

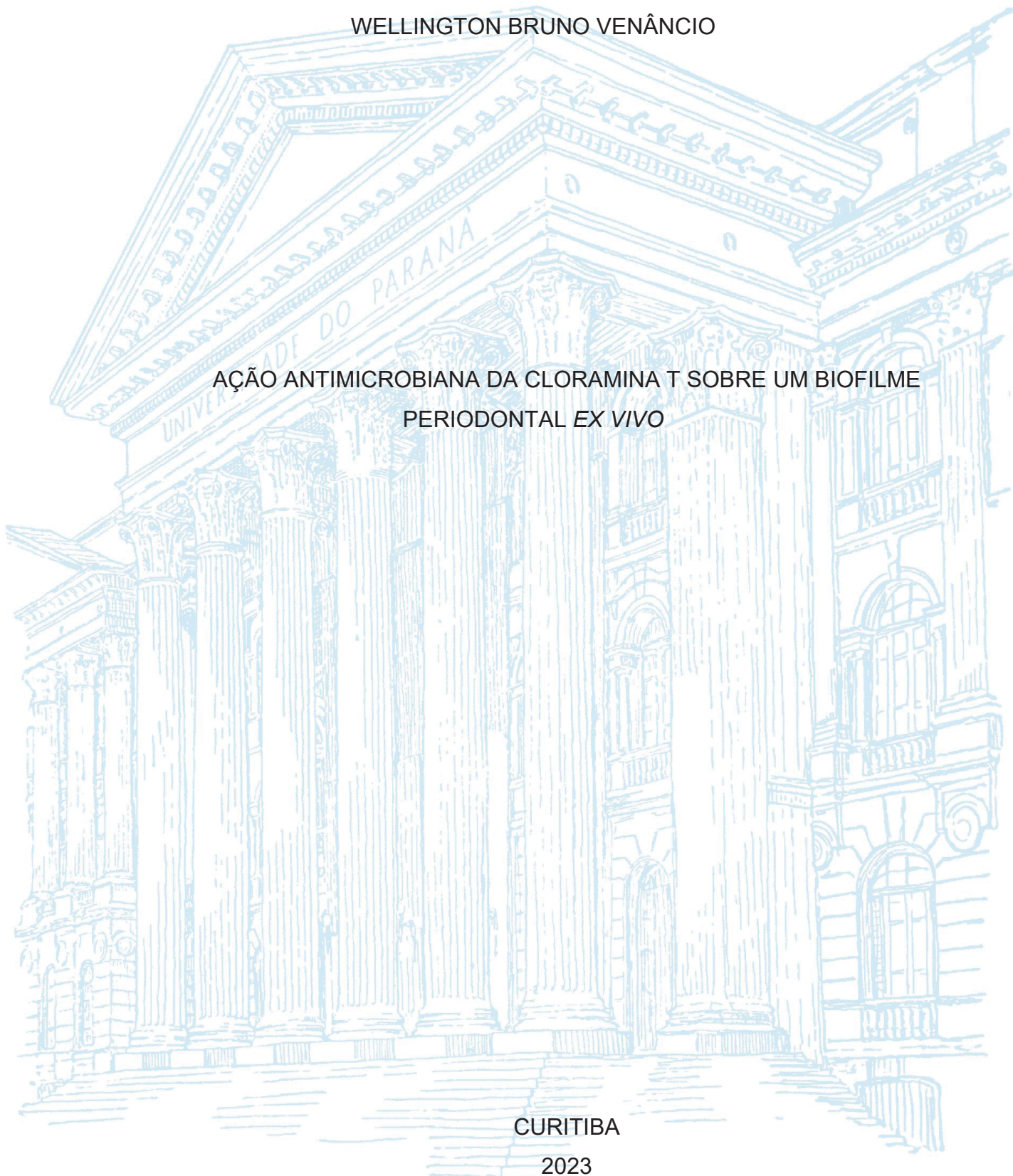
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

WELLINGTON BRUNO VENÂNCIO

AÇÃO ANTIMICROBIANA DA CLORAMINA T SOBRE UM BIOFILME
PERIODONTAL EX VIVO

CURITIBA

2023



WELLINGTON BRUNO VENÂNCIO

AÇÃO ANTIMICROBIANA DA CLORAMINA T SOBRE UM BIOFILME
PERIODONTAL *EX VIVO*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientadora: Profa. Dra. Geisla Mary Silva Soares

CURITIBA

2023

Venâncio, Wellington Bruno

Ação antimicrobiana da cloramina T sobre um biofilme periodontal *ex vivo* [recurso eletrônico] / Wellington Bruno Venâncio – Curitiba, 2023.

1 recurso online : PDF

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia.
Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2023.

Orientador: Profa. Dra. Geisla Mary Silva Soares

1. Doenças periodontais. 2. Biofilmes. 3. Testes laboratoriais. 4. Técnicas *in vitro*.
I. Soares, Geisla Mary Silva. II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

CDD 617.632

Maria da Conceição Kury da Silva CRB 9/1275

TERMO DE APROVAÇÃO



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ODONTOLOGIA -
40001016065P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação ODONTOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **WELLINGTON BRUNO VENÂNCIO** intitulada: **AÇÃO ANTIMICROBIANA DA CLORAMINA T SOBRE UM BIOFILME PERIODONTAL EX VIVO**, sob orientação da Profa. Dra. GEISLA MARY SILVA SOARES, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 14 de Setembro de 2023.

Assinatura Eletrônica

25/09/2023 12:40:46.0

GEISLA MARY SILVA SOARES

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

25/09/2023 11:57:21.0

CASSIUS CARVALHO TORRES PEREIRA

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

26/09/2023 15:25:49.0

TELMA BLANCA LOMBARDO BEDRAN

Avaliador Externo (PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ- PUCPR)

Av. Prof. Lothário Meissner, 632 - CURITIBA - Paraná - Brasil
CEP 80210-170 - Tel: (41) 3360-4134 - E-mail: posodonto@ufpr.br
Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.
Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 317810

**Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://siga.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp>
e insira o código 317810**

Dedico este trabalho aos meus amados pais, Elcio e Maria, cujo incansável esforço, com amor e crença inabalável em mim, me conduziram pelos caminhos da perseverança, união e educação.

AGRADECIMENTOS

A minha mãe, por sempre estar presente, sentir e acolher as minhas necessidades, angústias e alegrias. Ela sorriu, chorou e emocionou-se comigo.

Ao meu pai, que dedicou toda uma vida de trabalho e nunca desistiu de aprender, proporcionando-me assim uma vida digna e com amor.

A minha irmã, pelas inúmeras conversas e risadas, por sempre me entender e torcer por mim.

Ao meu irmão pela constante preocupação, dedicação e proteção. Ele nunca me deixou sem amparo.

Ao meu namorado Andrey, que sempre acreditou em mim e me apoiou desde o início. Uma pessoa que eu admiro profundamente e amo com todo meu coração.

Aos meus sobrinhos Lara, Larissa e Lucas, que trazem um toque de alegria à minha vida, fazendo com que eu esqueça de todos os meus problemas.

Minha querida orientadora, Professora Dra. Geisla, merece todo reconhecimento por sua imensa competência e profissionalismo. Generosamente compartilhou comigo todos os seus conhecimentos e experiências acumulados ao longo de uma vida dedicada à pesquisa. Além disso, sua doçura, gentileza e disposição tornaram essa jornada ainda mais especial. Expressar minha gratidão por tudo o que aprendi com ela é uma tarefa difícil.

Aos meus estimados professores da área de Periodontia na UFPR: Reila, João Paulo e Humberto. Eles não apenas me acolheram, mas também me proporcionaram um aprendizado muito além das minhas expectativas.

Àqueles que se tornaram amigos nesta jornada, Camila, Stefany, Gabriela, Cristiane e Luciane. Agradeço por compartilharem suas experiências e por serem

uma fonte constante de apoio. Saibam que levarei vocês no coração para o resto da vida.

Gustavo e Wictor, meus colegas de iniciação científica, merecem meu reconhecimento especial pela prestatividade e companheirismo constantes.

Alan, seu apoio técnico foi fundamental e não passa despercebido.

Cada um de vocês desempenhou um papel fundamental no meu percurso acadêmico, e por isso, expresso minha profunda gratidão a todos.

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

O presente trabalho foi realizado com apoio do Biobanco de Dentes Humanos (BDH-UFPR), parte integrante e indissociável do Biobanco Institucional da Universidade Federal do Paraná (Código B-091/ CONEP).

Em algum lugar, alguma coisa incrível está esperando para ser descoberta.”

Carl Sagan

RESUMO

A periodontite é uma doença inflamatória microbiana crônica, multifatorial associada a um biofilme disbiótico. É prevalente na população mundial e se caracteriza pela perda progressiva dos tecidos de suporte dental. O biofilme dental é complexo, pode conter centenas de espécies bacterianas e é considerado o fator etiológico primário da periodontite. Os modelos de biofilme *in vitro* têm a finalidade de mimetizar os biofilmes *in vivo*, e com isso possibilitar diversas avaliações como análise morfológica, interações microbianas, resposta celular e ação de produtos que possam interferir na formação dos biofilmes, como os antimicrobianos. Os enxaguatórios bucais são meios químicos de controle do biofilme. O presente estudo teve como objetivo avaliar a ação antimicrobiana da cloramina-T (CT) sobre biofilmes periodontais *ex vivo*. Amostras de biofilmes foram coletadas de sítios periodontais profundos de uma paciente portadora de periodontite para o preparo de um inóculo, que foi transferido para um placa de 96 poços contendo meio de cultura BHI + Hemina 1% + sangue de carneiro 5%. Sobre a placa de 96 poços foi posicionada uma tampa contendo elementos dentários, que foram preparados e fixados de forma que em cada poço se posicionasse um elemento dentário. Então a placa foi encubada em anaerobiose a 37°C por sete dias. Em seguida, os elementos dentários contendo biofilmes foram expostos às soluções de CT 0,2%, clorexidina (CLX) 0,12% e H₂O destilada autoclavada. Foram testados os tempos de exposição de um minuto e doze horas. Concomitante ao modelo proposto, um dispositivo de biofilme de Calgary (DBC) foi utilizado nas mesmas condições, para informações comparativas. Para avaliação do modelo de biofilme *ex vivo* foram realizadas contagem de unidades formadoras de colônias (UFC), análise de atividade celular pelo teste TTC e espectrometria, e análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura. Já para avaliação da ação da CT sobre os biofilmes formados foram realizadas contagem de UFC e análise de atividade celular pelo teste Cloreto de Trifeniltetrazólio (TTC) 1% e espectrometria. A análise estatística dos resultados foi realizada pelo teste Anova e pós teste de Tukey. Como resultados, foi observado que os biofilmes formados sobre as superfícies dentárias foram semelhantes aos formados no DBC em quantidade de UFC e percentual de atividade celular ($p > 0,05$), mas morfológicamente apresentavam estrutura mais densa e uniforme. A exposição da solução CT durante um minuto aos biofilmes formados tanto sobre superfície dentária como no DBC resultou em uma quantidade de UFC inferior ao controle negativo ($p > 0,05$) e superior à CLX ($p < 0,05$). Quando os biofilmes foram expostos durante doze horas à CT resultaram menor quantidade de UFC que H₂O ($p < 0,05$) e semelhante a CLX e CLX doze horas ($p > 0,05$). Em relação atividade metabólica, a CT utilizada por um minuto não causou alterações nos biofilmes, mas quando foi realizada doze horas de exposição, causou uma redução na atividade metabólica semelhante a CLX e CLX doze horas ($p > 0,05$). Desta forma, biofilmes *ex vivo* densos e uniformes, cultivados a partir de amostras de biofilmes coletadas de sítios periodontais profundos foram desenvolvidos na superfície de elementos dentários extraídos. Não foi observada ação antimicrobiana da solução de CT a 0,2% sobre os biofilmes *ex vivo* quando utilizada por um minuto. Quando a CT foi utilizada por doze horas teve ação antimicrobiana semelhante à ação da CLX.

Palavras-chave: biofilmes; testes laboratoriais; doenças periodontais; técnicas *in vitro*; agente antimicrobiano.

ABSTRACT

Periodontitis is a chronic, multifactorial, microbial inflammatory disease associated with a dysbiotic biofilm. It is prevalent in the world population and is characterized by the progressive loss of tooth support tissues. Dental biofilm is complex, can contain hundreds of bacterial species and is considered the primary etiological factor in periodontitis. The purpose of in vitro biofilm models is to simulate biofilms in vivo, thus allowing for various evaluations such as morphological analysis, microbial interactions, cellular response and the action of products that may interfere with biofilm formation, such as antimicrobials. Mouthwashes are chemical methods of biofilm control. The aim of this study was to evaluate the antimicrobial action of chloramine-T (CT) on periodontal biofilms ex vivo. Biofilm samples were collected from deep periodontal sites of a patient with periodontitis to prepare an inoculum, which was transferred to a 96-well plate containing BHI + Hemin 1% + sheep's blood 5% culture medium. A plate containing dental elements was placed on top of the 96-well plate and prepared and fixed so that one dental element was placed in each well. The plate was then incubated in anaerobiosis at 37°C for seven days. Dental elements containing biofilms were then exposed to solutions of 0.2% TC, 0.12% chlorhexidine (CLX) and autoclaved distilled H₂O. Exposure times of one minute and twelve hours were tested. In addition to the proposed model, a Calgary biofilm device (DBC) was used under the same conditions for comparative information. To evaluate the biofilm model ex vivo, colony-forming units (CFU) were counted, cell activity was analyzed using the TTC test and spectrometry, and morphological analysis was carried out using scanning electron microscopy. In order to evaluate the action of TC on the biofilms formed, CFU counts were taken and cell activity was analyzed using the 1% Triphenyltetrazolium Chloride (TTC) test and spectrometry. The results were statistically analyzed using the ANOVA test and Tukey's post-test. The results showed that the biofilms formed on the tooth surfaces were similar to those formed on the DBC in terms of the number of CFU and percentage of cell activity ($p > 0.05$), but morphologically they had a denser and more uniform structure. Exposure of the CT solution for one minute to the biofilms formed both on the tooth surface and in the DBC resulted in a lower number of CFU than the negative control ($p > 0.05$) and higher than CLX ($p < 0.05$). When the biofilms were exposed for twelve hours to CT, the number of CFU was lower than H₂O ($p < 0.05$) and similar to CLX and CLX twelve hours ($p > 0.05$). In terms of metabolic activity, CT applied for one minute did not cause any changes in the biofilms, but when it was applied for twelve hours, it caused a reduction in metabolic activity similar to CLX and CLX twelve hours ($p > 0.05$). Thus, dense and uniform ex vivo biofilms grown from biofilm samples collected from deep periodontal sites were developed on the surface of extracted dental elements. No antimicrobial action of the 0.2% TC solution was observed on the ex vivo biofilms when used for one minute. When CT was used for twelve hours, its antimicrobial action was similar to that of CLX.

