novamente armazenadas em estufa bacteriológica a 37°C *overnight*.

No dia seguinte, foi repetido o mesmo procedimento detalhado no parágrafo anterior. Imediatamente após os últimos tratamentos, os discos seguiram para coleta do biofilme.

Figura 5 – Disco de titânio de superfície tratada recebendo a lavagem com solução salina 0,89% previamente ao mergulho dentro das soluções a serem testadas.



Fonte: Próprio autor

Figura 6 – Disco de titânio recebendo o tratamento com a solução BE (enxaguatório oral que libera oxigênio 0,003%) por 1 minuto (2 vezes ao dia).



Fonte: Próprio autor

Figura 7 - Disco de titânio recebendo a lavagem pós-tratamento (2 mergulhos em solução salina 0,89%).



Fonte: Próprio autor

Figura 8 - Disco de titânio sendo transferido para o poço com BHI caldo após o segundo tratamento do dia.



Fonte: Próprio autor

4.8 Coleta do biofilme

Os discos de titânio contendo o biofilme foram coletados e transferidos para tubos de microcentrífuga contendo 1 ml de solução salina 0,89%. Os tubos foram agitados e em seguida foi realizada diluição seriada até 10^{-5} . Após diluição, as amostras foram plaqueadas pelo método da gota (10 μ l) em BHI ágar (Figura 9) (LIMA *et al.*, 2020).

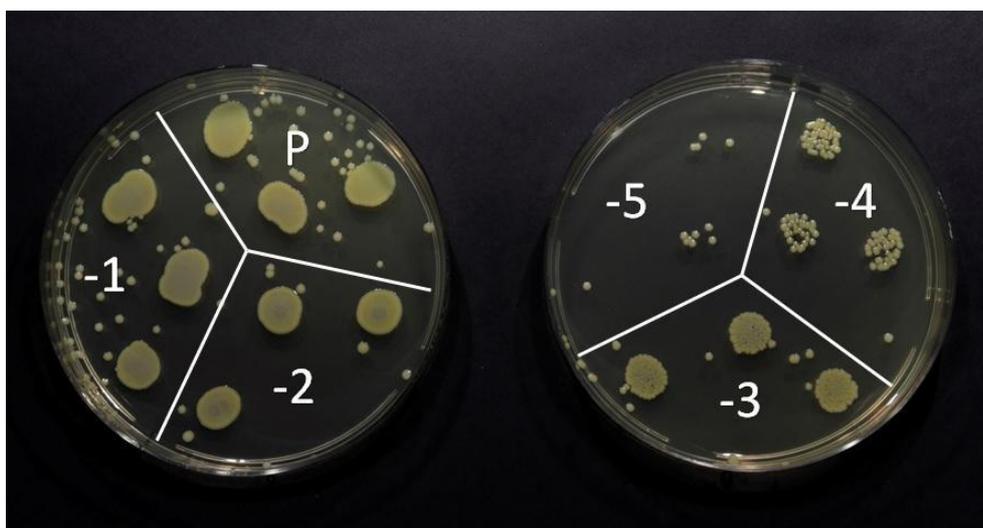
As placas permaneceram em estufa bacteriológica a 37°C por 24 h, e em seguida foi realizada a contagem de unidades formadoras de colônias (Figura 10).

Figura 9– Plaqueamento pelo método da gota em BHI ágar.



Fonte: próprio autor

Figura 10 – Placas com as UFCs 24 horas após o plaqueamento.



P = solução pura de biofilme

-1 = diluição a 10^{-1}

-2 = diluição a 10^{-2}

-3 = diluição a 10^{-3}

-4 = diluição a 10^{-4}

-5 = diluição a 10^{-5}

Fonte: próprio autor

4.9 Aplicação de testes estatísticos

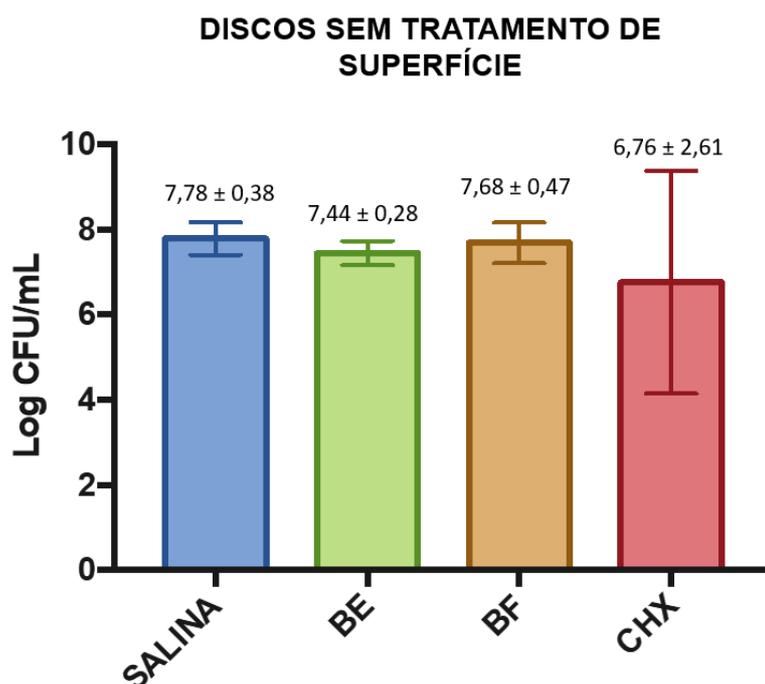
Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e comparados entre grupos por meio dos testes ANOVA seguido do pós-teste de Turkey. Todas as análises foram realizadas adotando uma confiança de 95% no graphpad prisma 5.0 .

