



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO DENTÍSTICA

FABIANO GERONASSO SIMÕES, CD, MSc

**Avaliação *in situ* da eficácia de enxagatários bucais
no controle de PL-biofilme**

Curitiba
2016

FABIANO GERONASSO SIMÕES, CD, MSc

**Avaliação *in situ* da eficácia de enxaguatórios bucais
no controle de PL-biofilme**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Odontologia, Área de Concentração em Dentística.

Orientador:

Prof. Dr. Edvaldo Antonio Ribeiro Rosa, BPharm, MSc, PhD.

**Curitiba
2016**

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central
Luci Eduarda Wielganczuk – CRB 9/1118

S593a
2016 Simões, Fabiano Geronasso
Avaliação *in situ* da eficácia de enxaguatórios bucais no controle de
PL-biofilme / Fabiano Geronasso Simões ; orientador: Edvaldo Antonio
Ribeiro Rosa. – 2016.
47 f. : il. ; 30 cm

Tese (doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba,
2016
Bibliografia: f. 33-44

1. Odontologia. 2. Antissépticos bucais. 3. Placas dentárias. 4. Biofilmes.
I. Rosa, Edvaldo Antonio Ribeiro. II. Pontifícia Universidade Católica do
Paraná. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. III. Título.

CDD 20. ed. – 617.6



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Escola Saúde e Biociências
Programa de Pós-Graduação em Odontologia


TERMO DE APROVAÇÃO

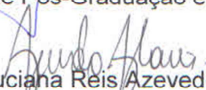
FABIANO GERONASSO SIMÕES

AVALIAÇÃO *IN SITU* DA EFICÁCIA DE ENXAGUATÓRIOS BUCAIS NO CONTROLE DE PL-BIOFILME


Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como parte dos requisitos parciais para a obtenção do Título de **Doutor em Odontologia**, Área de Concentração em **Dentística**.

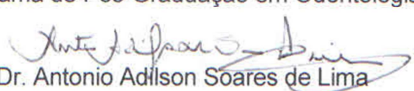
Orientador (a):


Prof. Dr. Edvaldo Antonio Ribeiro Rosa
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR


Profª Drª Luciana Reis Azevedo Alanis
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR


Prof. Dr. Rodrigo Nunes Rached
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR


Prof. Dr. Paulo Henrique Couto Souza
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR


Prof. Dr. Antonio Adilson Soares de Lima
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, UFPR

Curitiba, 28 de Abril de 2017.

Agradecimentos

A Deus, pelo milagre da vida, por todas as bênçãos a mim concebidas, hoje e sempre.

A minha esposa Alessandra pelo companheirismo e apoio sempre presente; vc é meu farol na escuridão.

**Ao meu Orientador Prof. Dr. Edvaldo Antonio Ribeiro Rosa ,
cuja orientação e amizade foi fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.**

A Rosemeire Takaki Rosa que atua em sincronia com o professor Edvaldo na Unidade de Pesquisa com Xenobióticos ajudando e auxiliando muito a todos. Sou eternamente grato pela ajuda vcs e pelo acolhimento no laboratório; Muito obrigado por tudo mesmo.

Aos Professores do Curso de Doutorado, pela amizade e convivência científica compartilhada. Cada um com sua particularidade têm seu mérito neste processo de ensino aprendizagem.

Aos colegas do Curso, pela amizade e companheirismo durante todos estes anos.

Aos Auxiliares e Secretárias do Curso de Doutorado, pela amizade e conhecimento técnico compartilhado.

A todos que, de alguma forma contribuíram, meu muito obrigado !

Querido Deus, Tu és minha proteção, a minha fortaleza. Tu és o meu Deus, eu confio em Ti.

(Salmo 91:2)

SUMÁRIO

ARTIGO EM PORTUGUÊS.....	1
Resumo.....	2
Introdução.....	3
Material e Método.....	4
Resultados.....	8
Discussão.....	9
Conclusão.....	13
Referências.....	14
ARTIGO EM INGLÊS.....	22
Abstract.....	23
Introduction.....	24
Material and Methods.....	25
Results.....	29
Discussion.....	30
Conclusion.....	34
References.....	35
ANEXO.....	43
TCLE - Termo de consentimento livre e esclarecido.....	43
Parecer de comitê de ética.....	45

ARTIGO EM PORTUGUÊS

RESUMO

Enxaguatórios bucais têm sido indicados como adjuvantes na profilaxia de doenças bucais, embora não haja uma unanimidade de opinião. Existe um forte apelo comercial dos fabricantes que alegam que seus enxaguatórios propiciam grandes reduções na microbiota, com uma pretensa atividade “anti-placa”. Por outro lado, diversos grupos defendem que essa redução na carga microbiana é insuficiente para proteção. Uma vez observada essa inconsistência de opiniões, foram recrutados voluntários que passaram a usar dispositivo intrabucal que permitia o acúmulo de *Plaque-Like Biofilms* (PL-biofilmes) em lojas arranjadas na região vestibular. Os PL-biofilmes formados *in situ* foram desafiados duas vezes ao dia com enxaguatórios bucais comumente consumidos no Brasil e pertencentes à diferentes classes (Cepacol[®], Listerine[®] Whitening, Malvatricin[®], Colgate Plax[®] e Periogard[®]). Após três e sete dias de uso ininterrupto, as biomassas dos PL-biofilmes eram removidas para avaliação *ex vivo* que envolvia a mensuração das variações de taxa metabólica (MTT) por milímetro quadrado ($\Delta MA \cdot mm^2 \cdot^{-1}$). Comparações com controles negativos mostraram que nenhum dos produtos analisados garantiu uma alta redução na viabilidade dos PL-biofilmes (*i.e.*, $> 3 \log$), mesmo que tenham ocorrido reduções significativas ($p \leq 0,05$). O impacto desses resultados no controle do PL-biofilme, bem como efeitos adversos decorrentes do uso desses produtos é discutido.

Palavras-chave: Enxaguatórios bucais, PL-biofilme, Estudo *in situ/ex vivo*.

1. INTRODUÇÃO

O mercado de enxaguatórios bucais (EBs) movimentou somente nos EUA, cerca de US\$ 2.9 bilhões em 2007, com cerca de 121 milhões de usuários e com perspectivas de incremento.¹ No Brasil, dados relativos ao ano de 2002, mostram que naquele ano a indústria cosmética e de higiene pessoal produziu 6773 toneladas, movimentando cerca de US\$ 20,1 milhões.²

A propaganda veiculada em mídias de massa tem um forte apelo comercial embora exista uma considerável polêmica acerca da eficácia dos EBs com pretensa atividade “anti-placa”. Grupos defendem que determinadas formulações colaboram sobremaneira na prevenção de doenças bucais, pois contêm moléculas com poder antimicrobiano.^{3,4} Contudo, outros grupos mostram inconstâncias na eficácia desses produtos dependendo da molécula ensaiada,⁵ do estágio de desenvolvimento do *Plaque Like*-biofilme (PL-biofilme)^{6,7} ou da integridade de sua arquitetura.⁸

A despeito das diferenças de formulação dos EBs, uma das razões para essa disparidade de opiniões está centrada no fato de que ensaios *in vitro* foram conduzidos quase que exclusivamente em biofilmes crescidos de forma estática.

Com a constatação de que diversos microrganismos crescem sobre substratos bióticos/abióticos sob o fenótipo de PL-biofilmes,⁹ também se observou que os perfis de sensibilidade se tornavam diferenciados.^{10,11} Logo, os métodos empregados até então se mostraram insuficientes.

2. OBJETIVO

Avaliar a alegada atividade “anti-placa” de formulações dos principais enxaguatórios bucais comercializados no Brasil por meio de um estudo *in situ*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Seleção dos participantes

Foram recrutados, aleatoriamente, 22 voluntários de ambos os gêneros para cada tratamento (idades entre 18 e 37 anos). Os voluntários selecionados, uma vez tendo atendido os critérios de inclusão e aceitado em participar assinaram um termo de consentimento esclarecido, em acordo com as diretrizes do Comitê de Ética em Pesquisa da instituição (Anexo 1).

Todos os indivíduos apresentavam boa saúde bucal, com ausência de lesões cariosas, candidose, herpes ou doença periodontal visível ao exame clínico sem sondagem.⁵⁶

Para fins de exclusão de voluntários, não participaram do estudo aqueles indivíduos em tratamento ortodôntico, tabagistas, gestantes ou aqueles que tivessem utilizado agentes antimicrobianos nos três meses que antecederam as coletas.

3.2 Confeção dos dispositivos intrabucais

Os participantes foram inicialmente moldados para confecção de placas de acetato individualizadas. Essas placas foram preparadas em aparelho a vácuo e então foram recortadas, acabadas e polidas de forma a não apresentarem sobrecontornos ou irregularidades capazes de causar injúrias aos voluntários. Os dispositivos intrabucais foram feitos de forma a se obter aqueles do tipo “*Intraoral Device of Overlaid Disk-holding Splints (IDODS)*”. Foram confeccionados seis corpos de prova de resina composta Filtek Z 350 (3M) por indivíduo para cada tratamento.¹²

Os corpos de prova foram fixados sobre a superfície vestibular das placas, junto à região de molares e pré-molares com cera adesiva (Kota).

Os corpos de prova de resina possuíam dimensões de 5x1 mm. Foram confeccionados sobre uma lâmina de vidro previamente limpa com álcool 70 °GL.