Keywords: biofilms; laboratory test; periodontal diseases; anti-infective agents.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Dentes fixados no anteparo plástico	16
Figura 2 Sistema BD GasPak EZ para estabelecimento da condição atmosférica de anaerobiose	18
Figura 3 Divisão dos grupos de amostras de biofilme em cada placa.....	19
Figura 5 Fluxograma da pesquisa	23
Figura 6. UFC resultantes de biofilmes formados em superfície dental (A) e no DBC (B).	25
Figura 7 Imagens microscópicas de varredura de biofilmes formados.....	26
Figura 8 UFC após testes com antimicrobianos.....	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Quantidade de UFC encontradas nos biofilmes cultivados em superfícies dentárias e de poliestireno e Média (\pm Desvio-padrão) entre os grupos.	24
Tabela 2. Percentual de oxido redução observado pelo teste TTC em cada um dos biofilmes cultivados e Média (\pm Desvio-padrão) entre os grupos.	24
Tabela 3. Contagem e Média \pm DP de UFC x 10 ² resultantes do biofilmes após exposição aos antimicrobianos nos dois tempos de avaliação	28
Tabela 4. % e Média \pm DP da atividade metabólica após exposição aos antimicrobianos nos diferentes tempos de exposição	30

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

BHI - Brain Heart Infusion Broth

BHD - Banco de Dentes Humanos

CLX - Clorexidina

CT - Cloramina-T

DBC - Dispositivo de Biofilme de Calgary

H₂O - Água

MO - Matriz Orgânica

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

PBS - Solução Salina Tamponada com Fosfato

PS - Profundidade de Sondagem

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TSA - Triptona de Soja

TTC – Cloreto de Trifeniltetrazólio

UFC - Unidades Formadoras de Colônias

μL - Microlitros

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 OBJETIVO	6
1.1.1 Objetivos específicos.....	6
1.2 JUSTIFICATIVA	7
2 MATERIAL E MÉTODOS	16
2.1 MODELO DE BIOFILME <i>EX VIVO</i>	16
2.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO	17
2.3 PREPARO DO INÓCULO	17
2.4 COLETA DA AMOSTRA DE BIOFILME DENTAL SUBGENGIVAL	17
2.5 MONTAGEM E CULTIVO DO BIOFILME	18
2.6 TESTES ANTIMICROBIANOS.....	19
2.7 CONTAGEM DE UNIDADE FORMADORA DE COLÔNIAS (UFC)	20
2.8 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	20
2.9 ATIVIDADE METABÓLICA DOS BIOFILMES.....	21
2.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	22
3 . RESULTADOS	24
3.1 CULTIVO DE BIOFILME <i>EX VIVO</i>	24
3.2 EFEITO DA CT SOBRE OS BIOFILMES <i>EX VIVO</i>	26
4 DISCUSSÃO	32
5 CONCLUSÃO	36
REFERÊNCIAS	37
1 ANEXO – TERMO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA ...	48
2 ANEXO – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)	52

1 INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença inflamatória crônica, associada a um biofilme disbiótico que resulta na perda progressiva dos tecidos de sustentação dentária. (Papapanou *et al.*, 2018). Essa condição pode permanecer estável ao longo do tempo ou ter períodos de exacerbação (Chapple *et al.*, 2018). Sua alta prevalência em países desenvolvidos e em desenvolvimento se associa a impactos estético e funcional, afetando pessoas de forma social e psicológica e ainda gera grandes custos de tratamento odontológico (Papapanou *et al.*, 2018). Dados atuais de um levantamento epidemiológico publicado pela Organização Mundial da Saúde (2022, p. 5, 37), abrangendo os anos de 1990 a 2019 em 130 países, mostraram o alarmante número de pessoas afetadas por doenças periodontais: cerca de 19% da população com mais de 15 anos, em números, mais de 1 bilhão de casos no mundo, impactando igualmente homens e mulheres. Dessa forma, estudos que colaborem para métodos de prevenção, diagnóstico e tratamento dessa doença são de grande relevância.

A extensão e severidade da gengivite e da periodontite podem ser agravadas por fatores de risco locais e ou sistêmicos (Chapple *et al.*, 2018). Fatores locais como apinhamento, anatomia dental, margens de restaurações subgengivais e fluxo salivar podem favorecer o acúmulo e/ou dificultar a remoção do biofilme (Lang; Kiel; Anderhalden, 1983; Mizutani *et al.*, 2014). Dentre os fatores sistêmicos ou modificadores, o tabagismo, diabetes mellitus não controlado ou distúrbios imunológicos, são algumas das condições que afetam o curso da doença (Jepsen *et al.*, 2018).

O biofilme dental na cavidade oral saudável colabora com o equilíbrio do ambiente (Lang; Bartold, 2018). No entanto, o acúmulo do biofilme dental sem uma devida desorganização periódica, pode levar a alterações no ambiente e favorecer o aumento em contagens e proporções de microrganismos periodontopatogênicos, tornando o biofilme disbiótico (Socransky; Haffajee, 2005). Essas alterações no ambiente podem ocorrer por resposta inflamatória exacerbada do hospedeiro, causando um aumento de citocinas pró-inflamatórias ou diferentes processos ainda pouco compreendidos do biofilme, que resulta no crescimento de componentes microbianos patogênicos (Lang; Bartold, 2018; Trombelli *et al.*, 2018).

Para casos avançados de periodontite, condutas previsíveis, como tratamentos periodontais cirúrgicos ou não cirúrgicos, podem não ser suficientes para reestabelecer a saúde periodontal. Nesses casos, o uso de terapias adjuvantes ao tratamento periodontal, como o uso de antimicrobianos locais e sistêmicos pode ser recomendado (Romito *et al.*, 2020).

O biofilme dental é uma estrutura não calcificada, dinâmica e complexa de microrganismos envolvidos por uma matriz orgânica (MO), entremeada por canais de água e aderida à superfície dental (Socransky; Haffajee, 2002). Essa MO é produzida pelos próprios microrganismos e favorece o crescimento bacteriano através de trocas metabólicas, processamento e absorção de nutrientes, e desenvolvimento de ambientes apropriados para os microrganismos (Overman; Rosen, 2000; Socransky; Haffajee, 2002; Saini R.; Saini S.; Sugandha, 2011). A MO funciona também como uma barreira de defesa aos agentes microbianos, retardando sua difusão (Costerton; Stewart; Greenberg, 1999) e os tornando pouco susceptíveis e mais resistentes a ataques do sistema imune (Donlan, 2002). Já os canais de água favorecem a entrada de nutrientes e a eliminação de resíduos do metabolismo microbiano, favorecendo dessa maneira o equilíbrio do ambiente (Socransky; Haffajee, 2002).

Para entender a complexidade dos biofilmes e como eles podem interagir com o ambiente, diferentes abordagens já foram realizadas por diferentes áreas de estudo, desde a investigação por biofilmes colonizadores de cateteres, próteses de quadril e lentes de contato até os colonizadores nos processos industriais, como tratamentos de esgoto (Socransky; Haffajee, 2002; Sanchez *et al.*, 2011). Esse conhecimento sobre o conceito de biofilme e seu desenvolvimento permitiu que muitas infecções crônicas da década de 1990 pudessem ser compreendidas quanto a sua etiologia e estratégias de tratamento, (Hall-Stoodley; Costerton, 2004; Coenye; Nelis, 2010), já que microrganismos organizados em estruturas de biofilme são mais resistentes do que em estado planctônico (Socransky; Haffajee, 2002).

Modelos de biofilmes *in vitro* vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de mimetizar as condições de crescimento presentes na cavidade oral, na tentativa de se entender melhor a interação e sucessão microbiana no desenvolvimento do biofilme e o papel de cada espécie no processo saúde-doença (Thurnheer; Bostanci; Belibasakis, 2014; Soares *et al.*, 2015). Esses modelos também buscam otimizar o desenvolvimento de produtos e protocolos de terapia com testes de alto rendimento

e sem o risco de causar danos a seres humanos (Coenye; Nelis, 2010; Arweiler; Ausschil; Sculean, 2017; Guzmán-Soto *et al.*, 2021). No entanto, os modelos de biofilme dental *in vitro* ainda apresentam pontos fracos, como condições de desenvolvimento pouco fiéis às *in vivo* e o número de microrganismos que são incluídos (Teles *et al.*, 2013). Desta forma, a busca por modelos ideais de biofilme continua sendo de grande relevância.

Devido ao importante papel do biofilme dental no processo de saúde e doença periodontal, o controle do biofilme supragengival continua sendo o principal mecanismo de prevenção e tratamento das doenças periodontais (Hancock, 1996; van der Weijden; Hioe, 2005). A instrução de higiene bucal, a motivação do indivíduo, o acesso ao conhecimento sobre a doença periodontal e a busca da autonomia do paciente para sua efetiva higiene bucal são abordagens atuais de prevenção (Romito *et al.*, 2020). O controle mecânico do biofilme dental, embora possa ser executado de forma simples e corriqueira pela maioria das pessoas, pode ter fatores dificultadores para sua realização, como falta de destreza motora, local apropriado e tempo (Quirynen *et al.*, 1995; Beals *et al.*, 2000; Greenstein, 2002; Greenstein; Nunn, 2004). Além disso, a escova dental tem uma boa ação em faces livres, mas não alcança regiões interproximais para higienização, sendo essencial o uso de fio dental ou escovas interdentais (Kinane, 1998). No entanto, o seu uso já não é tão predominante na população, como a escova dental convencional (Lang; Farghaly; Ronis, 1994). Desta forma, o controle químico do biofilme dental pode trazer vantagens e facilidades. Os antimicrobianos locais são utilizados de diferentes formas, como uso único antes do atendimento odontológico com o objetivo de diminuir a carga bacteriana em aerossóis gerados (Fine *et al.*, 1993), diminuir o risco de bacteremia (Brown *et al.*, 1998) e diminuir o risco de infecção após extrações (Worrall; Knibbs; Glenwright, 1987) ou em curto prazo para prevenção na formação de biofilme dentário após cirurgias periodontais (Sanz *et al.*, 2020). Também para situações quando o indivíduo não pode executar o controle mecânico, como pacientes em tratamento ortodôntico (Ristic *et al.*, 2007; Levin *et al.*, 2008), pacientes com deficiências físicas ou mentais (Storhaug, 1977) ou pacientes com aumento gengival dificultando a higienização (Saravia; Svirski; Friedman, 1990), o controle químico pode ser essencial para manter o equilíbrio do ambiente oral. Entre os produtos empregados para o controle químico do biofilme dental, o creme dental e os enxaguatórios bucais são mundialmente utilizados (FDI, 2002).

Os enxaguatórios bucais podem apresentar diversos mecanismos de ação, seja pela redução no número de microrganismos e ou afetando diretamente a qualidade do biofilme, como, prevenção da adesão bacteriana, interferência na coagregação ou modificação da patogenicidade (FDI, 2002). Herrera e colaboradores (2008) afirmam que os agentes antimicrobianos devem ter especificidade, com ação ampla contra bactérias, leveduras e fungos. Também se sugere que possuam eficácia, com propriedade antimicrobiana contra bactérias relacionadas à gengivite e periodontite (FDI, 2002). Além disso, a substantividade, ou seja, a duração da ação do agente químico, a segurança, com efeitos secundários mínimos, e a estabilidade, sem interferências na composição do produto em temperatura adequada num longo período (FDI, 2002).

Dentre as características apresentadas, a Clorexidina (CLX), do grupo dos antimicrobianos de uso oral, apresenta propriedades que a coloca em papel de destaque em relação aos outros agentes químicos. Foi usada pela primeira vez na Odontologia em 1959, para desinfecção da mucosa oral antes da administração de anestésicos locais (Haugen; Johansen, 1974). Possui uma efetividade no controle da placa e da gengivite, contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, leveduras e vírus (Wade; Addy, 1989). Com amplo espectro de ação, em concentrações mais baixas, age como um bacteriostático, aumentando a permeabilidade da membrana plasmática (Hugo; Longworth, 1964; Hugo; Longworth, 1965). Em concentrações mais altas, induz a desnaturação de proteínas no citoplasma, levando à morte celular (Hugo; Longworth, 1966). Suas moléculas também são adsorvidas à superfície do esmalte, inibindo a adesão bacteriana (Rolla; Melsen, 1975). A substantividade da CLX é de aproximadamente doze horas, e ocorre pela ligação de suas moléculas aos tecidos orais, causando liberação lenta na cavidade oral (Schiott *et al.*, 1970). Embora a CLX apresente superioridade em relação a outros produtos antimicrobianos disponíveis, efeitos colaterais associados ao uso devem ser considerados. Dentre eles, a alteração no paladar reversível para alimentos salgados e amargos, aumento na formação de cálculos dentais e manchamento nos dentes e língua (Yates *et al.*, 1993; Watts; Addy, 2001).

Diante do exposto, muitos outros produtos são avaliados quanto a sua capacidade de alterar o biofilme buscando o equilíbrio da microbiota oral.