5. RESULTADOS

5.1 Resultados em discos sem tratamento de superfície

Os resultados do experimento realizados nos discos de titânio sem tratamento de superfície revelaram que não há diferença estatística significativa ($p>0,05$) na contagem de UFCs recuperadas de biofilmes de *S. aureus* quando submetidos às diferentes soluções: solução salina (controle negativo), BE (solução que libera oxigênio ativo na concentração 0,003%), BF (solução que libera oxigênio ativo na concentração 0,006%) e CHX (clorexidina).

Gráfico 1. Média e Desvio-padrão da contagem de UFCs em biofilme maduro de *Staphylococcus aureus* nos diversos grupos experimentais – discos de titânio sem tratamento de superfície.

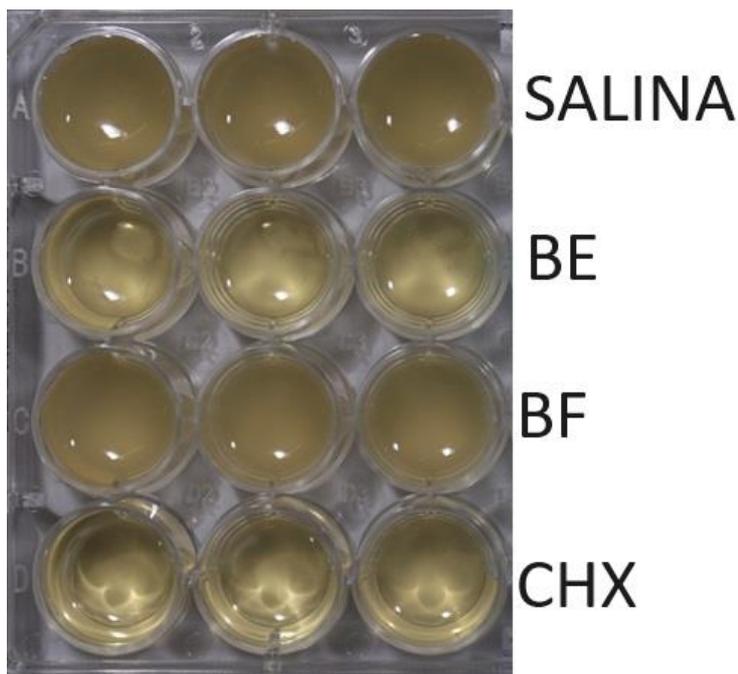


Salina: solução de NaCl 0,89%; BE: solução de oxigênio ativo 0,003%; BF: solução de oxigênio ativo 0,006% e CHX: clorexidina 0,12%.

Uma fotografia dos poços (Figura 11) foi realizada após a retirada dos discos sem tratamento de superfície para as últimas aplicações nas formulações experimentais. Embora não haja diferença estatística nos resultados sobre o biofilme aderido aos discos, é perceptível uma diferença visual de turbidez dos caldos depois que os discos tiveram a ação das soluções testadas após o primeiro tratamento.

Os poços que continham os caldos dos discos que foram imersos em solução salina e BF apresentaram uma maior turbidez que os poços em que estava o caldo dos discos que foram imersos em BE e CHX. Isso pode nos levar à percepção que as duas últimas soluções têm um melhor efeito antimicrobiano nos micro-organismos da cepa que ficaram em suspensão no caldo.

Figura 11 – Diferença visual na turbidez do caldo BHI após a remoção dos discos para o último tratamento.

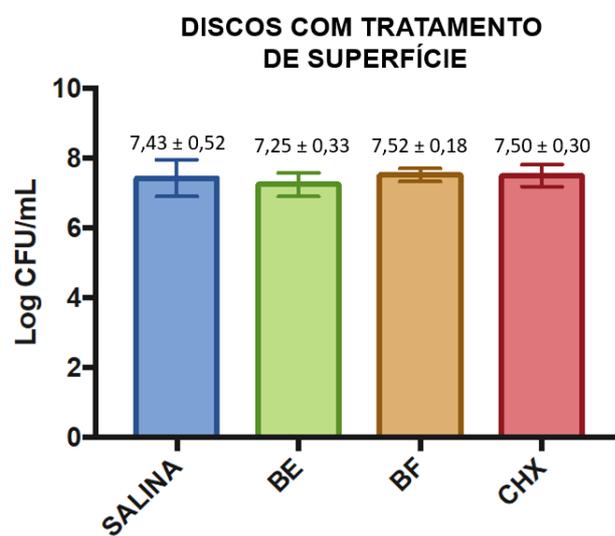


Fonte: próprio autor

5.2 Resultados em discos com tratamento de superfície

Os resultados das repetições realizadas nos discos de titânio com tratamento de superfície revelaram que não há diferença estatística significativa ($p > 0,05$) na contagem de UFCs recuperadas de biofilmes de *S. aureus* quando submetidos às diferentes soluções: controle negativo (solução salina), BE (solução que libera oxigênio ativo na concentração 0,003%), BF (solução que libera oxigênio ativo na concentração 0,006%) e CHX (clorexidina).