A resina composta fotopolimerizável Filtek Z 350 (3M) foi distribuída e espalhada com uma espátula 24 de forma que se obtivesse uma película de espessura próxima à uma lamínula de vidro (~1 mm) com outra lâmina de vidro sobrepondo essa lamínula.

3.3 Tipos de tratamento

Os tratamentos foram realizados com cinco marcas comerciais de enxaguatórios bucais descritas na tabela 1, além de NaCl 0,9%, utilizado pelo grupo controle. Foi disponibilizado a cada um dos voluntários uma escova dental e dentifrício iguais desde o início da pesquisa.

Tabela 1. Enxaguatórios bucais que foram avaliados

Marca	Fabricante	Princípio(s) ativo(s)
Cepacol® Solução	Sanofi Aventis Farmacêutica Ltda	Cetilpiridínio.HCl 0,5 mg.mL ⁻¹
Listerine® Whitening	Johnson & Johnson Ind. Com. Ltda	Timol 0,64 mg.mL ⁻¹ ; eucaliptol 0,92 mg.mL ⁻¹ ; salicilato de metila 0,6 mg.mL ⁻¹ ; etanol 8%, peróxido de hidrogênio 2%, mentol 0,42 mg.mL ⁻¹
Malvatricin®	Laboratório Daudt Oliveira Ltda	Tirotricina 0,3 mg.mL ⁻¹ ; quinosol 10 mg.mL ⁻¹
Colgate Plax® Periogard®	Colgate-Palmolive Ind. Com. Ltda	Triclosan 0,3 mg.mL ⁻¹ ; gantrez 1,5 mg.mL ⁻¹ Digluconato de clorexidina 1,2 mg.mL ⁻¹

As placas foram mantidas na boca por 24 h/dia, por sete dias, sendo removidas somente durante a alimentação e higiene bucal. Durante a alimentação e escovação, o voluntário deveria colocar a placa em uma caixa com tampa

hermeticamente fechada. Após a higienização, realizaram bochechos com 5 mL do EB, por 1 min. Para fins de normalização e seguindo as orientações dos fabricantes, os bochechos se restringiram a duas sessões diárias, com espaçamento de aproximadamente 12 h. Foram realizados *wash-out* de uma semana entre os tratamentos. Os controles seguiram as mesmas orientações dadas aos voluntários dos grupos experimentais.

3.4 Estimação da biomassa

Como a determinação do número de células em um PL-biofilme é imprecisa e o que se desejava era avaliar a eficácia na redução de viabilidade microbiana, optou-se por estimar a biomassa com base na atividade metabólica dos PL-biofilmes. Ainda, como as células bacterianas estavam, em grande parte, em ambiente anóxico e se utilizando de respiração anaeróbia ou de fermentação, optamos por empregar o protocolo que envolve o teste com MTT. O ensaio de MTT (brometo de 4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio) é utilizado para determinar a viabilidade celular, quantificando o MTT presente no meio que foi reduzido pela atividade metabólica celular ligada ao NADH e NADHP formando cristais de formazana, de cor azul. Dessa maneira a quantidade de formazana, medida por espectrofotometria, é diretamente proporcional ao número de células viáveis.¹³

Decorridos três (1ª coleta) e sete dias (2ª coleta) de uso das placas, os corpos de prova foram recolhidos das placas de acetato e colocados em pé, individualmente em placas estéreis de 96 poços com fundo U. Os poços foram preenchidos com 200 µL de MTT 1 mg.mL⁻¹. As placas ficaram incubadas a 37 °C, por 4 h e 100 rpm. Em seguida, o MTT não reativo era drenado. Foram acrescentados 200 µL de

isopropanol. Após 5 min, alíquotas de 100 µL dos sobrenadantes foram transferidas para poços de placas estéreis de microtitulação com 96 poços e fundo chato, para conferência das densidades ópticas (absorbâncias) em 540 nm.

Os valores de absorbância das placas foram pré-lidos a 540 nm. Os valores de absorbância dos *blanks* foram subtraídos dos valores obtidos nos tratamentos para eliminar resultados espúrios decorrentes de interferência de fundo.

A variação nas absorbâncias (tratamentos/controle) permitiu verificar se algum (ns) dos EBs reduz (em) a viabilidade microbiana de entidades que formam PL-biofilmes. Essa redução na viabilidade foi expressa como “variação de taxa metabólica por milímetro quadrado” ($\Delta MA \cdot mm^{-2} \cdot d^{-1}$).

3.5 Análise Estatística

Visando comparar se existia diferença estatisticamente significativa nos valores médios da “Absorbância” segundo “Grupo” (Controle, Periogard[®], Plax[®], Malvatricin[®] Cepacol[®] e Listerine[®]) e Tempo (3 dias e 7 dias), testou-se inicialmente a normalidade dos dados para todos os tratamentos em que $n < 30$, utilizando o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e a homogeneidade de variâncias entre “Grupo”, “Tempo” e a interação “Grupo” vs “Tempo”.

Uma vez que os tratamentos apresentaram distribuição normal, a comparação entre “Grupo”, “Tempo” e a interação entre “Grupo” e “Tempo” foi feita utilizando o método ANOVA a dois critérios, modelo fatorial completo. Quando a ANOVA indicou diferença entre “Grupo”, “Tempo” e na interação “Grupo” vs “Tempo” e considerando que o teste de homogeneidade de variâncias de Levene indicou variâncias heterogêneas entre “Grupo”, “Tempo” e na interação “Grupo-Tempo”, a comparação

dois a dois entre “Grupo” e entre “Grupo” vs “Tempo”, foi feita utilizando o teste de comparações múltiplas paramétrica de Games-Howell para variâncias heterogêneas. O nível de significância adotado em todos os testes foi de 95%. O programa estatístico utilizado foi o IBM SPSS Statistics 23.0.0.0.

4. RESULTADOS

A compilação dos resultados e sua posterior análise pelo teste ANOVA a dois critérios, seguido pelo teste de comparações múltiplas paramétrico de Games-Howell mostraram que uma considerável variabilidade de comportamento, tanto entre os enxaguatórios, quanto para tempo (Figura 1).

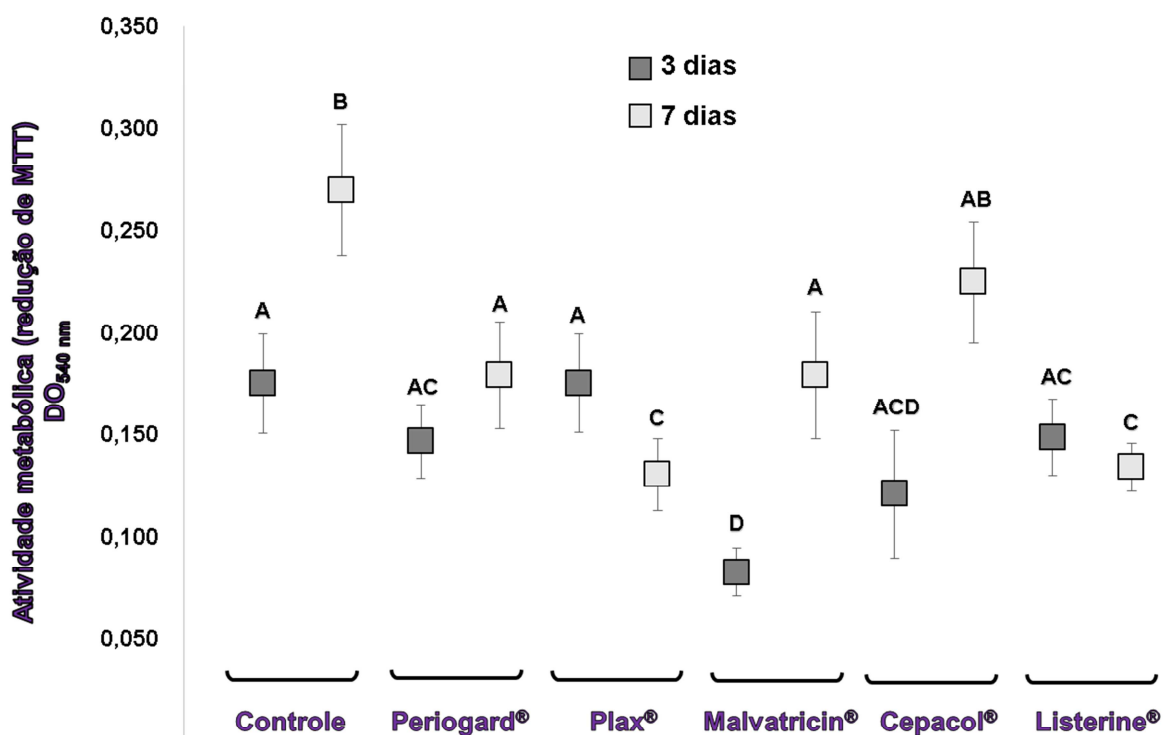


Figura 1. Carga microbiana estimada pela atividade metabólica de redução do MTT para biofilmes de três e sete dias tratados com diferentes antissépticos bucais. Letras diferentes sobre as barras de IC95% indicam diferenças estatísticas ($p \leq 0,05$) entre os tratamentos.

Quando comparados ao controle, o tratamento de três dias com Malvatricin[®] se mostrou com menores valores de atividade metabólica e, por inferência, com biomassa reduzida em 52,57% ($p \leq 0,001$). Após três dias de uso, os demais enxaguatórios não induziram reduções significativas de biomassa, quando comparados ao controle (0%-16%; $p \geq 0,885$).