A Cloramina-T (CT) é definida como um sal sintético e foi descrita pela primeira vez em meados de 1900, sendo um composto de cloro, solúvel em água e

sem ação corrosiva (Dakin; Cohen; Kenyon, 1916; Fursted; Hjort, Knudsen, 1997). Na literatura, é descrito como antibacteriano com poder de oxidação e cloração, utilizado na desinfecção da água (Arnitz; Nagl; Gottardi, 2009). Sabe-se que a sulfonamida, componente estrutural molecular da CT (Nayak *et al.*, 2022), tem como característica, retardar o crescimento bacteriano pela sua capacidade de competir e inibir a autoatividade de ácido fólico em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, conseqüentemente, a redução no crescimento bacteriano ocorre (Henry, 1943). Em diferentes composições, a CT também faz parte da formação de produtos com ação químico-mecânica para remoção de tecido cariado, apresentando propriedades bacteriostáticas e bactericidas (Miyage *et al.*, 2006). Entretanto, não há relatos de efeitos colaterais pelo uso prolongado do produto. Além de ser utilizada para desinfecção de dentes extraídos (Rolland, 2007). No âmbito de enxaguatórios bucais com efeito antimicrobiano, a CT foi classificada com forte efeito imediato e exerceu sustentação antimicrobiana de pelo menos uma hora após a aplicação (Pitten, Kramer, 1999). Fursted, Hjort e Knudsen (1997) conduziram um estudo sobre o tempo necessário para novo crescimento de nove bactérias após o uso de 5 antissépticos, incluindo a CT 0,2%, resultando no atraso de crescimento entre 0 e 5,7 horas, demonstrando pouca substantividade. Também testada *in vitro*, apresentou bons resultados antifúngicos, além de concluir que um dos mecanismos de ação pode relacionar-se com a parede celular do fungo (Rangel *et al.*, 2018).

Entretanto, faltam estudos sobre o efeito da CT sobre biofilmes periodontais.

1.1 OBJETIVO

Avaliar a ação antimicrobiana da CT sobre biofilmes periodontais *ex vivo*.

1.1.1 Objetivos específicos

Desenvolver um modelo de biofilme dental *ex vivo* em elementos dentários extraídos.

Testar a ação antimicrobiana da CT sobre biofilmes *ex vivo*.

Comparar a ação antimicrobiana da CT com a da CLX.

1.2 JUSTIFICATIVA

O biofilme dental é o agente causal primário das doenças periodontais. A terapia básica de todo tratamento periodontal é o controle de biofilme pelo paciente e pelo profissional, seja pelo método mecânico ou químico. No entanto, devido às dificuldades de acesso, informação e conscientização sobre as doenças periodontais, a periodontite ainda é uma das doenças mais prevalentes no ser humano.

Considerando a importância do entendimento sobre a morfologia, formação e resistência das bactérias à agentes antimicrobianos quando organizadas em uma estrutura de biofilme, que é a principal forma de colonização em infecções humanas crônicas, testar a ação de agentes químicos em biofilmes *ex vivo* torna-se necessário.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal do Paraná, CAAE 00.01021, parecer consubstanciado número 3.689.933.

2.1 MODELO DE BIOFILME *EX VIVO*

Foram utilizados dentes incisivos inferiores fornecidos pelo Biobanco de Dentes Humanos da Universidade Federal do Paraná (BDH-UFPR). Os dentes estavam íntegros, sem cáries, cálculo ou restaurações. O ápice das raízes foram cortados para que todos os dentes estivessem 10 mm de comprimento. Em seguida os dentes foram autoclavados a 121°C durante trinta minutos. Então foram fixados em anteparos plásticos com auxílio de pinça estéril e cola instantânea (Super Bonder®, Loctite, Brasil), como mostra a figura 1.

Figura 1 Dentes fixados no anteparo plástico



FONTE: O autor (2022)

2.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Amostras de biofilme deveriam ser coletadas de um indivíduo portador de periodontite estágio III ou IV generalizados, grau B ou C, que apresentasse pelo menos um sítio periodontal profundo ($PS \geq 6\text{mm}$). Como critérios de exclusão, foi definido o uso de antimicrobianos locais ou sistêmicos nos últimos 6 meses.

2.3 PREPARO DO INÓCULO

Para o preparo do inóculo, foram utilizadas amostras de biofilme dental subgingival coletadas em bolsas periodontais profundas.

A participante (SVS) recrutada para o estudo foi diagnosticada na Clínica de Periodontia da Universidade Federal do Paraná com Periodontite Estágio III Grau B com extensão generalizada. Após avaliação clínica e diagnóstico, a participante foi informada sobre existência da pesquisa e se houvesse interesse de participar, ela poderia informar no término do atendimento. Após expressar interesse em participar, a participante foi devidamente orientada sobre o estudo e objetivo. Ela leu e assinou o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), demonstrando compreensão dos procedimentos envolvidos e seus possíveis benefícios e riscos.

2.4 COLETA DA AMOSTRA DE BIOFILME DENTAL SUBGINGIVAL

No dia em que a paciente estava programada para iniciar o tratamento mecânico periodontal, foi realizada a coleta da amostra do biofilme. Essa coleta foi cuidadosamente conduzida, para não causar danos ou desconforto à paciente. Foram obtidas duas amostras de biofilme subgingival do dente 13 nas faces mesial e vestibular com cureta Gracey do tipo minifive 5-6 esterilizada e posicionada na porção mais apical do sítio e em um golpe único de raspagem no sentido ápico-coronal. As amostras foram imediatamente depositadas em tubos plásticos tipo microtubo com capacidade de 1,5 mililitros contendo em seu interior meio de cultura líquido BHI (Brain Heart Infusion Broth, Acumedia, Neogen Corporation) + 1% Hemina (Sigma-Aldrich) previamente reduzido em anaerobiose em condição

atmosférica de anaerobiose à 37°C. O tubo contendo as amostras foi agitado em agitador tipo Vórtex.

Em seguida, 750 µl do meio de cultura contendo as amostras de biofilme foram transferidos para reservatórios para soluções (Kasvi, Brasil) autoclavados, contendo 11,4 mililitros de meio de cultura líquido BHI + 1% Hemina. Acrescentou-se 5% de sangue de carneiro desfibrinado (Newprov, Brasil) para o completo preparo do inóculo. Todos os procedimentos foram feitos em duplicata.

2.5 MONTAGEM E CULTIVO DO BIOFILME

Alíquotas de 150 µl do inóculo preparado foram depositadas nos poços de placa de 96 poços. Concomitantemente ao experimento com superfície dental, preparou-se uma placa de 96 poços que foi utilizada para se obter o Dispositivo de Biofilme de Calgary (DBC). O DBC utiliza uma tampa contendo pinos de poliestireno (CERI *et al.*, 1999). As tampas com os dentes e com os pinos foram posicionadas e encaixadas nas placas de 96 poços contendo o inóculo bacteriano. Os dispositivos foram encubados em anaerobiose à 37°C durante 4 dias e então foram transferidos para novas placas contendo meio de cultura fresco e encubados por mais 3 dias. A condição de anaerobiose foi estabelecida com o uso do Sistema BD GasPak EZ (Becto Dickinson, Sparks, MD), como mostra a figura 2.

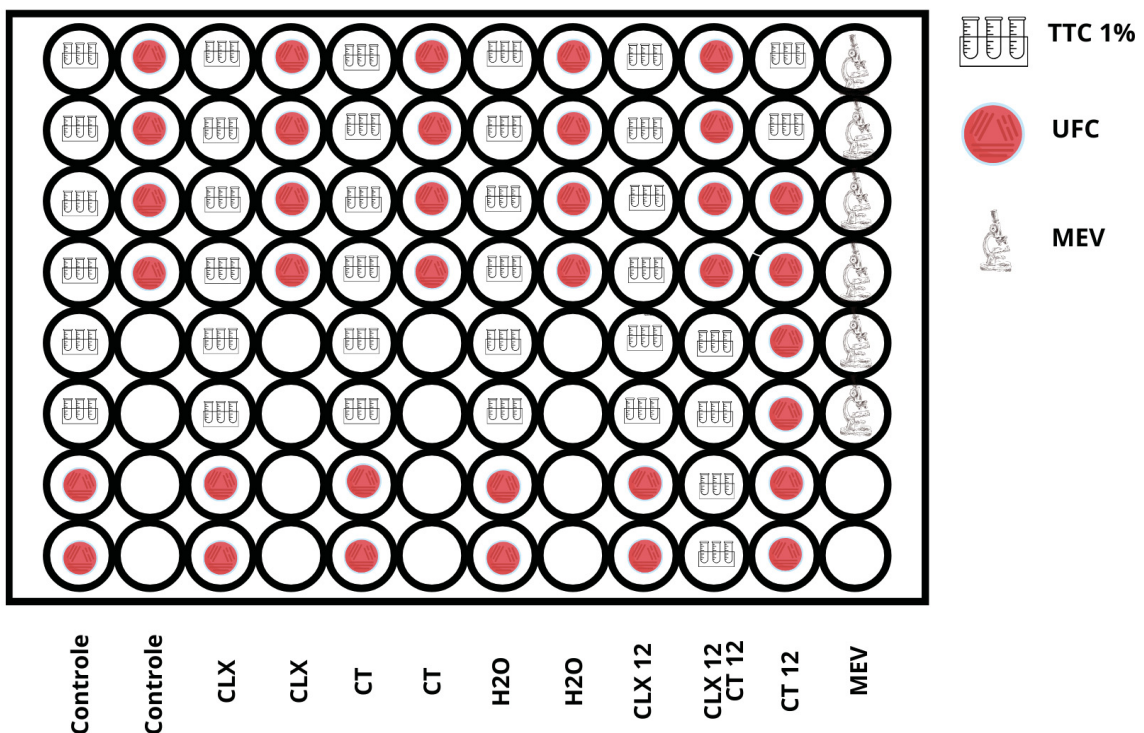
Figura 2 Sistema BD GasPak EZ para estabelecimento da condição atmosférica de anaerobiose



FONTE: O autor (2022).

Cada placa foi preparada de acordo com os grupos: Controle (n=12), Controle negativo com H₂O (n=12), CLX (n=12), CT (n=12), CLX 12 horas (n=12), CT 12 horas (n=12), sendo 6 amostras destinadas a Unidades Formadoras de Colônias (UFC) e 6 amostras para viabilidade celular pelo teste com Cloreto de Trifeniltetrazólio 1% (TTC). Foram também preparadas amostras para Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), (n=6). O esquema da placa pode ser visualizado na figura 3.

Figura 3 Divisão dos grupos de amostras de biofilme em cada placa



FONTE: O autor (2023)

2.6 TESTES ANTIMICROBIANOS

Os antimicrobianos utilizados neste estudo foram adquiridos comercialmente. A CT 0,2%, disponibilizada pela marca Trydal (Nanotecnologia Íons de Cloramina-T 0.2% + Oxigênio Livre e 250 ml de solução) e a CLX 0,12%, disponibilizada pela marca PerioGard Colgate (Clorexidina 0,12% sem álcool e com 250 ml de solução).

Após sete dias de cultivo em anaerobiose, os biofilmes foram mergulhados em solução tampão fosfato-salino (PBS) 10%. Em seguida, foram expostos às

soluções antimicrobianas. As placas de 96 poços foram preparadas com 150 µl em cada poço: CLX 0,12%, CT 0,2%, meio de cultura BHI + Hemina 1% para o controle negativo e água destilada autoclavada (H₂O) como placebo. Foram preparadas duas placas com os dentes e duas placas com os pinos para se fazer dois períodos de exposição aos antimicrobianos: um minuto e doze horas. Após os períodos de exposição, os dentes e pinos foram novamente submergidos em PBS e encaminhados para as análises.

Biofilmes dos pinos e dentes destinados à contagem de UFC foram transferidas para microtubos contendo 100 µl de BHI + Hemina.

Biofilmes destinados à análise de viabilidade celular foram transferidos para placas contendo a solução de TTC 1% com concentração de 20%.

Biofilmes destinados à análise morfológica foram fixados conforme descrito tópico 2.8.

2.7 CONTAGEM DE UNIDADE FORMADORA DE COLÔNIAS (UFC)

Para a avaliação das UFC após sete dias de cultivo, os biofilmes de cada dente ou pino foram individualmente raspados por um único operador treinado com auxílio de pinça anatômica estéril e curetas periodontais tipo Gracey 5/6. As amostras foram igualmente raspadas nas faces mesial, distal, vestibular e lingual. O conteúdo foi diluído seriadamente e dez µl de amostra na concentração inicial, 10⁻¹, 10⁻² e 10⁻³ foram semeadas em placas de ágar base Triptona de Soja (TSA) com 5% de sangue de carneiro (Laborclin, Brasil). As placas foram incubadas em anaerobiose, à 37°C, durante cinco dias para então se realizar a contagem de UFC crescidas. As colônias foram contadas com auxílio de um contador de colônias eletrônico e caneta marcadora.

2.8 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Para a análise MEV os dentes e pinos contendo os biofilmes foram mergulhadas em PBS 10%, em seguida fixados com cacodilato 0.1 m, paraformaldeído 3% e glutaraldeído 2,5%, sendo depositado 150 µl da solução nos poços de placas de 96 poços. Foram recobertas em papel alumínio e incubadas nas mesmas condições durante uma noite.

No dia seguinte, para a desidratação dos biofilmes os dentes e pinos foram novamente lavados duas vezes em PBS 10% e mergulhados em placas previamente preparadas com diferentes concentrações de álcool durante dez minutos cada, seguindo a ordem abaixo:

- A) dez minutos em álcool 50%
- B) dez minutos em álcool 70%
- C) dez minutos em álcool 80%
- D) dez minutos em álcool 95%
- E) dez minutos em álcool 100%

Para secagem, os dentes e pinos contendo os biofilmes foram transferidos para novas placas vazias, que foram recobertas em papel alumínio e incubadas por mais uma noite nas mesmas condições. Em seguida, foram posicionados em stubs e jateadas com ouro e então submetidas à análise em aparelho Microscópio Eletrônico de Varredura (TESCAN VEGA 3 LMU) e processadas (programa Mex da Alicona). Diferentes áreas cobertas pelo biofilme foram analisadas com aumentos de 3.000 e 10.000x.