Gráfico 2. Média e Desvio-padrão da contagem de UFCs em biofilme maduro de *Staphylococcus aureus* nos diversos grupos experimentais – discos de titânio com tratamento de superfície.



Salina: solução de NaCl 0,89%; BE: solução de oxigênio ativo 0,003%; BF: solução de oxigênio ativo 0,006% e CHX: clorexidina 0,12%.

6. DISCUSSÃO

O presente estudo buscou avaliar o potencial antimicrobiano de enxaguatórios orais na desinfecção de superfícies de titânio para implantes dentais, com tratamento de superfície, e de superfícies de titânio para componentes protéticos, sem tratamento de superfície.

Atualmente, são escassos os estudos sobre o controle do biofilme maduro de *Staphylococcus aureus* em superfícies de discos de titânio com e sem tratamento de superfície comparando diferentes concentrações de enxaguatórios orais que liberam oxigênio ativo (0,003% e 0,006%) e digluconato de clorexidina 0,12%, o que ressalta a relevância deste trabalho.

O biofilme é uma comunidade tridimensional de bactérias com arquitetura intrincada que se adere às superfícies e é encapsulada em uma rede de polissacarídeos hidratados, proteínas e DNA, seja nos tecidos ou em implantes do hospedeiro. As bactérias do biofilme são altamente resistentes à antibioticoterapia devido à matriz exopolissacarídica, o que estimula a investigação acerca de produtos que penetrem no biofilme, degradem a parede celular bacteriana ou afetem seus processos metabólicos (VENKATESAN; PERUMAL; DOBLE, 2015).

Para a realização do estudo, foi utilizado o modelo de formação do biofilme de *Staphylococcus aureus*. A escolha desta cepa baseou-se na evidência de que o *S. aureus* é o micro-organismo gram positivo de maior prevalência nas pneumonias associadas à ventilação mecânica (PAV), além de ser um agente infeccioso oportunista de patogenicidade elevada no desenvolvimento da doença peri-implantar (CHASTRE; FAGON, 2002; MOMBELLI; DÉCAILLET, 2011; PERSSON; RENVERT, 2011; SAHRMANN, *et al.*, 2020).

A revisão sistemática de Lafaurie *et al.* (2017) avaliou o perfil de microbioma e biofilme microbiano da peri-implantite em 26 estudos e concluiu que *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *C. albicans* foram os microrganismos oportunistas mais frequentemente encontrados, e isto sugere a possibilidade de estarem associados à falha do implante. Considerando o perfil microbiológico da peri-implantite, os autores destacam a necessidade de avaliar os protocolos anti-infecciosos utilizados no tratamento desta doença. Diante disso, são necessários mais estudos com antimicrobianos em cepas de *S. aureus*, vista a intensa correlação com a peri-implantite, bem como com a PAV (CHASTRE; FAGON, 2002; LAFAURIE *et al.*, 2017).

Biofilmes maduros são reconhecidamente comunidades muito mais complexas e difíceis de serem erradicadas do que suspensões planctônicas. Biofilmes maduros de *Staphylococcus aureus* apresentam mecanismos de resistência à ação de drogas, corroborando

os resultados obtidos nessa pesquisa (KINT *et al.*, 2012; VENKATESAN; PERUMAL; DOBLE, 2015)

Este trabalho observou ação antimicrobiana limitada das soluções testadas no biofilme maduro de *S. aureus*, tanto em discos de titânio com tratamento de superfície como nos discos sem tratamento. Alguns trabalhos demonstraram ação antimicrobiana de produtos à base de oxigênio, mas em suspensões microbianas e modelos de halos de inibição, porém não em biofilmes, como os desenvolvidos neste estudo (DELIBERADOR *et al.*, 2020; SHIBLI *et al.*, 2021).

Santos *et al.*(2023) desenvolveram um trabalho com aplicação dos produtos à base de oxigênio e clorexidina em biofilmes de *Streptococcus mutans*, uma espécie diferente da utilizada em nosso trabalho, sobre superfície dentinária bovina, um substrato também diferente. Foram usadas diferentes diluições (50%, 25% e 12%) de uma única concentração de enxaguatórios orais à base de oxigênio nas aplicações sobre os biofilmes. Ampliamos nossa testagem usando dois produtos puros com suas concentrações originais, portanto, sem diluição. Em suas conclusões os autores relatam atividade antibiofilme contra *S. mutans* das soluções de diluição 50% e 25%, indicando efeito antimicrobiano contra a cepa testada, resultado esse não encontrado em nosso trabalho contra o biofilme maduro de *S. aureus* (SANTOS *et al.*, 2023).