Quando se traçam comparações com o controle para sete dias de uso, no entanto, somente o Cepacol[®] não promoveu reduções (16,66%; $p = 0,930$). Os demais apresentaram variações entre si; porém, com valores de atividade metabólica remanescente que indicam redução de biomassa entre 33,70% e 51,85% ($p \leq 0,008$).

5. DISCUSSÃO

A ideia deste estudo adveio da divergência existente entre diferentes escolas odontológicas em relação ao emprego de enxaguatórios bucais como recurso auxiliar no controle da placa dental. A literatura apresenta informações que expressam tanto ceticismo quanto tendenciosismo, dependendo da fonte. Isso se deve ao relativo número de estudos *in vitro* e a carência de estudos *in vivo* controlados.^{14,15}

A proposição de se conduzir um estudo controlado *in situ* foi a de se estabelecer uma comparação de eficiência na pretensa redução de placa dental não perturbada em relação ao controle sem qualquer tratamento químico, por um período de sete dias. Alguns estudos aventam para a possibilidade de uso de enxaguatórios para controle de PL-biofilmes localizados em pontos de difícil acesso e nos quais a higienização seria, por vezes, negligenciada.^{16,17}

A opção pelo estudo na modalidade *in situ* foi estabelecida com base no fato de que PL-biofilmes crescidos dessa maneira podem ser facilmente analisados ex

vivo sem distorções.¹⁸⁻²¹ A escolha pelo modelo IDODS se deu pelo fato desse ser considerado o melhor dentre vários analisados anteriormente.²²

Nossos resultados mostram que, embora haja uma redução significativa na viabilidade celular após três e sete dias, essa redução não foi de ordem logarítmica, como encontrado em estudo anterior²³ no qual amostras de placa *ex vivo* foram desafiadas com antissépticos em condições diferentes daquelas encontradas no microcosmo do biofilme aderido. Na realidade, os valores aqui encontrados estão mais próximos daqueles obtidos em outro estudo²⁴ envolvendo PL-biofilmes *in situ* e que manteve a integridade estrutural dessas comunidades microbianas, com suas peculiaridades de resistência intrínseca, dificuldade de penetração, diluição durante a penetração, inativação, etc.

Mesmo a clorexidina, considerada um antisséptico padrão-ouro,²⁵⁻²⁷ não promoveu reduções significativas na viabilidade dos PL-biofilmes. Esse fato, no entanto, não é de todo desconhecido. Em modelo *in situ*, foi mostrado que a clorexidina pode reduzir drasticamente a viabilidade global da saliva e do PL-biofilme;²⁸ porém, em algumas horas essa viabilidade se eleva na microbiota planctônica salivar, que contribuirá para o subsequente crescimento *de novo* do PL-biofilme. Esses autores observaram que após sete horas de desafio pontual com clorexidina 0,2%, a viabilidade celular nos PL-biofilmes retornava de ~5% (30 seg. após bochecho) à ~35%. Logo, é razoável supor que se em um curto intervalo de tempo ocorre tal elevação na viabilidade dos PL-biofilmes, em três e sete dias de crescimento, tal elevação deva ser significativa, mesmo sofrendo desafios intermitentes com o antisséptico.

Um fato que chama a atenção é a redução tempo-dependente da vitalidade dos PL-biofilmes induzida pelo Colgate Plax[®] (triclosan-gantrez) e que fugiu da

tendência inversa de incremento tempo-dependente do controle e de outros enxaguatórios. Foi verificada uma redução de 51,85% ($p < 0,001$). Tais reduções observadas no início da formação dos PL-biofilmes (*early onset PL-biofilm*), no entanto, tendem a não se manter com o decorrer do tempo, conferindo de 25% a 30% de redução de PL-biofilme.²⁹

Formulações com triclosan devem ser consideradas com reserva, pois essa molécula tem estado no centro de muita controvérsia em ser um disruptor endócrino em mamíferos³⁰⁻³² e bioacumulável em animais.³³⁻³⁵ A molécula foi banida pela União Europeia³⁶ e pelo estado americano de Minnesota.³⁷

O Listerine® Whitening promoveu redução média de 49,62% em relação ao controle, após sete dias de desafio. Uma vez mais, embora significativa, tal redução não levou à erradicação ou a mesmo à obtenção de uma biomassa incapaz de comprometer a homeostase bucal. É esperado que uma formulação dita antisséptica promovesse uma redução da ordem de 5 log;³⁸.

O método aqui empregado para estimar biomassa não envolveu a contagem de células, mas sim, sua atividade metabólica quantificada por meio espectrofotométrico, que não apresenta linearidade na distribuição concentração vs absorvância; contudo, como não foi possível de detectar uma queda acentuada na absorvância, podemos inferir que mesmo com pobre correlação entre os métodos,³⁹ os resultados indicam uma ineficácia do Listerine® Whitening em reduzir o PL-biofilme, a despeito da significância estatística observada.

Além do exposto acima, a formulação empregada no Listerine® Whitening contém 8% de etanol (dados do fabricante). Já foi demonstrado que bactérias presentes no PL-biofilme podem produzir acetaldeído, um conhecido carcinógeno, a partir da metabolização do etanol,⁴⁰⁻⁴³ ainda que por tempo limitado.⁴⁴ Em se levando

em consideração que o apelo comercial desse produto se baseia em uma pretensa inativação de microrganismos não removidos pela escovação, a possibilidade de formação de acetaldeído é um fator a ser considerado, sobretudo em asiáticos, que apresentam uma inabilidade genética em degradar acetaldeído, pois apresentam deficiência do gene *ALDH2* e um conseqüente risco de cânceres do trato digestório.⁴⁵

Foi observada uma contenção de 52,57% nos três primeiros dias de uso do Malvatricin[®], que reduziu para 33,70% após uma semana de uso. Essa redução tempo-dependente na eficácia pode decorrer do fato de que nos três primeiros dias, a formação do PL-biofilme envolve uma variedade de cocos e formas filamentosas Gram-positivas⁴⁶ susceptíveis à tirotricina.⁴⁷ Depois de sete dias, a proporção de Gram-positivos diminui e a proporção de Gram-negativos se eleva.⁴⁸ Embora sensíveis a esse antibiótico, os níveis de sensibilidade são consideravelmente inferiores que para Gram-positivos.⁴⁹ O outro componente antimicrobiano do Malvatricin[®], o quinosol (8-hidroxiquinolina) apresenta o mesmo comportamento.⁵⁰

De forma diversa do esperado, o Periogard[®] permitiu o desenvolvimento de PL-biofilmes quantitativamente iguais aos do grupo controle após três dias de tratamento e que se mantiveram metabolicamente constantes após sete dias, ainda que inferiores ao controle de sete dias. Era esperado que o ativo do produto, a clorexidina 0,12%, contivesse o crescimento bacteriano dado sua reconhecida atividade antibacteriana^{6, 51-52} e substantividade.⁵³ Contudo, estudo anterior mostrou que o contingenciamento de formação de PL-biofilme promovido pela clorexidina 0,2% atinge 31,9 % após 3 h e que após 7 h se perde completamente.⁵⁴ Em PL-biofilmes “não perturbados” a vitalidade remanescente permaneceu em 27-40%, após 7 h pós-exposição.^{28,55} Essa manutenção na vitalidade celular, nos leva a inferir que o microambiente do PL-biofilme altera a fisiologia bacteriana a ponto de interferir

positivamente na sobrevivência de uma parcela considerável das células presas na matriz.

6. CONCLUSÃO

Embora os enxagatórios testados não tenham se mostrado suficientemente eficazes na promoção de reduções clinicamente desejáveis de PL-biofilmes, alguns deles parecem exercer um efeito retardador da formação de placa *de novo* [Malvatricin[®] (três dias); Plax[®], Listerine[®], Periogard[®], Malvatricin[®] (sete dias)]. Cabe ao clínico ponderar sobre sua utilização, visto que alguns apresentam efeitos adversos que talvez não justifiquem tal emprego.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. The U.S. Market for oral care products, 4th Edition. Packaged facts. Market research group, LLC. Rockville, MD. 328 pp. 2012.
2. Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos. Planilha com dados de consumo de produtos de higiene bucal no Brasil entre 2000 e 2004. São Paulo, 2005.
3. Haq MW, Batool M, Ahsan SH, Sharma G. Efficacy of antiplaque mouthwashes: a five-day clinical trial. *Gen Dent*. 2011;59(3):110-115.
4. Lamont T. Lower concentration of chlorhexidine and cetyl-pyridinium chloride mouthwash demonstrates some efficacy. *Evid Based Dent*. 2012;13(2):52-53.
5. Shapiro S, Giertsen E, Guggenheim B. An in vitro oral biofilm model for comparing the efficacy of antimicrobial mouthrinses. *Caries Res*. 2002;36(2):93-100.
6. Maruo IT, Rosa EA, Maruo H, Tanaka O, Guariza Filho O, Ignácio SA, Camargo ES. Effect of chlorhexidine mouth rinse on streptococci counts of tooth-tissue-borne palatal expander biofilm. *Orthod Craniofac Res*. 2008;11(3):136-142.
7. Zanatta FB, Antoniazzi RP, Rösing CK. The effect of 0.12% chlorhexidine gluconate rinsing on previously plaque-free and plaque-covered surfaces: a randomized, controlled clinical trial. *J Periodontol*. 2007;78(11):2127-2134.
8. Fine DH, Furgang D, Barnett ML. Comparative antimicrobial activities of antiseptic mouthrinses against isogenic planktonic and biofilm forms of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Clin Periodontol*. 2001;28(7):697-700.
9. Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis*. 2002;8(9):881-890.
10. Høiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents*. 2010;35(4):322-332.