2.9 ATIVIDADE METABÓLICA DOS BIOFILMES

O percentual redução da atividade metabólica dos biofilmes foi determinado usando Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (Dinâmica, Brasil) e espectrofotometria. O TTC é usado para diferenciar entre células metabolicamente ativas e inativas. O substrato branco/amarelado é enzimaticamente reduzido para vermelho 1,3,5-trifenilformazan (TFP) por células bacterianas vivas, pela atividade de desidrogenases. A mudança na cor do substrato é lida por espectrofotometria para determinar a taxa de redução, que é usada como uma medida indireta de atividade metabólica bacteriana. Para se medir a atividade metabólica dos biofilmes tanto os dentes quanto os pinos foram inicialmente mergulhados em PBS 10% e então transferidos para uma placa contendo 200 µl por poço de caldo BHI + 1% Hemina + 20% de solução de TTC a 1%, as placas foram recobertas em papel alumínio e incubadas novamente durante vinte e quatro horas, em anaerobiose a 37°C. A

conversão do TTC foi lida em 540 nm espectrofotômetro de microplacas Multiscan FC (Thermo Scientific).

2.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

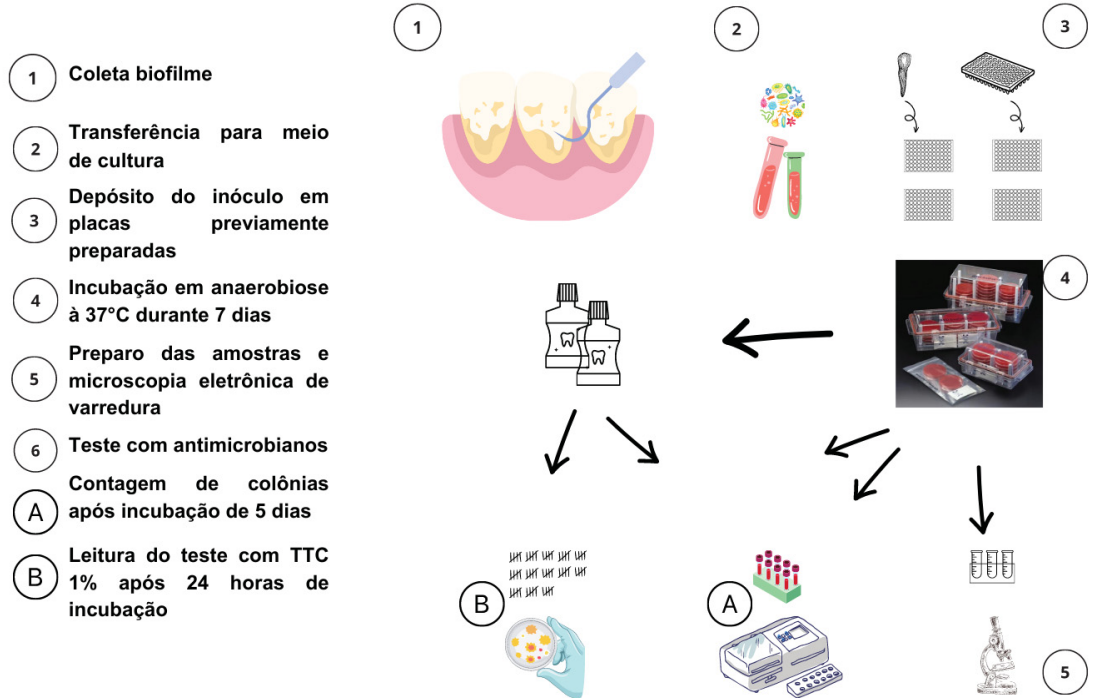
Para a análise das UFC, as colônias da primeira diluição -1 (1:10) foram utilizadas para o cálculo estatístico. Para a avaliação dos grupos destinados à viabilidade celular, a média dos valores observados nos poços com meio de cultura sem biofilme foi subtraída dos valores dos poços com biofilme. Esse valor final foi utilizado para cálculo da média e percentual de oxidação. Foi aplicado aos dados numéricos o nível de significância de 5%.

Para verificar a normalidade dos dados, o teste de Shapiro-Wilk foi feito. Na comparação das superfícies de crescimento (Grupos controle) entre biofilmes formados dentes e pinos de poliestireno, o teste T de Student foi aplicado. O teste ANOVA para dados paramétricos foi utilizado para avaliar a significância estatística entre grupos CLX, CT, H₂O, CLX doze horas e CT doze horas na mesma superfície e nas duas diferentes superfícies, com pós-teste de Tukey.

Todos os dados foram compilados em planilhas de Excel e analisados por meio do programa Jamovi Versão 2.4.8.

Na figura 4, as etapas descritas acima estão incorporadas em um fluxograma.

Figura 4 Fluxograma da pesquisa



Etapas de coleta, cultivo, testes e análises com as diferentes amostras – Fonte: O autor (2023)

3 . RESULTADOS

3.1 CULTIVO DE BIOFILME *EX VIVO*

Biofilmes cultivados em superfícies dentais e de poliestireno foram avaliados por quantidade de UFC, viabilidade celular e morfologia de crescimento.

A tabela 1 apresenta contagem de UFC em seis diferentes dentes e pinos.

Tabela 1 Quantidade de UFC encontradas nos biofilmes cultivados em superfícies dentárias e de poliestireno e Média (\pm Desvio-padrão) entre os grupos.

Dentes (n=6)	Pinos (n=6)	Teste T
422	370	
302	105	
205	402	
320	399	0,689
215	199	
348	182	
302 \pm 82,2	276 \pm 129	

A significância da diferença entre os grupos foi avaliada pelo teste T para amostras independentes. $p < 0,05$. Valores em negrito representam Média (Desvio-padrão) de cada grupo.

A atividade metabólica celular de cada biofilme cultivado foi avaliada por meio da conversão do TTC. Os dentes e pinos tiveram uma média de percentual de conversão de 84% e 82% respectivamente.

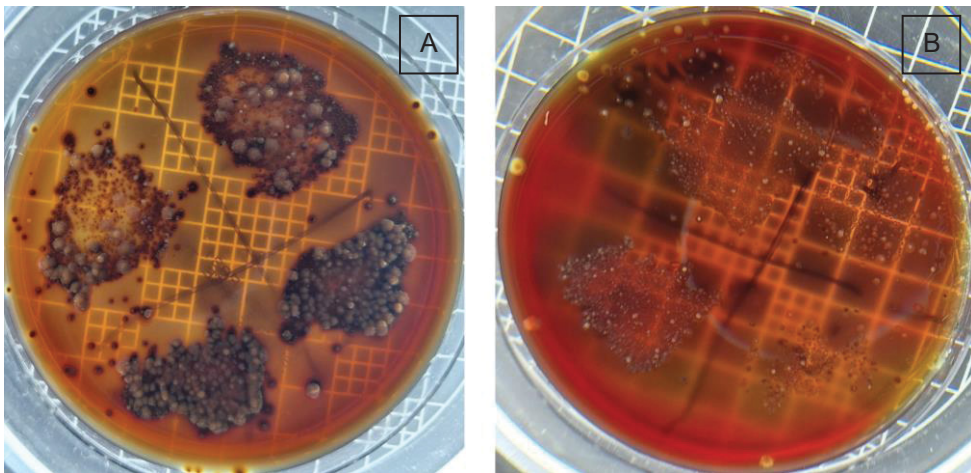
Tabela 2. Percentual de oxido redução observado pelo teste TTC em cada um dos biofilmes cultivados e Média (\pm Desvio-padrão) entre os grupos.

Dentes (n=6)	Pinos (n=6)	Teste T
78,61	81,24	
74,59	90,44	
90,75	75,36	
79,51	67,87	0,795
100	100	
81,52	79,39	
84 \pm 11	82 \pm 9	

% da atividade celular observada nos dois modelos de biofilme *in vitro*; $p < 0,05$.

A análise de UFC cultivadas após 5 dias de incubação indicou a presença de múltiplos tipos de colônias e extenso crescimento, o que impossibilitou a contagem de colônias individuais, tanto dos biofilmes extraídos dos dentes quanto dos pinos, conforme observado na figura 5A e 5B, respectivamente.

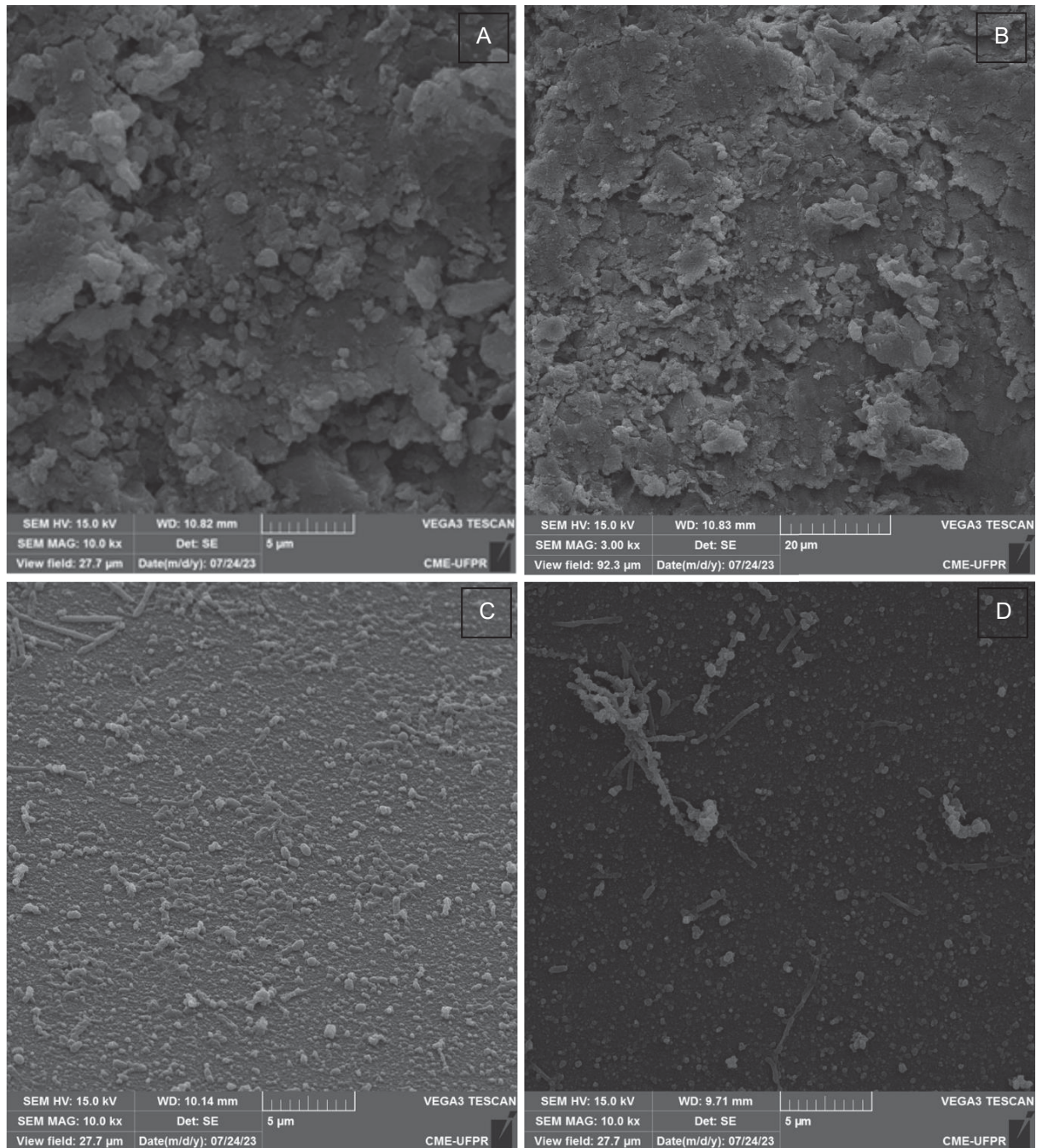
Figura 5. UFC resultantes de biofilmes formados em superfície dental (A) e no DBC (B).



FONTE: O autor (2023)

A densidade e complexidade dos biofilmes formados foram observadas por meio de imagens de eletro microscopia eletrônica de varredura. Imagens foram obtidas de seis biofilmes cultivados em superfícies dentárias e seis pinos. A figura 6 mostra imagens com aumento de 3000x e 10000x. Ambos crescerem em grande quantidade e os biofilmes formados na superfície dental foram mais densos do que os formados sobre a superfície de poliestireno.

Figura 6 Imagens microscópicas de varredura de biofilmes formados



Imagens de biofilmes extensos e densos com formação por toda a superfície dentária (A e B) e aumento de 3000x e 10000x; Imagens de biofilmes formados sobre toda a superfície de poliestireno, porém menos densos (C e D) e aumento de 10000x;

3.2 EFEITO DA CT SOBRE OS BIOFILMES *EX VIVO*

O efeito antimicrobiano da CT sobre os biofilmes foi avaliado após os tempos de exposição de um minuto e doze horas, por meio da quantidade de UFC e

percentual de atividade metabólica dos biofilmes. Como controle positivo foi avaliado o efeito da CLX 12% e como controle negativo usamos água destilada autoclavada.

A contagem e Média \pm DP de UFC $\times 10^2$ após exposição aos antimicrobianos e controle negativo está apresentada na tabela 3. Os biofilmes cultivado nos dentes e expostos durante um minuto à CLX 0,12%, CT e ao controle negativo resultou em um crescimento médio de 38×10^2 , 142×10^2 e 301×10^2 colônias respectivamente ($p < 0,05$). Quando o tempo de exposição aos antimicrobianos foi de doze horas em média se observou 31×10^2 e $34,5 \times 10^2$ UFC dos biofilmes expostos à CLX 0,12% e CT respectivamente ($p > 0,05$). Os biofilmes crescido em pinos sofreram ação semelhante, resultando em média $44,8 \times 10^2$, 136×10^2 e 290×10^2 UFC quando expostos um minuto à CLX, CT e o controle negativo, respectivamente ($p < 0,05$). Igualmente, quando pinos foram expostos doze horas à CLX e CT, foi quantificado em média $16,8 \times 10^2$ e $28,7 \times 10^2$ UFC respectivamente ($p > 0,05$). Quando comparado o efeito dos antimicrobianos / controle entre biofilme formados sobre os dentes e no DBC observou-se um maior efeito da CLX doze horas no DBC ($p < 0,05$) (Tabela 3).