Vale ressaltar que o efeito das soluções com oxigênio ativo também pode variar conforme a forma apresentação, bem como o uso dessa diversidade de produtos. Estudos que constataram a atividade de produtos à base de oxigênio contra mecanismos microbianos utilizaram, por exemplo, a apresentação em gel, em vez de soluções na forma de enxaguantes orais, como ocorrido na presente proposta (DELIBERADOR *et al.*, 2020; SHIBLI *et al.*, 2021).

O Surghoney® é mencionado na literatura como um tipo de mel cicatrizante biologicamente modificado com espécies reativas de oxigênio (ERO). Uma revisão de Dryden *et al.*(2017) apoia o uso de ERO como terapia antimicrobiana e relatou trabalhos em que esse mel foi capaz de reduzir células viáveis em biofilmes de *S. aureus*, mas não eliminá-lo (DRYDEN *et al.*, 2017).

O mel mencionado anteriormente, o peróxido de hidrogênio e mais dois protótipos de méis foram testados em cepas de *S. aureus* no estudo de Cooke *et al.*(2015). Os autores usaram placas de ágar contaminadas por *S. aureus* e realizaram testes de percentual equivalente fenol para os seus resultados. Em suas conclusões, eles relataram que os produtos que liberam oxigênio têm uma atividade antimicrobiana potente contra uma cepa padrão de *Staphylococcus aureus* – NCIMB 9518 (COOKE *et al.*, 2015). O presente estudo usou um padrão quantitativo de resultados pela contagem de UFC, além de ter desenvolvido um biofilme maduro em

superfícies idênticas às dos implantes dentais e seus componentes. Outro diferencial desta proposta foi ter testado dois produtos menos viscosos que o tipo de mel mencionado.

Estudos para garantir a erradicação de *Staphylococcus aureus* da superfície de implantes por métodos mecânicos e químicos já foram realizados. A exemplo disso, um estudo comparou a eficácia de escovas de titânio, laser diodo de 915 nm e ácido cítrico na eliminação de colônias de *S. aureus* na superfície de implantes. Foram realizados testes combinando a ação mecânica das escovas de titânio com ácido cítrico e escovas de titânio com laser, não havendo diferenças estatísticas entre seus resultados. O estudo indicou que a aplicação da escova de titânio isolada não foi altamente eficaz na remoção das colônias de *S. aureus*, mas deve ser usada em combinação com outras modalidades. A saber, a combinação com ácido cítrico produziu melhores resultados do que seu uso combinado com laser de diodo 915 nm (KARIMI *et al.*, 2021).

Entretanto, a pesquisa citada no parágrafo anterior avaliou substâncias químicas associadas a métodos mecânicos por fricção em superfície de discos de titânio com tratamento de superfície, diferentemente do presente estudo, que não fez uso de qualquer recurso mecânico durante os testes. Foi realizada unicamente a imersão e adicionalmente usou-se discos de titânio sem tratamento de superfície. Ademais, estudos demonstram que a aplicação do ácido cítrico provoca modulações físicas e químicas na superfície do titânio podendo interferir na reosseointegração (CORDEIRO *et al.*, 2021).

Ainda com o intuito de avaliar agentes mecânicos e químicos na descontaminação de superfícies de titânio, Widodo *et al.* (2016) fizeram um estudo *in vitro* também com discos de titânio colonizados com *S. aureus*. Eles compararam a imersão em solução salina, imersão em digluconato de clorexidina 0,2%, terapia fotodinâmica (PDT), pelota de algodão, escova de titânio e uma combinação escova de titânio com PDT. Nas descontaminações químicas, foram feitas uma única aplicação por 60 segundos, diferentemente de nosso trabalho que usou duas aplicações por dia ao longo de dois dias. Os resultados mostraram que não houve diferença estatística na redução de contagem de UFC entre os métodos químicos, o que corrobora com nossos resultados, mesmo usando diferentes tempos de aplicação, e que a combinação escova de titânio e PDT foi a mais eficaz (WIDODO *et al.*, 2016). Sendo assim, se torna evidente pelos trabalhos aqui apresentados e pelos resultados obtidos nesse estudo que há necessidade de uma desorganização do biofilme para que se tenha uma melhor eficácia dos agentes químicos.

Nesse contexto, a viabilidade de um protocolo hospitalar com ação mecânica ou uso de laser para redução de biofilme em pacientes internados em UTI com ventilação mecânica torna-se de difícil aplicação. Portanto, há necessidade de se estabelecerem protocolos mais

simples, principalmente com uso de enxaguantes orais, já que são produtos de fácil acesso e com fácil execução.