11. Olson ME, Ceri H, Morck DW, Buret AG, Read RR. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Can J Vet Res.* 2002;66(2):86-92.
12. Brambilla E, Ionescu A, Gagliani M, Cochis A, Arciola CR, Rimondini L. Biofilm formation on composite resins for dental restorations: an in situ study on the effect of chlorhexidine mouthrinses. *Int J Artif Organs.* 2012;35(10):792-799.
13. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65(1-2):55-63.
14. Freires IA, Denny C, Benso B, de Alencar SM, Rosalen PL. Antibacterial activity of essential oils and their isolated constituents against cariogenic bacteria: a systematic review. *Molecules.* 2015;20(4):7329-7358.
15. Food and Drug Administration (FDA). Oral health care drug products for over-the-counter human use; antigingivitis/antiplaque drug products; establishment of a monograph. *Federal Register.* 2003;68(103):32232-32287.
16. Beyth N, Haramaty O, Polak D. Focal drug delivery for management of oral infections. In: Domb AJ, Khan W (editors). *Focal controlled drug delivery.* Springer: New York, p.305-328. 2014.
17. Cummins D, Creeth JE. Delivery of antiplaque agents from dentifrices, gels, and mouthwashes. *J Dent Res.* 1992;71(7):1439-1449.
18. Hannig C, Hannig M. The oral cavity—a key system to understand substratum-dependent bioadhesion on solid surfaces in man. *Clin. Oral Investig.* 2009;13:123-139.
19. Ausschill TM, Hellwig E, Sculean A, Hein N, Arweiler NB. Impact of the intraoral location on the rate of biofilm growth. *Clin. Oral Investig.* 2004;8:97-101.

20. Palmer RJ Jr, Wu R, Gordon S, Bloomquist CG, Liljemark WF, Kilian M, Kolenbrander PE. Retrieval of biofilms from the oral cavity. *Methods Enzymol.* 2001;337:393-403.
21. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 1999;284:1318-1322.
22. Prada-López I, Quintas V, Vilaboa C, Suárez-Quintanilla D, Tomás I. Devices for in situ development of non-disturbed oral biofilm. A systematic review. *Front Microbiol.* 2016;7:1055.
23. Sreenivasan PK, Haraszthy VI, Zambon JJ. Antimicrobial efficacy of 0.05% cetylpyridinium chloride mouthrinses. *Lett Appl Microbiol.* 2013;56(1):14-20.
24. Auschill TM, Hein N, Hellwig E, Follo M, Sculean A, Arweiler NB. Effect of two antimicrobial agents on early in situ biofilm formation. *J Clin Periodontol.* 2005;32(2):147-152.
25. Quintas V, Prada-López I, Donos N, Suárez-Quintanilla D, Tomás I. Antiplaque effect of essential oils and 0.2% chlorhexidine on an in situ model of oral biofilm growth: a randomised clinical trial. *PLoS One.* 2015a;10(2):e0117177.
26. Mouchrek Junior JC, Nunes LH, Arruda CS, Rizzi Cde C, Mouchrek AQ, Tavares RR, Tonetto MR, Bandeca MC, Maia Filho EM. Effectiveness of oral antiseptics on tooth biofilm: a study in vivo. *J Contemp Dent Pract.* 2015;16(8):674-678.
27. Neely AL. Essential oil mouthwash (EOMW) may be equivalent to chlorhexidine (CHX) for long-term control of gingival inflammation but CHX appears to perform better than EOMW in plaque control. *J Evid Based Dent Pract.* 2012;12(3):69-72.
28. García-Caballero L, Quintas V, Prada-López I, Seoane J, Donos N, Tomás I. Chlorhexidine substantivity on salivary flora and plaque-like biofilm: an in situ model. *PLoS One.* 2013;8(12):e83522.

29. Ramberg P, Furuichi Y, Volpe AR, Gaffar A, Lindhe J. The effects of antimicrobial mouthrinses on de novo plaque formation at sites with healthy and inflamed gingivae. *J Clin Periodontol.* 1996;23(1):7-11.
30. Witorsch RJ. Critical analysis of endocrine disruptive activity of triclosan and its relevance to human exposure through the use of personal care products. *Crit Rev Toxicol.* 2014;44(6):535-555.
31. Kumar V, Balomajumder C, Roy P. Disruption of LH-induced testosterone biosynthesis in testicular Leydig cells by triclosan: probable mechanism of action. *Toxicology.* 2008;250(2-3):124-131.
32. Crofton KM, Paul KB, Devito MJ, Hedge JM. Short-term in vivo exposure to the water contaminant triclosan: Evidence for disruption of thyroxine. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2007;24(2):194-197.
33. Raut SA, Angus RA. Triclosan has endocrine-disrupting effects in male western mosquitofish, *Gambusia affinis*. *Environ Toxicol Chem.* 2010;29(6):1287-1291.
34. Fair PA, Lee HB, Adams J, Darling C, Pacepavicius G, Alae M, Bossart GD, Henry N, Muir D. Occurrence of triclosan in plasma of wild Atlantic bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) and in their environment. *Environ Pollut.* 2009;157(8-9):2248-2254.
35. Veldhoen N, Skirrow RC, Osachoff H, Wigmore H, Clapson DJ, Gunderson MP, Van Aggelen G, Helbing CC. The bactericidal agent triclosan modulates thyroid hormone-associated gene expression and disrupts postembryonic anuran development. *Aquat Toxicol.* 2006;80(3):217-227.
36. SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety), Opinion on triclosan (antimicrobial resistance), 22 June 2010.

37. Minnesota Senate. Information for S.F. No. 2192. 2013-2014 Biennium Eighty-Eighth Legislature. Regular Session. 2014.
38. European Committee for Standardization. Standard EN13727. Chemical disinfectants and antiseptics - Quantitative suspension test for the evaluation of bactericidal activity in medical area – Test method and requirements (phase 2/step 1) CEN. 2012.
39. Elisia I, Popovich DG, Hu C, Kitts DD. Evaluation of viability assays for anthocyanins in cultured cells. *Phytochem Anal.* 2008;19(6):479-486
40. Takahashi N. Oral microbiome metabolism: from "who are they?" to "what are they doing?". *J Dent Res.* 2015;94(12):1628-1637.
41. Kurkivuori J, Salaspuro V, Kaihovaara P, Kari K, Rautemaa R, Grönroos L, Meurman JH, Salaspuro M. Acetaldehyde production from ethanol by oral streptococci. *Oral Oncol.* 2007;43(2):181-186.
42. Salaspuro V, Salaspuro M. Synergistic effect of alcohol drinking and smoking on in vivo acetaldehyde concentration in saliva. *Int J Cancer.* 2004;111(4):480-483.
43. Poggi P, Rodriguez y Baena R, Rizzo S, Rota MT. Mouthrinses with alcohol: cytotoxic effects on human gingival fibroblasts in vitro. *J Periodontol.* 2003;74(5):623-629.
44. Moazzez R, Thompson H, Palmer RM, Wilson RF, Proctor GB, Wade WG. Effect of rinsing with ethanol-containing mouthrinses on the production of salivary acetaldehyde. *Eur J Oral Sci.* 2011;119(6):441-446.
45. Salaspuro V, Hietala J, Kaihovaara P, Pihlajarinne L, Marvola M, Salaspuro M. Removal of acetaldehyde from saliva by a slow-release buccal tablet of L-cysteine. *Int J Cancer.* 2002;97(3):361-364.

46. Palmer RJ Jr, Gordon SM, Cisar JO, Kolenbrander PE. Coaggregation-mediated interactions of streptococci and *Actinomyces* detected in initial human dental plaque. *J Bacteriol.* 2003;185:3400-3409.
47. Kim JY, Jun JH, Kim SJ, Hwang KM, Choi SR, Han SD, Son MW, Park ES. Wound healing efficacy of a chitosan-based film-forming gel containing tyrothricin in various rat wound models. *Arch Pharm Res.* 2015;38:229-238.
48. Al-Ahmad A, Wunder A, Auschill TM, Follo M, Braun G, Hellwig E, Arweiler NB. The in vivo dynamics of *Streptococcus* spp., *Actinomyces naeslundii*, *Fusobacterium nucleatum* and *Veillonella* spp. in dental plaque biofilm as analysed by five-colour multiplex fluorescence in situ hybridization. *J Med Microbiol.* 2007;56(5):681-687.
49. Baker PJ, Evans RT, Slots J, Genco RJ. Susceptibility of human oral anaerobic bacteria to antibiotics suitable for topical use. *J Clin Periodontol.* 1985;12(3):201-208.
50. Frier M. Derivatives of 4-amino-quinaldinium and 8-hydroxyquinoline. In: Hugo WB. Inhibition and destruction of microbial cell. London: Academic Press Ltd. p.107-120. 1971.
51. Rath SK, Singh M. Comparative clinical and microbiological efficacy of mouthwashes containing 0.2% and 0.12% chlorhexidine. *Dent Res J (Isfahan).* 2013;10(3):364-369.
52. Berchier CE, Slot DE, Van der Weijden GA. The efficacy of 0.12% chlorhexidine mouthrinse compared with 0.2% on plaque accumulation and periodontal parameters: a systematic review. *J Clin Periodontol.* 2010;37(9):829-839.