Tabela 3. Contagem e Média \pm DP de UFC $\times 10^2$ resultantes do biofilmes após exposição aos antimicrobianos nos dois tempos de avaliação

	CT (n=6)	CLX (n=6)	H ₂ O (n=6)	CT 12 horas (n=6)	CLX 12 horas (n=6)	ANOVA
Dentes	125	24	480	49	32	<i>p</i> <0,001
	145	35	288	28	38	
	179	55	127	44	21	
	175	38	205	25	36	
	125	44	295	29	40	
	142	33	409	32	19	
	149 \pm 23,6^a	38,2 \pm 10,5^b	301 \pm 129^c	34,5 \pm 9,69^b	31 \pm 8,94^b	
DBC	101	33	202	37	28	<i>p</i> <0,001
	163	40	355	52	5	
	128	53	403	11	13	
	173	41	302	23	19	
	152	59	187	34	3	
	101	43	288	15	33	
	136 \pm 31,2^a	44,8 \pm 9,47^b	290 \pm 84,3^c	28,7 \pm 15,3^b	16,8 \pm 12,1^{b*}	

Diferença entre os antimicrobianos foi buscada pelo teste ANOVA e pós teste Tukey. Diferenças entre Dente e DBC foi buscada pelo teste One-Way ANOVA (Welch's). Significância foi estabelecida com $p < 0,05$. Letras diferentes significam diferenças estatisticamente significantes na horizontal, entre grupos de antimicrobianos; e * significa diferenças na vertical, entre Dentes e DBC. CT: cloramina T, CLX: clorexidina 0,12%, DBC de biofilme de Calgary.

Na figura 7, observa-se imagens das placas de Agar TSA sangue contendo as UFC resultantes dos biofilme após os testes antimicrobianos e incubação em anaerobiose durante cinco dias. As partes 7A e 7B, correspondem respectivamente à biofilmes expostos a CLX e CT, durante um minuto, respectivamente. Já, 7C é o resultado da exposição ao controle negativo, e as parte 7D e 7E corresponde à biofilmes expostos a CLX e CT durante doze horas. As placas estão divididas em quatro partes, correspondentes a: inóculo do biofilme raspado dos dentes e pinos, diluição de 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} . A atividade metabólica após exposição aos antimicrobianos foi avaliada pela conversão do TTC (Tabela 4). A CT demonstrou menor capacidade de reduzir a atividade metabólica dos biofilmes formados tanto nos dentes quanto no DBC quando comparada com a CLX, CLX doze horas ($p < 0,05$). Seu efeito sobre os biofilmes foi semelhante ao do controle negativo ($p > 0,05$). Quando utilizada por doze horas causou um efeito semelhante ao causado

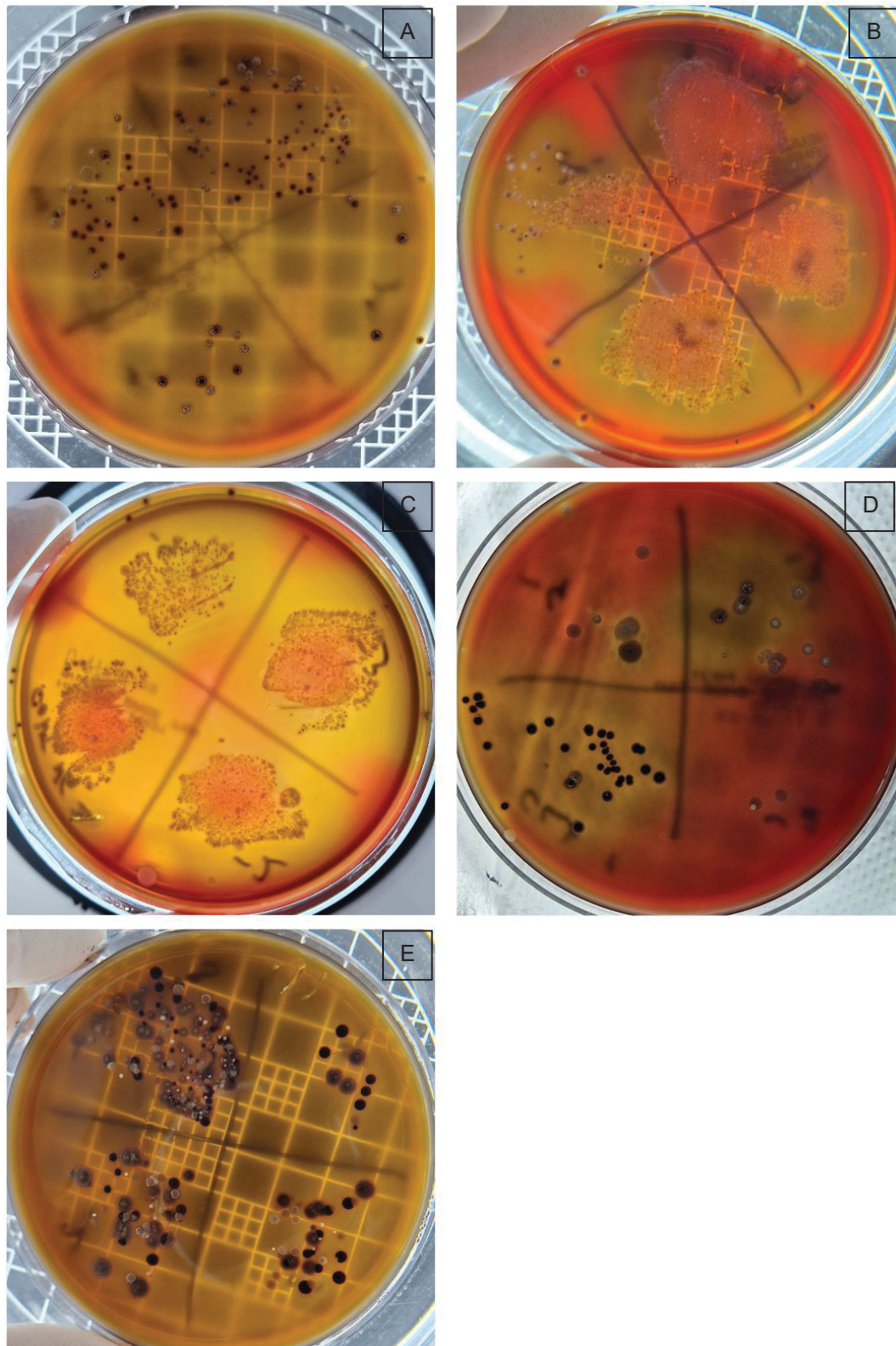
pela CLX e pela CLX doze horas ($p > 0,05$). Porém, no DBC não se observou diferença estatisticamente significativa entre usar a CT por um minuto ou por doze horas. Não se observou diferenças significativas entre os testes sobre os dentes quando comparados com o DBC.

Tabela 4. % e Média \pm DP da atividade metabólica após exposição aos antimicrobianos nos diferentes tempos de exposição

	C-T (n=6)	CLX (n=6)	H ₂ O (n=6)	CT 12 horas (n=6)	CLX 12 horas (n=6)	ANOVA
Dentes	93.03	25.99	77.92	22.50	22.87	<i>p</i> <0,001
	74.21	23.18	80.53	26.08	40.51	
	88.96	30.75	67.87	47.57	40.34	
	82.37	58.09	90.71	39.47	20.36	
	40.88	32.96	89.77	45.76	27.90	
	99.96	29.08	84.78	30.72	39.20	
	79.9\pm21.1^a	33.3\pm12.6^b	81.9\pm8.51^{ac}	35.4\pm10.5^b	31.9\pm9.27^b	
DBC	73.45	37.53	85.28	38.05	21.23	<i>p</i> <0,001
	30.89	27.74	82.91	32.14	22.84	
	93.92	26.34	86.92	47.53	26.07	
	61.22	22.89	66.75	45.11	30.11	
	73.67	23.89	87.97	32.88	18.14	
	7.76	19.52	70.42	79.00	23.66	
	56.8\pm31.7^a	26.3\pm6.19^b	80.0\pm9.11^{ac}	45.8\pm17.4^{ab}	23.7\pm4.11^b	

Diferença entre os antimicrobianos foi buscada pelo teste ANOVA e pós teste Tukey. Diferenças entre Dente e DBC foi buscada pelo teste One-Way ANOVA (Welch's)*. Significância foi estabelecida com $p < 0,05$. Letras diferentes significam diferenças estatisticamente significantes na horizontal, entre grupos de antimicrobianos. C-T: cloramina T, CLX: clorexidina 0,12%, DBC: dispositivo de biofilme de Calgary.

Figura 7 UFC após testes com antimicrobianos



Colônias crescidas após testes e incubação durante 5 dias. (A) UFC após testes com CLX durante um minuto; (B) UFC após testes com CT durante um minuto; (C) UFC após testes com H₂O durante um minuto; (D) UFC após testes com CLX durante doze horas; (E) UFC após testes com CT durante doze horas.

4 DISCUSSÃO

Um modelo de biofilme *ex vivo* que mimetiza as condições *in vivo* foi desenvolvido. O modelo desenvolvido apresenta diversas vantagens sobre outros modelos de biofilmes já descritos na literatura (Ceri *et al.*, 1999; Brito *et al.*, 2020; Guggenheim *et al.*, 2001), visto que o inóculo utilizado foi criado a partir de amostras de biofilme coletados subgengivalmente de sítios profundos de uma paciente com periodontite, garantindo que os biofilme tivessem origem patogênica. Além disso a partir de duas amostras de biofilme foram cultivados trezentos e quatro (setenta e seis poços em cada placa) biofilmes *ex vivo*, o que demonstra que a metodologia é de alto rendimento e permite diversas análises ao mesmo tempo. As condições oferecidas para o crescimento do biofilme foram definidas com o objetivo de se assemelhar ao ambiente subgengival, com baixas concentrações de oxigênio e uma nutrição mais proteolítica. Embora ainda não tenha sido avaliado o conteúdo microbiano dos biofilmes, as imagens de microscopia de varredura, mostraram biofilmes densos e com morfologia celular variada. Além disso a variabilidade de densidade entre biofilmes, observada por quantidade \pm DP de UFC foi menor do que observado nos biofilmes crescidos no DBC. As condições estabelecidas foram baseadas em estudo prévio (Soares *et al.*, 2015) que avaliou diversas variáveis como pH, superfície, nutrição, formas de estabelecer a condição atmosférica mais favorável e composição microbiana. Para o presente estudo etapas anteriores testaram o cultivo de biofilmes monoespécie na superfície dental com as espécies bacterianas *Escherichia coli* e *Aggregatibacter actinomycetenum* e ambas formaram biofilmes consistentes na superfície dos elementos dentários, sem que houvesse contaminação dos biofilmes, permitindo a implementação do modelo complexo a partir de amostras de biofilmes coletadas de sítios periodontais e testes de antimicrobianos sobre esse biofilmes complexos.

Estudos sugerem o preparo prévio da superfície que irá desenvolver o biofilme, como uso de enzimas semelhantes às observadas na saliva, uso de saliva natural ou artificial (Fine *et al.*, 1999; Guggenheim *et al.*, 2001). No presente estudo nenhum preparo prévio do elemento dentário foi realizado para o início da adesão celular bacteriana, por isso, é um facilitador da replicação em rotinas laboratoriais.

Alguns fatores ainda precisam ser avaliados, como a composição microbiana dos biofilmes formados, a similaridade da composição das amostras coletadas e as alterações em composição que os antimicrobianos causaram. No entanto, são etapas já previstas para serem feitas no futuro.

Estudos *in situ*, utilizando fragmentos de esmalte ou outros componentes fixados em aparelhos móveis são rotineiramente utilizados para testes com materiais restauradores ou enxaguatórios (Silva *et al.*, 2022), mas o uso do biofilme *ex vivo* sobre o elemento dentário como superfície para o cultivo *in vitro* ainda não havia sido testado. A vantagem de se utilizar a superfície dental *in vitro* quando comparada com testes *in situ* é a possibilidade e facilidade de controlar variáveis individuais que podem influenciar na formação dos biofilmes, como fatores nutricionais, imunológicos e hábitos (Socransky; Haffajee, 2002). Esse modelo de biofilme *ex vivo* inovador permite a análise detalhada e sistemática dos biofilmes e seus produtos sem a necessidade de múltiplas intervenções nos voluntários. Dessa forma, pode ser utilizado por diversos tipos de estudos futuros, desde estudos básicos sobre metabolismo, resposta celular e características do biofilme, como para testes de estratégias preventivas e terapêuticas.

O uso DBC para desenvolver os biofilmes nas mesmas condições dos biofilmes formados na superfície dental, foi uma forma de controle de eficiência do modelo, já que o uso do DBC já está bem estabelecido na literatura. Ceri e colaboradores (1999) propuseram essa tecnologia para testes de alto rendimento de antimicrobianos, que permite o crescimento de noventa e seis biofilmes ao mesmo tempo e possibilita comparar diferentes tempos, meios de cultura e a exposição a antibióticos em um único ensaio, tornando o processo simples, rápido e com mínima possibilidade de contaminação. Soares e colaboradores (2015) também cultivaram e testaram biofilmes polimicrobianos subgengivais com o DBC, além de diferentes antimicrobianos e tempos de exposição.