Embora não haja um consenso sobre a forma mais eficaz de adjuvante ativo para descontaminar superfícies de implantes em tratamento da peri-implantite, uma revisão sistemática concluiu cautelosamente que o ácido cítrico parece ser o agente quimioterápico mais eficiente na remoção de biofilmes em superfícies de titânio contaminadas, embora haja a desvantagem da modulação química no titânio como mencionado anteriormente no estudo de Cordeiro *et al.* (2021). Dos 4 estudos selecionados nessa revisão, 3 avaliaram remoção de biofilme após aplicação de clorexidina e não obtiveram diferença significativa quando comparada com o grupo controle, ressaltando os resultados obtidos no presente trabalho (NTROUKA *et al.*, 2011).

Alguns autores apontam o uso de biomateriais portadores de substâncias antimicrobianas para aplicação como revestimentos em dispositivos de implantes dentários para prevenir a colonização bacteriana e a formação de biofilme. Tal estratégia demonstra-se interessante, visto que os resultados desse estudo não apontam uma atividade positiva das drogas testadas em biofilme maduro já estabelecido na superfície de discos de titânio que simulam os implantes dentais e componentes protéticos com soluções à base de oxigênio, assim como com a clorexidina (DE AVILA; VAN OIRSCHOT; VAN DEN BEUCKEN, 2020).

O trabalho em discussão usou, além de enxaguantes orais à base de oxigênio, a clorexidina. Os resultados demonstraram que a CHX tem ação limitada contra o biofilme maduro de *Staphylococcus aureus*. O objetivo de testar outras drogas, como aqui proposto, foi desviar os efeitos indesejados dessa solução. A meta-análise de Zhang; Tang; Fu (2014) destacou, como principais efeitos adversos da CHX os manchamentos na superfície dentária, anormalidade no paladar e irritação da mucosa oral em pacientes que a receberam na prevenção da pneumonia associada à ventilação mecânica (ZHANG; TANG; FU, 2014).

Revisões bibliográficas confirmam em seus achados os efeitos adversos e negativos mencionados no parágrafo anterior (ZANATTA; RÖSING, 2007). Além disso, uma preocupação do uso de clorexidina 0,12% é a possibilidade de resistência bacteriana. A revisão de Cieplik *et al* (2019) relatou diversos trabalhos demonstrando evidências da resistência de bactérias orais à CHX.

Klompas *et al.*(2022) destacam como estratégia para prevenção da PAV o cuidado oral do paciente sem a utilização da clorexidina. Segundo os autores, dada a falta de impacto claro da clorexidina nas taxas de PAV e na possibilidade de danos, cuidados bucais de rotina com clorexidina não são recomendados. Os cuidados bucais, incluindo a escovação dos dentes

sem clorexidina, entretanto, são considerados uma prática essencial. Por isso, um dos focos deste estudo foi buscar alternativas terapêuticas tópicas que não promovessem tal efeito, tais como os produtos que liberam oxigênio ativo testados.

Na prática clínica, bactérias como o *Staphylococcus aureus* foram consideradas resistentes à clorexidina. Um recente estudo comparou a resposta adaptativa de *Staphylococcus aureus* versus *Streptococcus mutans* frente à resistência à clorexidina. Por meio de fluorescência intensificada na superfície, verificou-se deformação gradual na parede celular, sugerindo que mecanismos de efluxo podem ter sido ativados impedindo o acúmulo de alta concentração de clorexidina no citoplasma e, com isso, estimulando o desenvolvimento de resistência à clorexidina em *S. aureus*, o que não aconteceu com *S. mutans*. Neste microrganismo, a clorexidina causou deformação imediata da parede celular, mas com indícios de rápida auto-reparação dos danos, não sendo capaz de reduzir eficazmente a concentração do produto no citoplasma. Com isso, a auto-reparação é suicida e previne o desenvolvimento de uma progênie resistente à clorexidina em *S. mutans*, mas não em *S. aureus* (VAN DE LAGEMAAT *et al.*, 2022).

Nessa perspectiva, estudos como o de Ashref *et al.* (2022) e Rajkhowa *et al.* (2023) demonstraram efeitos positivos de enxaguantes orais à base de oxigênio. Os autores indicam o enxaguante oral que libera oxigênio ativo na concentração 0,003% utilizado neste protocolo como alternativa à clorexidina. No primeiro estudo, avaliando os efeitos antimicrobianos em pacientes submetidos a implantes dentários, foi possível verificar o efeito similar na redução dos micro-organismos após a instalação de implantes comparando os enxaguantes que liberam oxigênio e a clorexidina, isto é, sem diferenças significativas entre os dois. Isso permite apresentar as soluções à base de oxigênio, como as utilizadas na presente pesquisa, como uma opção de substituição à clorexidina, em razão da resistência microbiana e demais efeitos colaterais aos quais a clorexidina está suscetível (ASHREF *et al.*, 2022; RAJKHOWA *et al.*, 2023).

Abordando as superfícies dos discos usados neste estudo, conclui-se que a topografia das superfícies tratadas e não-tratadas por si só não trouxe nenhuma influência sobre os resultados das diferentes drogas que foram aplicadas, apoiando resultados observados anteriormente (WIDODO *et al.*, 2016).