53. Tomás I, Cousido MC, García-Caballero L, Rubido S, Limeres J, Diz P. Substantivity of a single chlorhexidine mouthwash on salivary flora: influence of intrinsic and extrinsic factors. *J Dent.* 2010;38(7):541-546.
54. Quintas V, Prada-López I, Donos N, Suárez-Quintanilla D, Tomás I. In situ neutralisation of the antibacterial effect of 0.2% Chlorhexidine on salivary microbiota: quantification of substantivity. *Arch Oral Biol.* 2015b;60(8):1109-1116.
55. Quintas V, Prada-López I, Prados-Frutos JC, Tomás I. In situ antimicrobial activity on oral biofilm: essential oils vs. 0.2 % chlorhexidine. *Clin Oral Investig.* 2015c;19(1):97-107.
56. Medeiros, E. P. G. Exame odontológico pré-admissional. *O Incisivo.* 1965; 4 (1): 18-22.



PONTIFICAL CATHOLIC UNIVERSITY OF PARANÁ
SCHOOL OF LIFE SCIENCES
POST-GRADUATION PROGRAM IN DENTISTRY
DENTISTIC CONCENTRATION

FABIANO GERONASSO SIMÕES, CD, MSc

**In situ evaluation of the efficacy of mouthwashes in
the control of PL-biofilm**

Curitiba

2016

FABIANO GERONASSO SIMÕES, CD, MSc

In situ evaluation of the efficacy of mouthwashes in the control of PL-biofilm

Dissertation presented to the Postgraduate Program in Dentistry of the Pontifical Catholic University of Paraná, as part of the requirements for obtaining the title of Doctor of Dentistry, Area of Concentration in Dentistry.

Advisor:

Prof. Dr. Edvaldo Antonio Ribeiro Rosa,
BPharm, MSc, PhD.

Curitiba

2016

SUMMARY

Mouthwashes have been indicated as adjuvants in the prophylaxis of oral diseases, although there is no unanimity of opinion. There is strong commercial appeal from manufacturers who claim that their mouthwashes lead to large reductions in the microbiota, with alleged "anti-plaque" activity. On the other hand, several groups argue that this reduction in microbial load is insufficient for protection. Once this inconsistency of opinion was observed, volunteers were recruited to use intra-oral device that allowed the accumulation of Plaque-Like Biofilms (PL-biofilms) in stores arranged in the vestibular region. In situ PL-biofilms were challenged twice daily with mouthwashes commonly consumed in Brazil and belonging to different classes (Cepacol®, Listerine® Whitening, Malvatricin®, Colgate Plax® and Periogard®). After three and seven days of uninterrupted use, biomasses of PL biofilms were removed for ex vivo evaluation involving the measurement of metabolic rate (MTT) variations per square millimeter ($\Delta MA.mm^2^{-1}$). Comparisons with negative controls showed that none of the analyzed products guaranteed an appreciable reduction (i.e., > 3 log) in the viability of PL-biofilms, even though significant reductions ($p \leq 0.05$) occurred. The impact of these results on the control of PL-biofilm as well as adverse effects resulting from the use of these products are discussed.

Key words: Mouthwashes, PL-biofilm, In situ / ex alive study.

1. INTRODUCTION

The mouthwash market (EBs) moved only in the US, about US \$ 2.9 billion in 2007, with about 121 million users and with prospects of increase.¹ In Brazil, data for the year 2002 show that in that year The cosmetics and personal hygiene industry produced 6773 tons, moving around US \$ 20.1 million.²

Mass media advertising has a strong commercial appeal although there is considerable controversy about the effectiveness of EBs with so-called "anti-plaque" activity. Groups argue that certain formulations collaborate greatly in the prevention of oral diseases because they contain antimicrobial molecules.^{3,4} However, other groups show inconsistencies in the efficacy of these products depending on the molecule tested⁵, of the stage of development of Plaque Like-biofilm (PL -biofilm)^{6,7} or the integrity of its architecture.⁸

Despite differences in the formulation of EBs, one of the reasons for this disparity of opinion is centered on the fact that in vitro assays were conducted almost exclusively on statically grown biofilms.

With the finding that several microorganisms grow on biotic / abiotic substrates under the PL-biofilm phenotype⁹, it was also observed that the sensitivity profiles became differentiated.^{10, 11} Therefore; the methods used up to that time were insufficient.

2. OBJECTIVE

To evaluate the alleged "anti-plaque" activity of formulations of the main mouthwashes marketed in Brazil through an in situ study.

3. MATERIAL AND METHODS

3.1 Selection of participants

Twenty-two volunteers of both sexes were recruited for each treatment (ages between 18 and 37 years). The selected volunteers, once they had met the inclusion criteria and accepted to participate, signed an informed consent form, in accordance with the guidelines of the institution's Research Ethics Committee (Attachment 1).

All the individuals presented good oral health, with absence of carious lesions, candidosis, herpes or periodontal disease visible on clinical examination without probing.⁵⁶

For the purpose of excluding volunteers, those individuals in orthodontic treatment, smokers, pregnant women or those who had used antimicrobial agents in the three months prior to collection were not included in the study.

3.2 Preparation of intraoral devices

The participants were initially molded to make individualized acetate plates. These plates were prepared in a vacuum apparatus and were then trimmed, finished and polished so as not to have over-contours or irregularities capable of causing injury to the volunteers. Intraoral devices were made in order to obtain those of the Intraoral Device of Overlaid Disk-holding Splints (IDODS).

Six specimens of composite resin Filtek Z 350 (3M) were made per individual for each treatment.¹² The specimens were fixed on the buccal surface of the plates, close to the molars and premolars region with adhesive wax (Kota).

The resin specimens had dimensions of 5 × 1 mm. They were made on a glass slide previously cleaned with 70 ° GL alcohol.

Filtek Z 350 (3M) photopolymerizable composite resin was distributed and spread with a spatula 24 so as to obtain a film of thickness close to a glass cover (~ 1 mm) with another glass sheet overlapping that cover.

3.3 Types of treatment

The treatments were performed with five mouthwash commercial brands described in table 1, besides 0.9% NaCl, used by the control group. Each volunteer was given an equal toothbrush and toothpaste from the beginning of the research.

Table 1. Mouthwashes that were evaluated

Brand	Manufacturer	Active principle (s)
Cepacol [®] Solution	Sanofi Aventis Pharmaceutical Ltda	Cetylpyridinium. HCl 0,5 mg.mL ⁻¹
Listerine [®] Whitening	Johnson & Johnson Ind. Co. Ltda	Thymol 0,64 mg.mL ⁻¹ ; eucalyptol 0,92 mg.mL ⁻¹ ; methyl salicylate 0,6 mg.mL ⁻¹ ; Ethanol 8%, hydrogen peroxide 2%, menthol 0,42 mg.mL ⁻¹
Malvatricin [®]	Laboratóy Daudt Oliveira Ltda	Thyrotropin 0,3 mg.mL ⁻¹ ; quinosol 10 mg.mL ⁻¹
Colgate Plax [®] Periogard [®]	Colgate-Palmolive Ind. Co. Ltda	<i>Triclosan</i> 0,3 mg.mL ⁻¹ ; gantrez 1,5 mg.mL ⁻¹ Chlorhexidine digluconate 1,2 mg.mL ⁻¹

The plates were kept in the mouth for 24 h / day for seven days, being removed only during feeding and oral hygiene. During feeding and brushing, the volunteer should place the plate in a box with a tightly closed cap. After the

hygienization, they performed mouthwashes with 5 mL of EB, for 1 min. For purposes of standardization and following manufacturers' guidelines, mouthwashes were restricted to two daily sessions, spaced approximately 12 hours apart. A one-week wash-out between treatments was performed. Controls followed the same guidelines given to volunteers in the experimental groups.

3.4 Estimation of biomass

As the determination of the number of cells in a PL biofilm is imprecise and what was desired was to evaluate the efficacy in the reduction of microbial viability, it was decided to estimate the biomass based on the metabolic activity of PL-biofilms. Furthermore, since bacterial cells were largely in an anoxic environment and if using anaerobic or fermentative respiration, we chose to employ the protocol that involves the MTT test. The MTT assay (4, 5-dimethylthiazol-2-yl-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) is used to determine cell viability, quantifying the MTT present in the medium which has been reduced by the cellular metabolic activity bound to NADH and NADHP forming formazan crystals, of blue color. In this way the amount of formazana, measured by spectrophotometry, is directly proportional to the number of viable cells.¹³

After three (1 st collection) and seven days (2nd collection) use of the plates, the specimens were collected from the acetate plates and placed standing individually in sterile 96-well U-bottom plates. The wells were filled with 200 ML of MTT 1 mg.mL⁻¹. Plates were incubated at 37 ° C for 4 h and 100 rpm. Then, the non-reactive MTT was drained. 200 µl of isopropanol was added. After 5 min, aliquots of 100 µL of the supernatants were transferred to wells of 96-well

sterile flat bottom microtiter plates for testing optical densities (absorbances) at 540 nm.

Absorbance values of the plates were pre-read at 540 nm. The absorbance values of the blanks were subtracted from the values obtained in the treatments to eliminate spurious results due to background interference.

The variation in the absorbances (treatments / control) allowed to verify if any (s) of the EBs reduces the microbial viability of entities that form PL-biofilms. This reduction in viability was expressed as "metabolic rate variation per square millimeter" ($\Delta MA \cdot mm^{-2} \cdot^{-1}$).