No presente estudo, os biofilmes desenvolvidos na superfície dentária e dos pinos tiveram um crescimento semelhante quando avaliados pela quantidade de UFC e atividade celular, porém quando observada a morfologia e arquitetura do biofilme, foram observados biofilmes mais uniformes e densos sobre a superfície dentária. Esse resultado provavelmente foi alcançado devido as propriedades físicas dos tecidos dentários, como a rugosidade da superfície, que interferem no crescimento das bactérias, sendo superior a colonização em superfícies mais

rugosas, inclusive para o biofilme subgengival (Socransky; Haffajee, 2002). Para análise dessa morfologia, a microscopia eletrônica de varredura foi essencial. A microscopia é muito utilizada para examinar células bacterianas dentro dos biofilmes, proporcionando imagens precisas com diferentes dimensões da estrutura e das propriedades formadas (Socransky; Haffajee, 2002).

O TTC, utilizado desde 1947, é um composto químico utilizado em testes de previsões celulares e de sementes, como um indicador de atividade metabólica e viável de células, sendo incolor em sua forma original e em contato com células ou tecidos metabolicamente ativos, sofre uma oxidação, convertendo-o em um composto vermelho (Mattson; Jensen; Holandês, 1947; Mello; Silva, 1955) que pode ser lido a olho nú ou por dispositivos leitores de placas. Além da interpretação visual, o leitor de microplacas identificou números expressivos nos poços contendo biofilmes quando comparados aos poços de meio de cultura sem microrganismos. A metodologia e o resultado corroboram com estudos em modelos de biofilme *in vitro* (Soares *et al* 2015), que por meio do sal redutor, conseguiram mensurar a viabilidade celular do biofilme formado e testado com diferentes concentrações de antimicrobianos.

A CT tem sua ação antimicrobiana demonstrada na literatura em diferentes condições, como desinfecção de próteses, efeito antifúngico, e em cremes dentais (Roselino *et al.*, 2015; Ferreira, 2015; Vinha, 2021). No presente estudo, a CT 0,2% obteve resultados inferiores à CLX 0,12% ($p < 0,05$) e semelhantes ao controle (H₂O destilada autoclavada) ($p > 0,05$) quando utilizada durante um minuto. Já quando utilizada por doze horas a CT apresentou resultados semelhantes à CLX e CLX doze horas ($p < 0,05$). Pitten e Kramer (1999) também compararam a ação antimicrobiana de soluções a base de CLX e CT com exposição de 30 segundos, e observam efeitos semelhantes entre elas e superiores à água estéril e chá de sálvia. Entretanto, o resultado apresentado foi com base em efeitos sobre bactérias aeróbias, em pacientes periodontalmente saudáveis e com concentração mais elevada do composto de CT (0,5%). Portanto, o desempenho superior da CT no estudo de Pitten e Kramer pode ser devido à maior concentração utilizada e menor complexidade dos biofilmes quando comparados com biofilmes de indivíduos com periodontite (Socransky; Haffajee 2002).

Sweet e colaboradores (1978) avaliaram o efeito da CT em uma concentração maior ainda, 1% também por 30 segundos e em associação a

profilaxia antibiótica, na incidência de bacteremia após extração dentária de terceiros molares. A incidência foi significativamente reduzida quando se comparou ao grupo controle, sem intervenção. Na bacteremia com risco de endocardite bacteriana, a predominância é de bactérias Gram-negativas (Sweet et al., 1978), portanto, o antisséptico pode ter contribuído na redução de tais espécies, quando usado em associação a antibióticos antes dos procedimentos.

A substantividade da CLX é considerada alta, podendo chegar até doze horas (Takenaka; Ohsumi; Noiri, 2019) e o mecanismo de ação é pela adsorção à película adquirida, proteínas salivares e à mucosa (Grenier, 1996). Já a substantividade da CT é pouco estudada, Ferreira *et al.*, (2015) demonstraram uma alta substantividade da CT quando avaliaram diferentes concentrações e tempos para ação sobre *Candida ssp.* A nossa avaliação da CT pela exposição prolongada de doze horas pode ser um precursor para análise da substantividade desse produto sobre biofilmes *ex vivo*, já que agentes químicos com boa substantividade são capazes de permanecer na cavidade oral por determinado tempo e proporcionar efeito antiplaca, como a CLX (Grenier, 1996). Além disso, esse estudo possibilita ideias para desenvolvimento de sistemas e dispositivos de liberação lenta da CT no tratamento adjuvante de bolsas periodontais, já que esses sistemas são capazes de alterar a microbiota subgingival (Steinberg *et al.*, 1990), podendo ser benéfico, visto que nenhum efeito colateral como manchamento e alteração de paladar, observados com o uso da CLX, são relatados na literatura com o uso da CT. Os efeitos antimicrobianos da CT são controversos, com alguns estudos demonstrando bons resultados e outros, a ausência de efeitos. Considerando a periodontite uma doença infecto inflamatória crônica, de alta incidência, que tem como o fator etiológico primário um biofilme disbiótico, a busca por métodos de prevenção e tratamento desse biofilme é de grande importância. Dessa forma, os efeitos observados sobre os biofilmes após exposição de doze horas da CT são animadores para estudos futuros.

Além disso, o modelo de biofilme *ex vivo* desenvolvido em superfície dentária demonstrou ótima eficiência para estudos futuros sobre microbioma oral e estratégias terapêuticas.

5 CONCLUSÃO

Biofilmes *ex vivo* densos e uniformes, cultivados a partir de amostras de biofilmes coletadas de sítios periodontais profundos foram desenvolvidos na superfície de elementos dentários extraídos.

Não foi observada ação antimicrobiana da solução de CT a 0,2% sobre os biofilmes *ex vivo* quando utilizada por um minuto.

Quando a CT foi utilizada por doze horas teve ação antimicrobiana semelhante à ação da CLX.

Os resultados desta pesquisa contribuem para o entendimento da ação antimicrobiana da CT e para estratégias de pesquisas sobre biofilmes, visto que não foram encontrados estudos na literatura sobre a ação da CT em biofilmes periodontais e nem o desenvolvimento de biofilmes *ex vivo* em superfícies dentárias.

REFERÊNCIAS

ARNITZ, R.; NAGL, M.; GOTTARDI, W. Microbicidal activity of monochloramine and chloramine T compared. **Journal of Hospital Infection**, v. 73, n. 2, p. 164-170, out. 2009.

ARWEILER, Nicole Birgit; AUSCHILL, Thorsten M.; SCULEAN, Anton. Patient self-care of periodontal pocket infections. **Periodontology 2000**, v. 76, n. 1, p. 164-179, dez. 2017.

BEALS, D.; NGO, T.; FENG, Y.; COOK, D.; GRAU, DG.; WEBER, DA.; Development and laboratory evaluation of a new toothbrush with a novel brush head design. **Am J Dent**. (Spec No):5A-14A. mar. 2000.

BESCOS, Raul; ASHWORTH, Ann; CUTLER, Craig; BROOKES, Zoe L; BELFIELD, Louise; RODILES, Ana; CASAS-AGUSTENCH, Patricia; FARNHAM, Garry; LIDDLE, Luke; BURLEIGH, Mia; WHITE, Desley; EASTON, Chris; HICKSON, Mary. Effects of Chlorhexidine mouthwash on the oral microbiome. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, mar. 2020.

BRITO, Arella Cristina Muniz; BEZERRA, I. M.; BORGES, M. H. de S.; SILVA, R. de O. da, GOMES FILHO, F. N., & ALMEIDA, L. de F. D. de Adesão de biofilmes monoespécie de *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* em diferentes superfícies de resinas compostas convencionais e bulk fill. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 49, 2020.

BROWN, Graig D; MEALEY, B.L.; NUMMIKOSKI, P.V.; BIFANO, S.L.; WALDROP, T.C.; Hydroxyapatite Cement Implant for Regeneration of Periodontal Osseous Defects in Humans. **Journal of Periodontology**, v. 69, n. 2, p. 146-157, fev. 1998.

CERI, H; OLSON, M. E.; STREMICK, C.; READ, R. R.; MORCK, D.; BURET, A. The Calgary Biofilm Device: New Technology for Rapid Determination of Antibiotic Susceptibilities of Bacterial Biofilms. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 6, p. 1771-1776, 1999.

CHAPPLE, Ian L. C.; MEALEY, Brian L.; Dyke, Thomas E. Van; Bartold, Mark; DOMMISCH, Henrik; EICKHOLZ, Peter; GEISINGER, Maria L.; GENCO, Robert J.; GLOGAUER, Michael; GOLDSTEIN, Moshe; GRIFFIN, Terrence J.; HOLMSTRUP, Palle; JOHNSON, Georgia K.; KAPILA, Yvonne; LANG, Niklaus P.; MEYLE, Joerg; MURAKAMI, Shinya; PLEMONS, Jacqueline; ROMITO, Giuseppe A. ; SHAPIRA, Lior; TATAKIS, Dimitris N.; TEUGHELIS, Wim ; TROMBELLI, Leonardo; WALTER, Clemens; WIMMER, Gernot; XENOUDI, Pinelopi; YOSHIE, Hiromasa. Periodontal health and gingival diseases and conditions on an intact and a reduced periodontium: Consensus report of workgroup 1 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions 2018. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 45, p. S68—S77, jun. 2018.

COENYE, Tom; NELIS, Hans J. In vitro and in vivo model systems to study microbial biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 83, n. 2, p. 89-105, nov. 2010.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P.S.; GREENBERG, E.P. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1318-1322, mai. 1999.

COTTRELL, Helen J. Tetrazolium Salt as a Seed Germination Indicator. **Annals of Applied Biology**, v. 35, n. 1, p. 123-131, mar. 1948.

DAKIN, H. D.; COHEN, J. B.; KENYON, J. STUDIES IN ANTISEPTICS (II): ON CHLORAMINE: ITS PREPARATION, PROPERTIES, AND USE. **BMJ**, v. 1, n. 2874, p. 160-162, 29 jan. 1916.

DONLAN, Rodney M. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 9, p. 881-890, set. 2002.

FDI Commission. Mouthrinses and periodontal disease. **International dental journal**, v. 52 p. 346-52. Out. 2002.

FERREIRA, Gabriela L. S. Atividade antifúngica, mecanismo de ação, citotoxicidade e ação antibiofilme da Cloramina T sobre *Candida* spp. **Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Federal da Paraíba**, João Pessoa, 56 f. 2015.

FINE, Daniel H. FURGANG, David; SCHREINER, Helen C; GONCHAROFF, Paul; CHARLESWORTH, Jon; GHAZWAN, Ghazi; FITZGERALD-BOCARSLY, Patricia; FIGURSKI, David H. Phenotypic variation in *Actinobacillus actionmycetemcomitans* during laboratory growth: implications for virulence. **Microbiology**, v. 145, n. 6, p. 1335-1347, 1 jun. 1999.

FINE, Daniel; YIP J.; FURGANG, D.; BARNETT, ML.; OLSHAN, A. M.; VINCENT, J., Reducing Bacteria in Dental Aerosols: Pre Procedural Use of an Antiseptic Mouthrinse. **The Journal of the American Dental Association**, v. 124, n. 5, p. 56-58, mai. 1993.

FUURSTED, K.; Hjort, A.; Knudsen, L.; Evaluation of bactericidal activity and lag of regrowth (postantibiotic effect) of five antiseptics on nine bacterial pathogens. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 40, n. 2, p. 221-226, ago. 1997.

GREENSTEIN, Gary. Full-Mouth Therapy Versus Individual Quadrant Root Planing: A Critical Commentary. **Journal of Periodontology**, v. 73, n. 7, p. 797-812, jul. 2002.

GREENSTEIN, Gary; NUNN, Martha E. A Method to Enhance Determining the Clinical Relevance of Periodontal Research Data: Number Needed to Treat (NNT). **Journal of Periodontology**, v. 75, n. 4, p. 620-624, abr. 2004.

GRENIER, Daniel. Effect of chlorhexidine on the adherence properties of *Porphyromonas gingivalis*. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 23, n. 2, p. 140-142, fev. 1996.

GUGGENHEIM, B.; GIERTSEN, E.; SCHÜPBACH, P.; SHAPIRO, S. Validation of an in vitro Biofilm Model of Supragingival Plaque. **Journal of Dental Research**, v. 80, n. 1, p. 363-370, jan. 2001.

GUZMÁN-SOTO, Irene; MCTIERNAN, Christopher; GONZALEZ-GOMEZ, Mayte; ROSS, Alex; GUPTA, Kashev; SUURONEN, Erik J.; MAH, Thien-Fah; GRIFFITH, May; ALARCON, Emilio I.; Mimicking biofilm formation and development: Recent progress in in vitro and in vivo biofilm models. **iScience**, v. 24, n. 5, p. 102443, mai. 2021.

HALL-STOODLEY, Luanne; COSTERTON, J. William; STOODLEY, Paul. Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious diseases. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 95-108, fev. 2004.

HANCOCK, Everett B. Prevention. **Annals of Periodontology**, v. 1, n. 1, p. 223-249, nov. 1996.

HAUGEN, E., JOHANSEN, J.R. Sensitization of guinea pigs with chlorhexidine. **Acta Odont Scand**, v.32, n.3, p.173-175, 1974.

HENRY, Richard J. THE MODE OF ACTION OF SULFONAMIDES
*. **Bacteriological Reviews**, v. 7, n. 4, p. 175-262, 1943.

HERRERA, David; ALONSO, Bettina; LEÓN, Rubén; ROLDÁN, Silvia; SANZ, Mariano. Antimicrobial therapy in periodontitis: the use of systemic antimicrobials against the subgingival biofilm. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 35, p. 45-66, set. 2008.

HUGO, W. B.; LONGWORTH, A. R. Cytological aspects of the mode of action of chlorhexidine diacetate. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 17, n. 1, p. 28-32, jan. 1965.

HUGO, W. B.; LONGWORTH, A. R. Some aspects of the mode of action of chlorhexidine. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 16, n. 10, p. 655-662, out. 1964.

HUGO, W. B.; LONGWORTH, A. R. The effect of chlorhexidine on the electrophoretic mobility, cytoplasmic constituents, dehydrogenase activity and cell

walls of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 18, n. 9, p. 569-578, set. 1966.