Embora com metodologia microbiológica de execução correta, reconhece-se que existem limitações nesta pesquisa. Uma destas é o fato de se testar um biofilme de uma única espécie, o que não simula um ecossistema de ambiente real da cavidade oral. Sugere-se, assim,

a necessidade de serem realizados estudos semelhantes em biofilmes de outras espécies comuns no biofilme da peri-implantite.

Além disso, é necessário avaliar diferentes regimes de aplicação das drogas aqui testadas para serem estabelecidos novos protocolos, já que foram utilizadas apenas a aplicação de duas vezes ao dia.

Este estudo verificou a ação dos produtos após a formação do biofilme maduro, no entanto, são necessários novos estudos, com aplicação das drogas antes da colonização pelo biofilme ou durante sua formação na superfície dos discos de titânio, de modo a avaliar uma terapêutica preventiva à sua formação e, conseqüentemente, contribuir para uma possível redução da microbiota patogênica da peri-implantite.

7. CONCLUSÃO

A clorexidina e as soluções testadas que liberam oxigênio ativo nas concentrações 0,003% e 0,006% não demonstraram eficácia antimicrobiana frente à biofilmes maduros de *Staphylococcus aureus* formados em discos de titânio com e sem tratamento de superfície. Quando comparada a ação dos produtos que liberam oxigênio com controle negativo (solução salina) e com clorexidina também não há diferença.

8. REFERÊNCIAS

ARCIOLA, Carla Renata; CAMPOCCIA, Davide; MONTANARO, Lucio. Implant infections: adhesion, biofilm formation and immune evasion. **Nature reviews microbiology**, [London], v. 16, n. 7, p. 397-409, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29720707/>. Acesso em: 20 mai. 2023.

ASHREF, Akhil; GAJENDRAN, Priyalochana; NESAPPAN, Thiyaneswaran. Comparative evaluation of the clinical efficacy of oxygen enriched mouthwash and chlorhexidine mouthwash in patients undergoing dental implant placement. **Journal of odontology**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 1-3, 2022. Disponível em: <https://bluemcare.com/content/uploads/2023/10/2022-comparative-evaluation-of-the-clinical-efficacy-of-oxygen-enriched-mouthwash-and-chlorhexidine-mouthwash-in-patients-undergoing-dental-implant-placement.pdf>. Acesso em: 20 mai. 2023.

AVILA, Erica D. de; VAN OIRSCHOT, Bart A.; VAN DEN BEUCKEN, Jeroen J. J. P. Biomaterial-based possibilities for managing peri-implantitis. **Journal of periodontal research**, [Malden], v. 55, n. 2, p. 165-173, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31638267/>. Acesso em 15 mar. 2023.

BELIBASAKIS, G. N.; MANOIL, D. Microbial community-driven etiopathogenesis of peri-implantitis. **Journal of dental research**, [Thousand Oaks], v. 100, n. 1, p. 21-28, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32783779/>. Acesso em: 20 mai. 2023.

CHASTRE, Jean; FAGON, Jean-Yves. Ventilator-associated pneumonia. **American journal of respiratory and critical care medicine**, [New York], v. 165, n. 7, p. 867-903, 2002. Disponível em: <https://www.atsjournals.org/doi/full/10.1164/ajrccm.165.7.2105078>. Acesso em 15 mar. 2023.

CIEPLIK, Fabian *et al.* Resistance toward chlorhexidine in oral bacteria—is there cause for concern?. **Frontiers in microbiology**, [Lausanne], v. 10, p. 587, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30967854/>. Acesso em 15 mar. 2023.

COOKE, Jonathan *et al.* The antimicrobial activity of prototype modified honeys that generate reactive oxygen species (ROS) hydrogen peroxide. **BMC research notes**, [London], v. 8, p. 1-5, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25627827/>. Acesso em 15 mar. 2023.

CORDEIRO, Jairo M. *et al.* Optimizing citric acid protocol to control implant-related infections: an in vitro and in situ study. **Journal of periodontal research**, [Malden], v. 56, n. 3, p. 558-568, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33538336/>. Acesso em 15 mar. 2023.

DELIBERADOR, Tatiana Miranda *et al.* Comparative analysis in vitro of the application of blue® m oral gel versus chlorhexidine on *Porphyromonas gingivalis*: a pilot study. **Advances in microbiology**, [s. l.], v. 10, n. 4, p. 194-201, 2020. Disponível em: https://www.scirp.org/html/4-2271480_99749.htm. Acesso em 15 mar. 2023.

DRYDEN, Matthew S. *et al.* Reactive oxygen: a novel antimicrobial mechanism for targeting biofilm-associated infection. **Journal of global antimicrobial resistance**, [Netherlands], v. 8, p. 186-191, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28213334/>. Acesso em 15 mar. 2023.

DRYDEN, Matthew. Reactive oxygen species: a novel antimicrobial. **International journal of antimicrobial agents**, [Netherlands], v. 51, n. 3, p. 299-303, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28887201/>. Acesso em 10 Abr. 2023.