3.5 Statistical Analysis

In order to compare if there was a statistically significant difference in the mean values of "Absorbance" according to "Group" (Control, Periogard®, Plax®, Malvatricin® Cepacol® and Listerine®) and Time (3 days and 7 days), normality was initially tested. Of the data for all treatments where $n < 30$, using the Kolmogorov-Smirnov normality test and the homogeneity of variances between "Group", "Time" and the "Group" vs. "Time" interaction.

Once the treatments presented normal distribution, the comparison between "Group", "Time" and the interaction between "Group" and "Time" was done using the ANOVA method with two criteria, a complete factorial model. When the ANOVA indicated a difference between "Group", "Time" and in the "Group" vs. "Time" interaction and considering that the Levene variance homogeneity test indicated heterogeneous variances between "Group", "Time" -Time, "the two-to-two comparison between" Group "and between" Group "vs." Time "was

done using Games-Howell's parametric multiple-comparison test for heterogeneous variances. The level of significance adopted in all tests was 95%. The statistical program used was IBM SPSS Statistics 23.0.0.0.

4. RESULTS

The compilation of the results and their subsequent analysis by the two-way ANOVA test, followed by Games-Howell's parametric multiple comparison test showed a considerable behavior variability, both between mouthwashes and time (Figure 1).

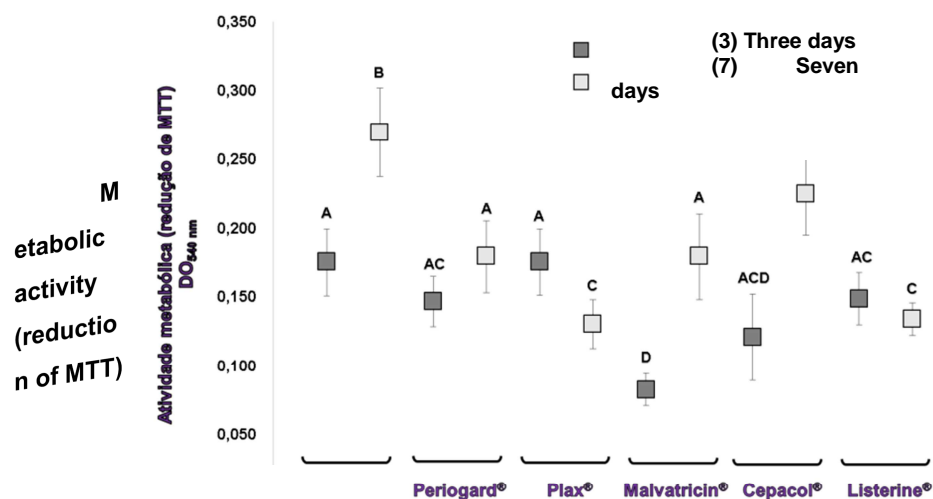


Figura 1. Carga microbiana estimada pela atividade metabólica de redução do MTT para biofilmes de três e sete dias tratados com diferentes antissépticos bucais. Letras diferentes sobre as barras de IC95% indicam diferenças estatísticas ($p \leq 0,05$) entre os tratamentos.

Figure 1. Microbial load estimated by the metabolic activity of MTT reduction for three- and seven-day biofilms treated with different oral antiseptics. Different letters on the 95% IC bars indicate statistical differences ($p < 0.05$) between treatments.

When compared to the control, the three-day treatment with Malvatricin® was shown to have lower values of metabolic activity and, by inference, reduced biomass by 52.57% ($p \leq 0.001$). After three days of use, the other rinses did not

induce significant biomass reductions when compared to the control (0% -16%, $p \geq 0.885$).

When comparisons were made with the control for seven days of use, however, only Cepacol[®] did not promote reductions (16.66%, $p = 0.930$). The others presented variations among themselves; But with values of remaining metabolic activity indicating biomass reduction between 33.70% and 51.85% ($p \leq 0.008$).

5. DISCUSSION

The idea of this study came from the divergence between different dental schools in relation to the use of mouthwashes as an auxiliary resource in the control of dental plaque. The literature presents information that expresses both skepticism and bias, depending on the source. This is due to the relative number of in vitro studies and the lack of controlled in vivo studies.^{14, 15}

The purpose of conducting a controlled in situ study was to establish a comparison of efficiency in the alleged reduction of undisturbed dental plaque in relation to the control without any chemical treatment for a period of seven days. Some studies suggest the possibility of use of mouthwashes to control LP-biofilms located in difficult access points and in which hygiene would be neglected.^{16, 17}

The option for the in-situ study was established based on the fact that PL-biofilms grown in this way can be easily analyzed ex vivo without distortions.¹⁸⁻

²¹ The choice of the IDODS model was due to the fact that it was considered the best among several Previously analyzed.²²

Our results show that, although there is a significant reduction in cell viability after three and seven days, this reduction was not of a logarithmic order, as found in a previous study²³ in which plate samples ex vivo were challenged with antiseptics under conditions different from those found in the microcosm Of the adhered biofilm.

In fact, the values found here are closer to those obtained in another study²⁴ involving PL-biofilms in situ and that maintained the structural integrity of these microbial communities, with their peculiarities of intrinsic resistance, penetration difficulty, dilution during penetration, inactivation, etc.

Even chlorhexidine, considered a gold standard antiseptic²⁵⁻²⁷, did not promote significant reductions in the viability of PL-biofilms. This fact, however, is not at all unknown. In an in situ model, it was shown that chlorhexidine can dramatically reduce the overall viability of saliva and PL-biofilm;²⁸ however, in a few hours this viability rises in the salivary planktonic microbiota, which will contribute to the subsequent de novo growth of PL- Biofilm. These authors observed that after seven hours of punctual challenge with chlorhexidine 0.2%, cell viability in PL biofilms returned ~ 5% (30 sec after mouthwash) to ~ 35%. Therefore, it is reasonable to suppose that if such a rise in the viability of PL-biofilms occurs in a short period of time, in three and seven days of growth, such elevation should be significant, even if they suffer intermittent challenges with the antiseptic.

A striking fact is the time-dependent reduction of PL-biofilm vitality induced by Colgate Plax[®] (triclosan-gantrez) and that it escaped the inverse trend of time-dependent increase of control and other mouthwashes. A reduction of 51.85%

($p < 0.001$) was observed. Such reductions observed at the beginning of the formation of PL-biofilm (early onset PL-biofilm), however, tend not to persist over time, conferring a 25% to 30% reduction in PL biofilm.²⁹

Formulations with triclosan should be considered in reserve since this molecule has been at the center of much controversy in being an endocrine disruptor in mammals³⁰⁻³² and bioaccumulating in animals.³³⁻³⁵ The molecule has been banned by the European Union³⁶ and the US state of Minnesota.³⁷

Listerine[®] Whitening promoted an average reduction of 49.62% in relation to the control, after seven days of challenge. Again, although significant, such reduction did not lead to the eradication or even the attainment of a biomass incapable of compromising oral homeostasis. An antiseptic formulation is expected to promote a reduction of the order of 5 log;³⁸

The method used here to estimate biomass did not involve the cell counting, but its metabolic activity quantified by means of spectrophotometric, that does not present linearity in the distribution concentration vs absorbance; However, as it was not possible to detect a sharp decrease in absorbance, we can infer that even with poor correlation between methods³⁹, the results indicate an inefficacy of Listerine[®] Whitening in reducing PL-biofilm, despite the statistical significance observed.

In addition to the above, the formulation employed in Listerine[®] Whitening contains 8% ethanol (manufacturer's data). It has already been shown that bacteria present in PL biofilm can produce acetaldehyde, a known carcinogen, from the metabolization of ethanol,⁴⁰⁻⁴³ even for a limited time.⁴⁴ Taking into account that the commercial appeal of this product is based on a The possibility

of acetaldehyde formation is a factor to be considered, especially in Asians, who present a genetic inability to degrade acetaldehyde, since they present deficiency of the ALDH2 gene and a consequent risk of cancers of the digestive tract.⁴⁵

A containment of 52.57% was observed in the first three days of use of Malvaticin[®], which reduced to 33.70% after one week of use. This time-dependent reduction in efficacy may be due to the fact that in the first three days, PL-biofilm formation involves a variety of cocci and Gram-positive filamentous forms⁴⁶ susceptible to thyrotropin.⁴⁷ After seven days, the proportion of Gram- (8-hydroxyquinoline). The other antimicrobial component of Malvaticin[®], the quinoxole (8-hydroxyquinoline), has the highest levels of susceptibility to this antibiotic. Same behavior.⁵⁰

As expected, Periogard[®] allowed the development of PL biofilms quantitatively equal to those of the control group after three days of treatment and which remained metabolically constant after seven days, although inferior to the seven day control. The active ingredient of the product, chlorhexidine 0.12%, was expected to contain bacterial growth due to its recognized antibacterial activity^{6,51-52} and substantivity.⁵³ However, a previous study showed that the contingency of PL-biofilm formation promoted by chlorhexidine 0,2% reaches 31.9% after 3 h and after 7 h is completely lost.⁵⁴ In "undisturbed" PL biofilms the remaining vitality remained in 27-40% after 7 h post-exposure.^{28,55} This maintenance in cellular vitality leads us to infer that the microenvironment of PL-biofilm alters bacterial physiology to the point of interfering positively in the survival of a considerable portion of the cells trapped in the matrix.