JEPSEN, Søren; CATON, Jack G.; ALBANDAR, Jasim M.; BISSADA, Nabil F.; BOUCHARD, Philippe; CORTELLINI, Pierpaolo; DEMIREL, Korkud; SANCTIS, Massimo de; ERCOLI, Carlo; FAN, Jingyuan; GEURS, Nicolaas C.; HUGHES, Francis J.; JIN, Lijian; KANTARCI, Alpdogan; LALLA, Evanthia; MADIANOS, Phoebus N.; MATTHEWS, Debora; MCGUIRE, Michael K.; MILLS, Michael P.; PRESHAW, Philip M.; REYNOLDS, SCULEAN, Mark A. Anton; SUSIN, Cristiano; WEST, Nicola X.; YAMAZAKI, Kazuhisa. Periodontal manifestations of systemic diseases and developmental and acquired conditions: Consensus report of workgroup 3 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 45, p. S219—S229, jun. 2018.

KINANE, D. F. Periodontal Diseases' Contributions to Cardiovascular Disease: An Overview of Potential Mechanisms. **Annals of Periodontology**, v. 3, n. 1, p. 142-150, jul. 1998.

LANG, Niklaus P.; BARTOLD, P. Mark. Periodontal health. **Journal of Periodontology**, v. 89, p. S9—S16, jun. 2018.

LANG, Niklaus P.; KIEL, Robert A.; ANDERHALDEN, Katharina. Clinical and microbiological effects of subgingival restorations with overhanging or clinically perfect margins. *Journal of Clinical Periodontology*, v. 10, n. 6, p. 563-578, dez. 1983.

LANG, W. Paul; FARGHALY, Mahassen M.; RONIS, David L. The relation of preventive dental behaviors to periodontal health status. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 21, n. 3, p. 194-198, mar. 1994.

LEVIN, Liran *et al.* Periodontal disease as a risk for dental implant failure over time: A long-term historical cohort study. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 38, n. 8, p. 732-737, jun. 2011.

LEVIN, Liran; OFEC, Ronen; GROSSMANN, Yoav; ANNER, Rachel. Periodontal disease as a risk for dental implant failure over time: A long-term historical cohort study. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 38, n. 8, p. 732-737, 2 jun. 2011b.

MATTSON, A. M.; JENSEN, C. O.; DUTCHER, R. A. Triphenyltetrazolium Chloride as a Dye for Vital Tissues. **Science**, v. 106, n. 2752, p. 294-295, 26 set. 1947.

MELLO, Milton Thiago de; SILVA, Niber Paz M. The use of triphenyltetrazolium chloride in the study of dehydrogenase activity of Brucellae. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 53, n. 1, p. 45-58, maio 1955.

MIYAGI, Sueli Patricia Harumi; MELLO, Isabel; BUSSADORI, Sandra Kalil; MARQUES, Márcia Martins. Resposta de fibroblastos pulpares humanos em cultura ao gel de papacárie / Response of cultured pulpal fibroblasts to papacárie gel. **Rev. odontol. Univ. Cid. São Paulo**; 18(3): 245-249, set.-dez. 2006.

MIZUTANI, Yutaka; TSUGE, S.; TAKEDA, H.; HASEGAWA, Y.; SHIOGAMA, K.; ONOUCHI, T.; INADA, K.; SAWASAKI, T.; TSUTSUMI, Y.. In situ visualization of plasma cells producing antibodies reactive to *P. orphyromonas gingivalis* in periodontitis: the application of the enzyme-labeled antigen method. **Molecular Oral Microbiology**, v. 29, n. 4, p. 156-173, mai. 2014.

NAYAK, Yogeesha N; GAONKAR, Santosh L.; SALEH, Ebraheem Abdu Musad; DAWSARI, Abdullah Mohammed A.L.; HARSHITHA; HUSAIN, Kakul; HASSAN, Ismail. Chloramine-T (N-chloro-p-toluenesulfonamide sodium salt), a versatile reagent in organic synthesis and analytical chemistry: An up to date review. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 26, n. 2, p. 101416, mar. 2022.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. World health statistics 2023: monitoring health for the SDGs, Sustainable Development Goals. **World Health Organization**. Pag. 5, 37; ISBN 978-92-4-007432-3 (electronic version) Mai. 2023.

OVERMAN, Larry E.; ROSEN, Mark D. Total Synthesis of (-)-Spirotryprostatin B and Three Stereoisomers. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 39, n. 24, p. 4596-4599, dez. 2000.

PAPAPANOU, Panos N.; SANZ, Mariano; BUDUNELI, Nurcan; DIETRICH, Thomas; FERES, Magda; FINE Daniel H.; FLEMMIG Thomas F.; GARCIA Raul; GIANNOBILE Willian V.; GRAZIANI, Filippo; GREENWELL, Henry; HERRERA, David; KAO, Richard T.; KEBSCHULL, Moritz; KINANE, Denis F.; KIRKWOOD, Keith L.; KOCHER, Thomas; KORNMAN, Kenneth S.; KUMAR, Purnima S.; LOOS, Bruno G.; MACHTEI, Eli; MENG, Huanxin; MOMBELLI, Andrea; , NEEDLEMAN, Ian; OFFENBACHER, Steven; SEYMOUR, Gregory J.; TELES, Ricardo; TONETTI, Maurizio S. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 89, p. S173—S182, jun. 2018.

PITTEN, F. A.; KRAMER, A. Antimicrobial efficacy of antiseptic mouthrinse solutions. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 55, n. 2, p. 95-100, abr. 1999.

QUIRYNEN, M.; BOLLEN, C. M.; VANDEKERCKHOVE, B. N.; DEKEYSER, C.; PAPAIOANNOU, W.; EYSSEN, H. Full- vs. Partial-mouth Disinfection in the Treatment of Periodontal Infections: Short-term Clinical and Microbiological Observations. **Journal of Dental Research**, v. 74, n. 8, p. 1459-1467, ago. 1995.

RANGEL, M.L.R.; VANDERLEI, J.M.T.M.M.; VANDERLEI, A.C.Q.; SANTOS, T.K.G.L.; CARLO, F.G.C.; CASTRO, R.D. Ação antifúngica da cloramina T em cepa de *Candida albicans*. **Revista Campo do Saber**, v. 4 n. 5 p. 47-69, nov. 2018.

RISTIC, M.; VLAHOVIC SVABIC, M.; SASIC, M.; ZELIC, O. Clinical and microbiological effects of fixed orthodontic appliances on periodontal tissues in adolescents. **Orthodontics & Craniofacial Research**, v. 10, n. 4, p. 187-195, nov. 2007.

RÖLLA, G.; MELSEN, B. On the Mechanism of the Plaque Inhibition by Chlorhexidine. **Journal of Dental Research**, v. 54, n. 2_suppl, p. 57-62, jun. 1975.

ROLLAND, S; CARRICK, Thomas E; WALLS, Angus W; MCCABE, John F. Dentin decontamination using chloramine T prior to experiments involving bacteria. **Dental Materials**, v. 23, n. 12, p. 1468-1472, dez. 2007.

ROMÁN C. C. A.; FAGUNDES LEITE V. M.; SILVA-LOVATO, C. H.; PIRES-DE-SOUZA, F. C.P.; HERRERA, B. et al. O papel da clorexidina no tratamento de pacientes com gengivite no Distrito de São Carlos do Jamari – RO. **Revista de Periodontia**, v.17, n.4, p.60-64, 2007

ROMITO, Giuseppe Alexandre; FERES, Magda; GAMONAL, Jorge; GOMEZ, Mariel; CARVAJAL, Paola; PANNUTI, Claudio; DUQUE, Duque Andres; ROMANELLI, Hugo; RÖSING, Cassiano Kuchenbecker; ARANGUIZ FREYHOFER, Vicente; CAVAGNI, Juliano; FISCHER, Ricardo Guimarães; FIGUEIREDO, Luciane; CARRER, Fernanda Campos de Almeida; MALHEIROS, Zilson; STEWART, Bernal; SANZ, Mariano; RYAN, Maria. Periodontal disease and its impact on general health in Latin America: LAOHA Consensus Meeting Report. **Brazilian Oral Research**, v. 34, suppl 1, 2020.

SAINI, Rajiv; SAINI, Santosh; SUGANDHA, RS. Periodontal disease: The sixth complication of diabetes. **Journal of Family and Community Medicine**, v. 18, n. 1, p. 31, 2011.

ROSELINO, Lourenço de Moraes Rego; ROMÁN C. C. A.; FAGUNDES LEITE V. M.; SILVA-LOVATO, C. H.; PIRES-DE-SOUZA, F. C.P.; Color stability and surface roughness of artificial teeth brushed with an experimental *Ricinus communis* toothpaste. **Brazilian Journal of Oral Sciences**, v. 14, n. 4, p. 267-271, dez. 2015.

SÁNCHEZ, G. A.; MIOZZA, V.; DELGADO, A.; BUSCH, L. Determination of salivary levels of mucin and amylase in chronic periodontitis patients. **Journal of Periodontal Research**, v. 46, n. 2, p. 221-227, dez. 2010.

SANZ, Mariano; HERRERA, David; KEBSCHULL, Moritz; CHAPPLE, Ian; JEPSEN, Søren; BEGLUNDH, Tord; SCULEAN, Anton; TONETTI, Maurizio S.; EFP Workshop Participants and Methodological Consultants. Treatment of stage I–III periodontitis—

The EFP S3 level clinical practice guideline. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 47, S22, p. 4-60, jul. 2020.

SARAVIA, M. E.; SVIRSKY, J. A.; FRIEDMAN, R. Chlorhexidine as an oral hygiene adjunct for cyclosporine-induced gingival hyperplasia. **ASDC journal of dentistry for children**, v.5 p. 366–370, set. 1990.

SCHIOTT, C. R.; LÖE, H.; JENSEN, S. B.; KILIAN, M.; DAVIES, R. M.; GLAVIND, K. The effect of chlorhexidine mouthrinses on the human oral flora. **Journal of Periodontal Research**, v. 5, n. 2, p. 84-89, abr. 1970.

SILVA, Rossano V. D. R.; JARROS, I. C.; DEL BEL CURY, A. A.; SIDHU, S. K.; SILVA, S.; NEGRI, M. F. N.; PASCOTTO, R. C. Evaluation of biofilm formation on acrylic resin surfaces coated with silicon dioxide: an *in situ* study. **Brazilian Oral Research**, v. 36, 2022.

SOARES, Geisla M. S.; TELES, F.; STARR, J. R.; FERES, M.; PATEL, M.; MARTIN, L.; TELES, R.; Effects of Azithromycin, Metronidazole, Amoxicillin, and Metronidazole plus Amoxicillin on an *In Vitro* Polymicrobial Subgingival Biofilm Model. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 5, p. 2791-2798, 2 mar. 2015.

SOCRANSKY, Sigmund S.; HAFFAJEE, Anne D. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. **Periodontology 2000**, v. 28, n. 1, p. 12-55, jan. 2002.

SOCRANSKY, Sigmund S.; HAFFAJEE, Anne D. Periodontal microbial ecology. **Periodontology 2000**, v. 38, n. 1, p. 135-187, jun. 2005.

STEINBERG, D.; FRIEDMAN, M.; SOSKOLNE, A.; SELA MN. A New Degradable Controlled Release Device for Treatment of Periodontal Disease: *In Vitro* Release Study. **Journal of Periodontology**, v. 61, n. 7, p. 393-398, jul. 1990.

STORHAUG, K. Hibitane in oral disease in handicapped patients. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 4, n. 5, p. 102-107, dez. 1977.

SUPRANOTO, SC; SLOT, D. E.; ADDY, M.; VAN DER WEIJDEN, G. A. The effect of chlorhexidine dentifrice or gel versus chlorhexidine mouthwash on plaque, gingivitis, bleeding and tooth discoloration: a systematic review. **International Journal of Dental Hygiene**, v. 13, n. 2, p. 83-92, 24 jul. 2014.

SWEET, James B.; BUTLER, Donald P. Predisposing and operative factors: Effect on the incidence of localized osteitis in mandibular third-molar surgery. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology**, v. 46, n. 2, p. 206-215, ago. 1978.

SWEET, James B.; Gill, V. J.; Chusid, M. J., Elin, R. J. Nitroblue tetrazolium and Limulus assays for bacteremia after dental extraction: effect of topical antiseptics. **The Journal of the American Dental Association**, v. 96, n. 2, p. 276-281, fev. 1978.

TAKENAKA, Shoji; OHSUMI, Tatsuya; NOIRI, Yuichiro. Evidence-based strategy for dental biofilms: Current evidence of mouthwashes on dental biofilm and gingivitis. **Japanese Dental Science Review**, v. 55, n. 1, p. 33-40, nov. 2019.

TELES, Ricardo; TELES, Flavia; FRIAS-LOPEZ, Jorge; PASTER, Bruce; Haffajee, Anne. Lessons learned and unlearned in periodontal microbiology. **Periodontology 2000**, v. 62, n. 1, p. 95-162, 11 abr. 2013.

THURNHEER, T.; BOSTANCI, N.; BELIBASAKIS, G. N. Microbial dynamics during conversion from supragingival to subgingival biofilms in an in vitro model. **Molecular Oral Microbiology**, v. 31, n. 2, p. 125-135, 2 jul. 2015.

TROMBELLI, Leonardo; FARINA, Roberto; SILVA, Cleverton O.; TANAKIS, Dimitris N.; Plaque-induced gingivitis: Case definition and diagnostic considerations. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 45, p. S44—S67, jun. 2018.

VAN DER WEIJDEN, G. A.; HIOE, K. P. K. A systematic review of the effectiveness of self-performed mechanical plaque removal in adults with gingivitis using a manual toothbrush. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 32, s6, p. 214-228, out. 2005.