DUARTE, Simone *et al.* Influences of starch and sucrose on *Streptococcus mutans* biofilms. **Oral microbiology and immunology**, [Copenhagen], v. 23, n. 3, p. 206-212, 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18402606/>. Acesso em 10 Abr. 2023.

DUNNILL, Christopher *et al.* Reactive oxygen species (ROS) and wound healing: the functional role of ROS and emerging ROS-modulating technologies for augmentation of the healing process. **International wound journal**, [Oxford], v. 14, n. 1, p. 89-96, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26688157/>. Acesso em 10 Abr. 2023.

FU, Jia-Hui; WANG, Hom-Lay. Breaking the wave of peri-implantitis. **Periodontology 2000**, [Copenhagen], v. 84, n. 1, p. 145-160, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32844418/>. Acesso em 10 Abr. 2023.

FÜRST, Mirjam M. *et al.* Bacterial colonization immediately after installation on oral titanium implants. **Clinical oral implants research**, [Copenhagen], v. 18, n. 4, p. 501-508, 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17501978/>. Acesso em 10 Abr. 2023.

GALHARDO, Luciana F. *et al.* Impact of oral care and antiseptics on the prevalence of ventilator-associated pneumonia. **Oral health and preventive dentistry**, [Berlin], v. 18, n. 1, p. 331-336, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32618456/>. Acesso em 10 Abr. 2023.

HUANG, Yi *et al.* Microbial etiology and prognostic factors of ventilator-associated pneumonia: a multicenter retrospective study in Shanghai. **Clinical infectious diseases**, [Oxford], v. 67, p. S146-S152, 2018. Supl. 2. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30423049/>. Acesso em 10 Abr. 2023.

KALIL, Andre C. *et al.* Management of adults with hospital-acquired and ventilator-associated pneumonia: 2016 clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America and the American Thoracic Society. **Clinical infectious diseases**, [Oxford], v. 63, n. 5, p. e61-e111, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27418577/>. Acesso em 4 Jun. 2023.

KARIMI, Mohammad Reza *et al.* Efficacy of titanium brush, 915 nm diode laser, citric acid for eradication of *Staphylococcus aureus* from implant surfaces. **BMC oral health**, [London], v. 21, n. 1, p. 1-7, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34876098/>. Acesso em 4 Jun. 2023.

KINT, Cyrielle I. *et al.* New-found fundamentals of bacterial persistence. **Trends in microbiology**, [Cambridge], v. 20, n. 12, p. 577-585, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22959615/>. Acesso em 4 Jun. 2023.

KLOMPAS, Michael *et al.* Strategies to prevent ventilator-associated pneumonia, ventilator-associated events, and nonventilator hospital-acquired pneumonia in acute-care hospitals: 2022 Update. **Infection control and hospital epidemiology**, [Cambridge], v. 43, n. 6, p. 687-713, 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35589091/>. Acesso em 4 Jun. 2023.

KRISHNAMOORTHY, Gayathri; NARAYANA, Aparna; BALKRISHANAN, Dhanasekar. Chlorhexidine for the treatment of peri-implantitis: is it a Benison?. **Journal of long-term effects of medical implants**, [Boca Raton], v. 32, n. 1, p. 19-23, 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35377990/>. Acesso em 4 Jun. 2023.

LAFABURIE, Gloria Inés *et al.* Microbiome and microbial biofilm profiles of peri-implantitis: a systematic review. **Journal of periodontology**, [Chicago], v. 88, n. 10, p. 1066-1089, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28625077/>. Acesso em 4 Jun. 2023.

LIMA, Ramille Araújo *et al.* Antimicrobial effect of anacardic acid-loaded zein nanoparticles loaded on *Streptococcus mutans* biofilms. **Brazilian journal of microbiology**, [Rio de Janeiro], v. 51, n. 4, p. 1623-1630, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32562202/>. Acesso em 22 Jun. 2023.

MCDONNELL, Gerald; RUSSELL, A. Denver. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. **Clinical microbiology reviews**, [Washington], v. 12, n. 1, p. 147-179, 1999. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9880479/>. Acesso em 22 Jun. 2023.

MOMBELLI, Andrea; DÉCAILLET, Fabien. The characteristics of biofilms in peri-implant disease. **Journal of clinical periodontology**, [Malden], v. 38, p. 203-213, 2011. Suppl. 11. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21323716/>. Acesso em 22 Jun. 2023.

MORAES, Mariana Cavalcante Costa *et al.* Avaliação do efeito de cepas probióticas em biofilme de *S. aureus* sobre discos de titânio com superfície tratada. **Revista de Odontologia da UNESP**, [s. l.], v. 48, p. e20190096, 2019. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rounesp/a/gHGHG6FNrcMhwXhhmKSzNMN/>. Acesso em 22 Jun. 2023.

NTROUKA, Victoria I. *et al.* The effect of chemotherapeutic agents on contaminated titanium surfaces: a systematic review. **Clinical oral implants research**, [Copenhagen], v. 22, n. 7, p. 681-690, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2119889/>. Acesso em 22 Jun. 2023.