6. CONCLUSION

Although the tested rinses have not been shown to be sufficiently effective in promoting clinically desirable reductions of PL-biofilms, some of them appear to exert a retarding effect on de novo plaque formation (Malvatricin[®] (three days); Plax[®], Listerine[®], Periogard[®] and Malvatricin[®] (seven days)]. It is up to the clinician to consider its use, since some have adverse effects that may not justify such use.

7. BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

1. The U.S. Market for Oral Care Products, 4th Edition. Packaged facts. Market research group, LLC. Rockville, MD. 328 pp. 2012.
2. Brazilian Association of the Personal Hygiene, Perfumery and Cosmetics Industry. Spreadsheet with data of consumption of oral hygiene products in Brazil between 2000 and 2004. São Paulo, 2005.
3. Haq MW, Batool M, Ahsan SH, Sharma G. Efficacy of antiplaque mouthwashes: a five-day clinical trial. *Gen Dent.* 2011; 59 (3): 110-115.
4. Lamont T. Lower concentration of chlorhexidine and cetyl-pyridinium chloride mouthwash demonstrates some efficacy. *Evid Based Dent.* 2012; 13 (2): 52-53.
5. Shapiro S, Giertsen E, Guggenheim B. An in vitro oral biofilm model for comparing the efficacy of antimicrobial mouthrinses. *Caries Res.* 2002; 36 (2): 93-100.
6. Maruo IT, Rosa EA, Maruo H, Tanaka O, Guariza Filho O, Ignácio SA, Camargo ES. Effect of chlorhexidine mouth rinse on streptococci counts of tooth-tissue-borne palatal expander biofilm. *Orthod Craniofac Res.* 2008; 11 (3): 136-142.
7. Zanatta FB, Antoniazzi RP, Rösing CK. The effect of 0.12% chlorhexidine gluconate on platelet-free and plaque-covered surfaces: a randomized, controlled clinical trial. *J Periodontol.* 2007; 78 (11): 2127-2134.
8. Fine DH, Furgang D, Barnett ML. Comparative antimicrobial activities of antiseptic mouthrinses against isogenic planktonic and biofilm forms of

- Actinobacillus actinomycetemcomitans. J Clin Periodontol. 2001; 28 (7): 697-700.
9. Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. Emerg Infect Dis. 2002; 8 (9): 881-890.
10. Høy N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. Int J Antimicrob Agents. 2010; 35 (4): 322-332.
11. Olson ME, Ceri H, Morck DW, Buret AG, Read RR. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. Can J Vet Res. 2002; 66 (2): 86-92.
12. Brambilla E, Ionescu A, Gagliani M, Cochis A, Arciola CR, Rimondini L. Biofilm formation on composite resins for dental restorations: an on-site study on the effect of chlorhexidine mouthrinses. Int J Artif Organs. 2012; 35 (10): 792-799.
13. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods. 1983; 65 (1-2): 55-63.
14. Freires IA, Denny C, Benso B, de Alencar SM, Rosalen PL. Antibacterial activity of essential oils and their isolated constituents against cariogenic bacteria: a systematic review. Molecules. 2015; 20 (4): 7329-7358.
15. Food and Drug Administration (FDA). Oral health care drug products for over-the-counter human use; Antigingivitis / antiplaque drug products; Establishment of a monograph. Federal Register. 2003; 68 (103): 32232-32287.

16. Beyth N, Haramaty O, Polak D. Focal drug delivery for management of oral infections. In: Domb AJ, Khan W (editors). Focal controlled drug delivery. Springer: New York, p.305-328. 2014.
17. Cummins D., Creeth JE. Delivery of antiplaque agents from dentifrices, gels, and mouthwashes. *J Dent Res.* 1992; 71 (7): 1439-1449.
18. Hannig C, Hannig M. The oral cavity-a key system to understand substratum-dependent bioadhesion on solid surfaces in man. *Clin. Oral Investig.* 2009; 13: 123-139.
19. Auschill TM, Hellwig E, Sculean A, Hein N, Arweiler NB. Impact of the intraoral location on the rate of biofilm growth. *Clin. Oral Investig.* 2004; 8: 97-101.
20. Palmer RJ Jr, Wu R, Gordon S, Bloomquist CG, Liljemark WF, Kilian M, Kolenbrander PE. Retrieval of biofilms from the oral cavity. *Methods Enzymol.* 2001; 337: 393-403.
21. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 1999; 284: 1318-1322.
22. Prada-López I, Quintas V, Vilaboa C, Suárez-Quintanilla D, Tomás I. Devices for in situ development of non-disturbed oral biofilm. A systematic review. *Front Microbiol.* 2016; 7: 1055.
23. Sreenivasan PK, Haraszthy VI, Zambon JJ. Antimicrobial efficacy of 0.05% cetylpyridinium chloride mouthrinses. *Lett Appl Microbiol.* 2013; 56 (1): 14-20.

24. Auschill TM, Hein N, Hellwig E, Follo M, Sculean A, Arweiler NB. Effect of two antimicrobial agents on early biofilm formation in situ. *J Clin Periodontol.* 2005; 32 (2): 147-152.
25. Quintas V, Prada-López I, Donos N, Suárez-Quintanilla D, Tomás I. Antiplaque effect of essential oils and 0.2% chlorhexidine on an in situ model of oral biofilm growth: a randomized clinical trial. *PLoS One*, 2015a; 10 (2): e0117177.
26. Mouchrek Junior JC, Nunes LH, Arruda CS, Rizzi Cde C, Mouchrek AQ, Tavares RR, Tonetto MR, Bandeca MC, Maia Filho EM. Effectiveness of oral antiseptics on tooth biofilm: a study in vivo. *J Contemp Dent Pract.* 2015; 16 (8): 674-678.
27. Neely AL. Essential oil mouthwash (EOMW) may be equivalent to chlorhexidine (CHX) for long-term control of gingival inflammation but CHX appears to perform better than EOMW in plaque control. *J Evid Based Dent Pract.* 2012; 12 (3): 69-72.
28. García-Caballero L, Quintas V, Prada-López I, Seoane J, Donos N, Tomás I. Chlorhexidine substantivity on salivary flora and plaque-like biofilm: an in situ model. *PLoS One.* 2013; 8 (12): e83522.
29. Ramberg P, Furuichi Y, Volpe AR, Gaffar A, Lindhe J. The effects of antimicrobial mouthrinses on new plaque formation at sites with healthy and inflamed gingivae. *J Clin Periodontol.* 1996; 23 (1): 7-11.

30. Witorsch RJ. Critical analysis of endocrine disruptive activity of triclosan and its relevance to human exposure through the use of personal care products. *Crit Rev Toxicol.* 2014; 44 (6): 535-555.
31. Kumar V, Balomajumder C, Roy P. Disruption of LH-induced testosterone biosynthesis in testicular Leydig cells by triclosan: probable mechanism of action. *Toxicology.* 2008; 250 (2-3): 124-131.
32. Crofton KM, Paul KB, Devito MJ, Hedge JM. Short-term in vivo exposure to the water contaminant triclosan: Evidence for disruption of thyroxine. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2007; 24 (2): 194-197.
33. Raut SA, Angus RA. Triclosan has endocrine-disrupting effects in male western mosquitofish, *Gambusia affinis*. *Environ Toxicol Chem.* 2010; 29 (6): 1287-1291.
34. Fair PA, Lee HB, Adams J, Darling C, Pacepavicius G, Alaei M, Bossart GD, Henry N, Muir D. Occurrence of triclosan in plasma of Atlantic bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) and in their environment. *Environ Pollut.* 2009; 157 (8-9): 2248-2254.
35. Veldhoen N, Skirrow RC, Osachoff H, Wigmore H, Clapson DJ, Gunderson MP, Van Aggelen G, Helbing CC. The bactericidal agent triclosan modulates thyroid hormone-associated gene expression and disrupts postembryonic anuran development. *Aquat Toxicol.* 2006; 80 (3): 217-227.
36. SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety), Opinion on triclosan (antimicrobial resistance), 22 June 2010.

37. Minnesota Senate. Information for S.F. No. 2192. 2013-2014 Biennium Eighty-Eighth Legislature. Regular Session. 2014.
38. European Committee for Standardization. Standard EN13727. Chemical disinfectants and antiseptics - Quantitative suspension test for the evaluation of bactericidal activity in medical area - Test method and requirements (phase 2 / step 1) CEN. 2012.
39. Elisia I, Popovich DG, Hu C, Kitts DD. Evaluation of viability assays for anthocyanins in cultured cells. *Phytochem Anal.* 2008; 19 (6): 479-486
40. Takahashi N. Oral microbiome metabolism: from "who are they?" To what are they doing? *J Dent Res.* 2015; 94 (12): 1628-1637.
41. Kurkivuori J, Salaspuro V, Kaihovaara P, Kari K, Rautemaa R, Grönroos L, Meurman JH, Salaspuro M. Acetaldehyde production from ethanol by oral streptococci. *Oral Oncol.* 2007; 43 (2): 181-186.
42. Salaspuro V, Salaspuro M. Synergistic effect of alcohol drinking and smoking on in vivo acetaldehyde concentration in saliva. *Int J Cancer.* 2004; 111 (4): 480-483.
43. Poggi P, Rodriguez and Baena R, Rizzo S, Route MT. Mouthrinses with alcohol: cytotoxic effects on human gingival fibroblasts in vitro. *J Periodontol.* 2003; 74 (5): 623-629.
44. Moazzez R, Thompson H, Palmer RM, Wilson RF, Proctor GB, Wade WG. Effect of rinsing with ethanol-containing mouthrinses on the production of salivary acetaldehyde. *Eur J Oral Sci.* 2011; 119 (6): 441-446.