VINHA, Thais da Costa. Efeitos dos métodos de higienização mecânicos e químicos na cápsula de o'ring de overdenture. 2021. **Dissertação Mestrado Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto**, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

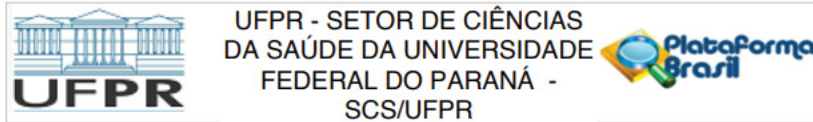
WADE, W. G.; ADDY, M. In vitro Activity of a Chlorhexidine–Containing Mouthwash Against Subgingival Bacteria. **Journal of Periodontology**, v. 60, n. 9, p. 521-525, set. 1989.

WATTS, A.; ADDY, M. Tooth discolouration and staining: a review of the literature. **British Dental Journal**, v. 190, n. 6, p. 309-316, mar. 2001.

WORRALL, S. F.; KNIBBS, P. J.; GLENWRIGHT, H. D. Methods of reducing bacterial contamination of the atmosphere arising from use of an air-polisher. **British Dental Journal**, v. 163, n. 4, p. 118-119, ago. 1987.

YATES, R.; JENKINS, S.; NEWCOMBE, R.; WADE, W.; MORAN, J.; ADDY, M. A 6-month home usage trial of a 1% chlorhexidine toothpaste. (I). Effects on plaque, gingivitis, calculus and toothstaining. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 20, n. 2, p. 130-138, fev. 1993.

1 ANEXO – TERMO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Caracterização microbiológica e morfológica de um modelo de biofilme dental estabelecido em superfície dental in vitro

Pesquisador: Geisla Mary Silva Soares

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 22872719.0.0000.0102

Instituição Proponente: Departamento de Estomatologia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.689.933

Apresentação do Projeto:

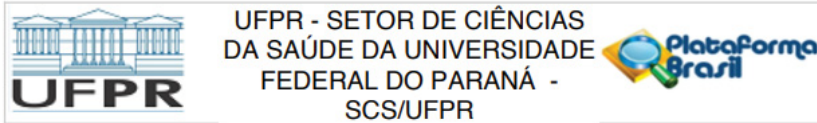
Trata-se de projeto de pesquisa de título "Caracterização microbiológica e morfológica de um modelo de biofilme dental estabelecido em superfície dental in vitro" encaminhado pelo Departamento de Estomatologia sob responsabilidade da Profa. Geisla Mary Silva Soares e colaboração de Isabela Brito dos Santos e João Gabriel Gava Sauchuk.

Trata-se de estudo in vitro realizado utilizando-se dentes obtidos no Banco de Dentes Humanos da UFPR, que serão fixados em tampas de placas de 24 poços e expostos a inóculos bacterianos. Os dentes permanecerão na placa expostos ao inóculo durante diferentes períodos de tempo, e amostras serão retiradas para análises. Os dentes com biofilme desenvolvido serão expostos a antimicrobianos para se testar a capacidade protetiva do biofilme. O estudo é composto de 3 fases, sendo que nas duas primeiras serão utilizados dentes humanos extraídos e cepas de estoque, e na fase 3 serão utilizados dentes humanos extraídos e bactérias removidas de bolsa periodontal de um pacientes em atendimento na disciplina de Periodontia da UFPR.

Objetivo da Pesquisa:

"Estabelecer um modelo de biofilme formado por bactérias orais em superfície de dente extraído e avaliar suas características fisiológicas e morfológicas, além dos efeitos de antimicrobianos orais sobre esse modelo de biofilme."

Endereço: Rua Padre Camargo, 285 - 1º andar
Bairro: Alto da Glória **CEP:** 80.060-240
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3360-7259 **E-mail:** cometica.saude@ufpr.br



Continuação do Parecer: 3.689.933

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

De acordo com os pesquisadores: "Não prevemos riscos diretos aos pacientes que doaram os dentes, vistos que os dentes que serão utilizados são dentes já doados e catalogados no banco de dentes.

O risco previsto para o paciente doador da amostra de biofilme é mínimo, já que a coleta da amostra não é um procedimento invasivo, normalmente a sensibilidade é mínima, não há necessidade de anestesia e será realizada durante um atendimento que já esteja sendo realizado na clínica da disciplina de periodontia II.

Existe pequeno risco de se usar dentes do Banco de Dentes Humanos da UFPR e não se obter o resultado esperado no estudo, porém, é um risco mínimo, visto que, o modelo de biofilme a ser utilizado já é conhecido e estudado.

Os benefícios esperados para os pacientes doadores dos dentes utilizados são indiretos, já que os resultados do presente estudo poderão colaborar para o conhecimento sobre as bactérias relacionadas tanto com saúde quanto com doenças bucais, como periodontite, gengivite e cáries. Esse conhecimento portanto, contribuirá para desenvolvimento de melhores estratégias de tratamento e prevenção dessas condições."

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de pesquisa em vitro com metodologia detalhada e objetivos bem delineados. Os dentes serão obtidos no Banco de Dentes Humanos da UFPR e a amostra biológica bacteriana será removida de um paciente já em atendimento na Universidade.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram apresentados.

Recomendações:

Não há.

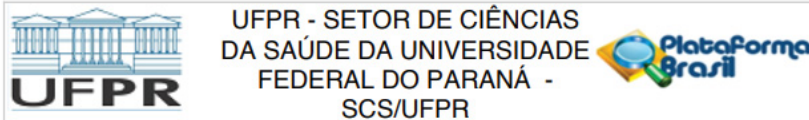
Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

De acordo com o projeto e documentos apresentados, o parecer é favorável à aprovação.

- É obrigatório retirar na secretaria do CEP/SD uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido com carimbo onde constará data de aprovação por este CEP/SD, sendo este modelo reproduzido para aplicar junto ao participante da pesquisa.

*Em caso de projetos com Coparticipantes que possuam Comitês de Ética, seu TCLE somente será

Endereço: Rua Padre Camargo, 285 - 1º andar	CEP: 80.060-240
Bairro: Alto da Glória	
UF: PR	Município: CURITIBA
Telefone: (41)3360-7259	E-mail: cometica.saude@ufpr.br



Continuação do Parecer: 3.689.933

liberado após aprovação destas instituições.

O TCLE deverá conter duas vias, uma ficará com o pesquisador e uma cópia ficará com o participante da pesquisa (Carta Circular nº. 003/2011 CONEP/CNS).

Favor agendar a retirada do TCLE pelo telefone 41-3360-7259 ou por e-mail cometica.saude@ufpr.br, necessário informar o CAAE.

Considerações Finais a critério do CEP:

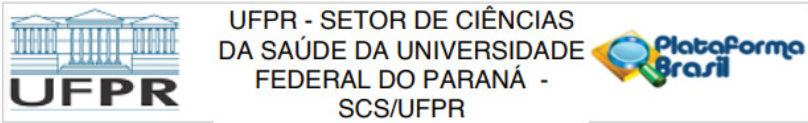
Solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios semestrais e final, sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos, através da Plataforma Brasil - no modo: NOTIFICAÇÃO. Demais alterações e prorrogação de prazo devem ser enviadas no modo EMENDA. Lembrando que o cronograma de execução da pesquisa deve ser atualizado no sistema Plataforma Brasil antes de enviar solicitação de prorrogação de prazo.

Emenda – ver modelo de carta em nossa página: www.cometica.ufpr.br (obrigatório envio)

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1426926.pdf	04/10/2019 19:41:51		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.doc	04/10/2019 19:41:23	Geisla Mary Silva Soares	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoDetalhadoIsabelaCEP.docx	04/10/2019 19:40:28	Geisla Mary Silva Soares	Aceito
Outros	DeclaracaoCompromissoDaEquipe.pdf	04/10/2019 18:54:01	Geisla Mary Silva Soares	Aceito
Outros	TermoDeCompromissoParaUtilizacaoDadados.pdf	04/10/2019 18:53:11	Geisla Mary Silva Soares	Aceito
Outros	TermoDeGuardaDeMaterialBiologico2.pdf	04/10/2019 18:51:48	Geisla Mary Silva Soares	Aceito
Folha de Rosto	FolhaRosto.pdf	01/10/2019 17:28:53	Geisla Mary Silva Soares	Aceito
Outros	AutorizacaoManipulacaoDados.pdf	01/10/2019 16:57:03	Geisla Mary Silva Soares	Aceito

Endereço: Rua Padre Camargo, 285 - 1º andar
 Bairro: Alto da Glória CEP: 80.060-240
 UF: PR Município: CURITIBA
 Telefone: (41)3360-7259 E-mail: cometica.saude@ufpr.br



Continuação do Parecer: 3.689.933

Outros	AnaliseDoMeritoCienitfico.pdf	01/10/2019 16:56:38	Geisla Mary Silva Soares	Aceito
Outros	ConcordanciaLaboratorio.pdf	01/10/2019 16:54:29	Geisla Mary Silva Soares	Aceito
Outros	ConcordanciaCurso.pdf	01/10/2019 16:54:09	Geisla Mary Silva Soares	Aceito
Outros	ConcordanciaBancoDeDentes.pdf	01/10/2019 16:53:52	Geisla Mary Silva Soares	Aceito
Outros	ExtratoDeAta.pdf	01/10/2019 16:53:30	Geisla Mary Silva Soares	Aceito
Outros	CartaDeEncaminhamento.pdf	01/10/2019 16:39:18	Geisla Mary Silva Soares	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CURITIBA, 07 de Novembro de 2019

Assinado por:
Ilana Kassouf Silva
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Padre Camargo, 285 - 1º andar
Bairro: Alto da Glória **CEP:** 80.060-240
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3360-7259 **E-mail:** cometica.saude@ufpr.br

2 ANEXO – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nós Prof^ª. Dr^ª. Geisla Mary Silva Soares, e os alunos de graduação Isabela Brito dos Santos e João Gabriel Gava Sauchuk estamos convidando o(a) senhor(a), paciente em tratamento na Disciplina de Periodontia II do Curso de Odontologia da Universidade Federal do Paraná, a participar de um estudo intitulado **Caracterização fisiológica e morfológica de um modelo de biofilme dental estabelecido em superfície dentária *in vitro***. Este estudo estabelecer um biofilme dental em laboratório para através dele poder estudar as características do biofilme dental. Biofilme dental é o nome dado para a placa bacteriana dental.

- a) O objetivo desta pesquisa avaliar as características dos biofilmes, como eles se formam, as bactérias que conseguem se desenvolver no biofilme e como os biofilmes são afetadas pela ação de antimicrobianos.
- b) Caso você participe da pesquisa, será realizada a coleta de uma mostra de biofilme subgingival (de dentro da gengiva) em uma região que estiver sendo realizado tratamento periodontal.
- c) Para coleta dessa amostra não será necessário anestesia, será inserido um instrumento igual ao usado para a remoção do cálculo (tártaro) até no fundo da gengiva e removido. O material que vier na cureta é amostra que estará sendo doada. Isso levará aproximadamente 5 minutos.
- d) É possível que o(a) senhor(a) sinta algum desconforto, principalmente relacionado a coleta de amostras. Porém é considerado um desconforto leve e somente no momento da coleta.
- e) Os riscos relacionados ao estudo são considerados mínimos, porque a sua participação será apenas para a coleta desta amostra.
- f) Os benefícios previstos para o participante do estudo será indireto, já que contribuirá para o melhor entendimento das doenças periodontais.

Rubricas:

Participante da Pesquisa e /ou responsável leg. _____
Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE _____

Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Setor de Ciências da Saúde da UFPR | CEP/SD Rua Padre Camargo, 285 | térreo | Alto da Glória | Curitiba/PR | CEP 80060-240 | cometica.saude@ufpr.br - telefone (041) 3360-7259

g) Os pesquisadores responsáveis por este estudo Prof^ª. Dr^ª. Geisla Mary Silva Soares Isabela Brito dos Santos e João Gabriel Gava Sauchuk poderão ser localizados no endereço Av Pref. Lothário Meissner, 632, CEP 80210-170, Curitiba, Paraná, Brasil, no prédio do Curso de Odontologia da Universidade Federal do Paraná, Sala da Disciplina de Periodontia, em horário comercial das 8:00h até às 17:00h, pelos emails geisla.soares@ufpr.br, isabelabrito612@gmail.com, joaogava@gmail.com e no telefone (41) 3360-4032, para esclarecer eventuais dúvidas que o(a) senhor(a) possa ter e fornecer-lhe as informações que queira, antes, durante ou depois de encerrado o estudo.

j) A sua participação neste estudo é voluntária e se o(a) senhor(a) não quiser mais fazer parte da pesquisa poderá desistir a qualquer momento e solicitar que lhe devolvam este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinado.

k) As informações relacionadas ao estudo poderão ser conhecidas somente por pessoas autorizadas, como o coordenador do estudo. No entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob forma codificada, para que a **sua identidade seja preservada e mantida sua confidencialidade**.

l) As amostras serão utilizadas unicamente para essa pesquisa e serão destruídos/descartados (amostras serão descartadas em lixo biológico e todo material em papel será triturado antes de descartado em lixo comum) ao término do estudo.

m) Não estão previstas quaisquer despesas necessárias para a realização da pesquisa e o(a) senhor(a) não receberá qualquer valor em dinheiro pela sua participação.

o) Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código.

p) Se você tiver dúvidas sobre seus direitos como participante de pesquisa, você pode contatar também o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP/SD) do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, pelo telefone 3360-7259.

Eu, [REDACTED] li esse Termo de Consentimento e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual concordei em participar. A explicação que recebi me informou sobre os riscos e benefícios. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem qualquer prejuízo para mim e sem que esta decisão afete meu tratamento e/ou Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Setor de Ciências da Saúde da UFPR | CEP/SD Rua Padre Camargo, 285 | térreo | Alto da Glória | Curitiba/PR | CEP 80060-240 | cometica.saude@ufpr.br - telefone (041) 3360-7259

atendimento.

Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo.

Curitiba, 12 de fevereiro de 2023


Assinatura do Participante de Pesquisa ou Responsável Legal

Profª. Drª. Geisla Mary Silva Soares

Isabela Brito dos Santos

João Gabriel Gava Sauchuk