OSMAN, Sara *et al.* The incidence of ventilator-associated pneumonia (VAP) in a tertiary-care center: comparison between pre-and post-VAP prevention bundle. **Journal of infection and public health**, [s. l.], v. 13, n. 4, p. 552-557, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31668986/>. Acesso em 20 Ago. 2023.

PAPAZIAN, Laurent; KLOMPAS, Michael; LUYT, Charles-Edouard. Ventilator-associated pneumonia in adults: a narrative review. **Intensive care medicine**, [New York], v. 46, n. 5, p. 888-906, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32157357/>. Acesso em 20 Ago. 2023.

PAWANE, Iram Rafique *et al.* Antibacterial efficacy of oxygen enriched mouthwash in patients undergoing dental implant placement by real time polymerase chain reaction. **Journal of population therapeutics and clinical pharmacology**, [s. l.], v. 30, n. 6, p. 121-127, 2023. Disponível em: <https://www.jptcp.com/index.php/jptcp/article/view/1523>. Acesso em 20 Dez. 2023.

PERSOON, G. Rutger; RENVERT, Stefan. Cluster of bacteria associated with peri-implantitis. **Clinical implant dentistry and related research**, [Malden], v. 16, n. 6, p. 783-793, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23527870/>. Acesso em 20 Ago. 2023.

RAJKHOWA, Chitrani *et al.* Comparison of the efficacy of active oxygen - containing mouthwash (Blue M) with chlorhexidine mouthwash (Hexidine) and its effect on plaque, calculus, and gingival inflammation. **International journal of oral health dentistry**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 44-47, 2023. Disponível em: <https://bluem.com.br/wp-content/uploads/2023/07/2023>. Acesso em 14 Dez. 2023.

SAHRMANN, Philipp *et al.* The microbiome of peri-implantitis: a systematic review and meta-analysis. **Microorganisms**, [Basel], v. 8, n. 5, p. 661, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32369987/>. Acesso em 14 Dez. 2023.

SANTOS, Veronica Canela Estevam dos *et al.* Effects of BlueM® against *Streptococcus mutans* biofilm and its virulence gene expression. **Brazilian dental journal**, [Ribeirão Preto], v. 34, n. 1, p. 19-28, 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36888841/>. Acesso em 14 Dez. 2023.

SHIBLI, Jamil Awad *et al.* Metabolic activity of hydro-carbon-oxo-borate on a multispecies subgingival periodontal biofilm: a short communication. **Clinical oral investigations**, [Berlin], v. 25, n. 10, p. 5945-5953, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33774716/>. Acesso em 14 Dez. 2023.

SIDRIM, José Júlio Costa *et al.* Promethazine improves antibiotic efficacy and disrupts biofilms of *Burkholderia pseudomallei*. **Biofouling**, [Abingdon], v. 33, n. 1, p. 88-97, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27936915/>. Acesso em 14 Dez. 2023.

SOUSA, Denise Lins de *et al.* Effect of twice-daily blue light treatment on matrix-rich biofilm development. **PloS one**, [San Francisco], v. 10, n. 7, p. e0131941, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26230333/>. Acesso em 01 Nov. 2023.

TILOUCHE, Lamia *et al.* Staphylococcus aureus ventilator-associated pneumonia: a study of bacterio-epidemiological profile and virulence factors. **Current microbiology**, [New York], v. 78, n. 7, p. 2556-2562, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33969430/>. Acesso em 01 Nov. 2023.

VAN DE LAGEMAAT, Marieke *et al.* A Comparison of the adaptive response of *Staphylococcus aureus* vs. *Streptococcus mutans* and the development of chlorhexidine resistance. **Frontiers in microbiology**, [Lausanne], v. 13, p. 861890, 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35694293/>. Acesso em 01 Nov. 2023.

VENKATESAN, Nandakumar; PERUMAL, Govindaraj; DOBLE, Mukesh. Bacterial resistance in biofilm-associated bacteria. **Future microbiology**, [London], v. 10, n. 11, p. 1743-1750, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26517598/>. Acesso em 01 Nov. 2023.

WIDODO, Arifo *et al.* An in vitro study on disinfection of titanium surfaces. **Clinical oral implants research**, [Copenhagen], v. 27, n. 10, p. 1227-1232, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26863898/>. Acesso em 01 Nov. 2023.

ZANATTA, Fabricio Batistin; RÖSING, Cassiano Kuchenbecker. Chlorexidine: actions's mechanisms and recent evidences of it's efficacy over supragingival biofilm context. **Scientifica**, [s. l.], v. 1, n. 2, p. 35-43, 2007. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/242720984> /. Acesso em 01 Nov. 2023.

ZHANG, Ting-Ting; TANG, Shan-Shan; FU, Li-Juan. The effectiveness of different concentrations of chlorhexidine for prevention of ventilator-associated pneumonia: a meta-analysis. **Journal of clinical nursing**, [Boston], v. 23, n. 11-12, p. 1461-1475, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23952970/>. Acesso em 01 Nov. 2023.