45. Salaspuro V, Hietala J, Kaihovaara P, Pihlajarinne L, Marvola M, Salaspuro M. Removal of acetaldehyde from saliva by a slow-release buccal tablet of L-cysteine. *Int J Cancer*. 2002; 97 (3): 361-364.
46. Palmer RJ Jr, Gordon SM, Cisar JO, Kolenbrander PE. Coaggregation-mediated interactions of streptococci and *Actinomyces* detected in initial human dental plaque. *J Bacteriol*. 2003; 185: 3400-3409.
47. Kim JY, Jun JH, Kim SJ, Hwang KM, Choi SR, Han SD, Son MW, Park ES. Wound healing efficacy of a chitosan-based film-forming gel containing tyrothricin in various rat wound models. *Arch Pharm Res* 2015, 38: 229-238.
48. Al-Ahmad A, Wunder A, Auschill TM, Follo M, Braun G, Hellwig E, Arweiler NB. The in vivo dynamics of *Streptococcus* spp., *Actinomyces naeslundii*, *Fusobacterium nucleatum* and *Veillonella* spp. In dental plaque biofilm as analyzed by five-color multiplex fluorescence in situ hybridization. *J Med Microbiol*. 2007; 56 (5): 681-687.
49. Baker PJ, Evans RT, Slots J, Genco RJ. Susceptibility of human oral anaerobic bacteria to antibiotics suitable for topical use. *J Clin Periodontol*. 1985; 12 (3): 201-208.
50. Frier M. Derivatives of 4-amino-quinaldinium and 8-hydroxyquinoline. In: Hugo WB. Inhibition and destruction of microbial cell. London: Academic Press Ltd. p.107-120. 1971.
51. Rath SK, Singh M. Comparative clinical and microbiological efficacy of mouthwashes containing 0.2% and 0.12% chlorhexidine. *Dent Res J (Isfahan)*. 2013; 10 (3): 364-369.

52. Berchier CE, Slot DE, Van der Weijden GA. The efficacy of 0.12% chlorhexidine mouthrinse compared with 0.2% on plaque accumulation and periodontal parameters: a systematic review. *J Clin Periodontol.* 2010; 37 (9): 829-839.
53. Tomás I, Cousido MC, García-Caballero L, Rubido S, Limeres J, Says P. Substantivity of a single chlorhexidine mouthwash on salivary flora: influence of intrinsic and extrinsic factors. *J Dent.* 2010; 38 (7): 541-546.
54. Quintas V, Prada-López I, Donos N, Suárez-Quintanilla D, Tomás I. In situ neutralization of the antibacterial effect of 0.2% Chlorhexidine on salivary microbiota: quantification of substantivity. *Arch Oral Biol.* 2015b; 60 (8): 1109-1116.
55. Quintas V, Prada-López I, Prados-Frutos JC, Tomás I. In situ antimicrobial activity on oral biofilm: essential oils. 0.2% chlorhexidine. *Clin Oral Investig.* 2015c; 19 (1): 97-107.
56. Medeiros, E. P. G. Pre-admission dental examination. *The incisor.* 1965; 4 (1): 18-22.

ANEXO 1: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa: **Avaliação *in situ* da eficácia de enxaguatórios bucais no controle de PL-biofilme**

A JUSTIFICATIVA, OS OBJETIVOS E OS PROCEDIMENTOS: O motivo que nos leva a estudar os enxaguatórios bucais é a diferença nas formulações. Uma das razões para essa disparidade de opiniões está centrada no fato de que ensaios *in vitro* foram conduzidos quase que exclusivamente em biofilmes crescidos de forma estática. O objetivo desse projeto é avaliar as capacidades anti-placa de formulações dos principais enxaguatórios bucais comercializados no Brasil por meio de um estudo *in situ*. O procedimento de coleta de material será realizado da seguinte forma: 3 corpos de prova da placa de cada indivíduo no 3º dia de tratamento e os outros 3 corpos de prova no 7º. dia de tratamento.

DESCONFORTOS, RISCOS E BENEFÍCIOS: Existe um desconforto e risco mínimo durante o uso da placa de acetato para você que se submeter a esta pesquisa.

FORMA DE ACOMPANHAMENTO E ASSISTÊNCIA: As placas serão mantidas na boca durante 24 horas, por 7 dias, sendo removidas somente durante a alimentação e higiene oral, realizada com o creme dental e a escova nova que serão entregues desde o início da pesquisa. Durante a alimentação e higienização o voluntário colocará a placa em uma caixa de tampa hermética.

GARANTIA DE ESCLARECIMENTO, LIBERDADE DE RECUSA E GARANTIA DE SIGILO: Você será esclarecido (a) sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar. Você é livre para recusar-se a participar, retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não irá acarretar qualquer penalidade ou perda de benefícios.

O(s) pesquisador (es) irá(ão) tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Os resultados do exame laboratorial, da pesquisa, serão enviados para você e permanecerão confidenciais. Seu nome ou o material que indique a sua participação não será liberado sem a sua permissão. Você não será identificado (a) em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo. Uma cópia deste consentimento informado será arquivada no Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná e outra será fornecida a você.

CUSTOS DA PARTICIPAÇÃO, RESSARCIMENTO E INDENIZAÇÃO POR EVENTUAIS DANOS: A participação no estudo não acarretará custos para você e não será disponível nenhuma compensação financeira adicional. No caso de você sofrer algum dano decorrente

dessa pesquisa você deverá comunicar imediatamente o pesquisador responsável para ele tomar as devidas providências.

DECLARAÇÃO DO (A) PARTICIPANTE OU DO (A) RESPONSÁVEL PELA

PARTICIPANTE: Eu, _____ fui informado (a) dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e motivar minha decisão se assim o desejar. O professor orientador Prof. Edvaldo Antonio Ribeiro Rosa e o Orientado Fabiano Geronasso Simões certificaram-me de que todos os dados desta pesquisa serão confidenciais.

Também sei que caso existam gastos adicionais, estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa. Em caso de dúvidas poderei chamar o cirurgião-dentista orientado Fabiano Geronasso Simões no telefone (41) 32620227; 99880888 ou Comitê de Ética em Pesquisa.

Declaro que concordo em participar desse estudo. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Nome	Assinatura do Participante	Data
Nome	Assinatura do Pesquisador	Data
Nome	Assinatura da Testemunha	Data



Comitê de Ética
em Pesquisa da
PUCPR

ASSOCIAÇÃO PARANAENSE
DE CULTURA - PUCPR



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Eficácia de enxaguatórios bucais na erradicação de biofilme polimicrobiano : estudo in situ

Pesquisador: FABIANO GERONASSO SIMOES

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 30936114.6.0000.0020

Instituição Proponente: Pontifícia Universidade Católica do Paraná - PUCPR

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 700.675

Data da Relatoria: 18/06/2014

Apresentação do Projeto:

Diversos fatores competem contribuindo ou dificultando a instalação e o desenvolvimento do biofilme dental. Os enxaguatórios bucais (EBs) têm sido indicados como adjuvantes na profilaxia de doenças bucais, embora não haja uma unanimidade de opinião. Sendo assim, serão conduzidos desafios diários (2 X ao dia) com Cepacol® Solução, Listerine® Whitening, Malvatricin®, Colgate Plax® e Periogard®. E ao término dos experimentos, as biomassas dos biofilmes serão estimadas em função das variações de taxa metabólica (MTT) por milímetro quadrado (MA.mm² -1), para avaliação de suas capacidades anti-placa.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

A proposição do projeto que ora se apresenta é avaliar a alegada atividade "anti-placa" de formulações dos principais enxaguatórios bucais comercializados no Brasil por meio de um estudo in situ.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos e benefícios apresentados estão adequados e de acordo com a resolução 466/2012.

Endereço: Rua Imaculada Conceição 1155

Bairro: Prado Velho

CEP: 80.215-901

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3271-2292

Fax: (41)3271-2292

E-mail: nep@pucpr.br

Continuação do Parecer: 700.675

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A metodologia e objetivos apresentados estão adequados e em acordo com a resolução 466/2012.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos apresentados estão adequados e em acordo com a resolução 466/2012.

Recomendações:

Ver Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Lembramos aos senhores pesquisadores que, no cumprimento da Resolução 466/2012, o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) deverá receber relatórios anuais sobre o andamento do estudo, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância, além do envio dos relatos de eventos adversos, para conhecimento deste Comitê. Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do estudo. Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEPPUCPR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas. Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por este CEP em qualquer tempo.

Endereço: Rua Imaculada Conceição 1155
Bairro: Prado Velho **CEP:** 80.215-901
UF: PR **Município:** CURITIBA
Telefone: (41)3271-2292 **Fax:** (41)3271-2292 **E-mail:** nep@pucpr.br



Comitê de Ética
em Pesquisa da
PUCPR

ASSOCIAÇÃO PARANAENSE
DE CULTURA - PUCPR



Continuação do Parecer: 700.675

CURITIBA, 27 de Junho de 2014

Assinado por:
NAIM AKEL FILHO
(Coordenador)

Endereço: Rua Imaculada Conceição 1155

Bairro: Prado Velho

CEP: 80.215-901

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3271-2292

Fax: (41)3271-2292

E-mail: nep@pucpr.br