



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

PATRICK SABOIA BESERRA

**ESTREPTOCOCOS ORAIS RESISTENTES À AMOXICILINA – ADESÃO,
FORMAÇÃO DE BIOFILME E SUSCETIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS
ALTERNATIVOS E CLOREXIDINA**

TERESINA

2025

PATRICK SABOIA BESERRA

**ESTREPTOCOCOS ORAIS RESISTENTES À AMOXICILINA – ADESÃO,
FORMAÇÃO DE BIOFILME E SUSCETIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS
ALTERNATIVOS E CLOREXIDINA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia (PPGO) da Universidade Federal do Piauí como requisito para a obtenção do título de Mestre em Odontologia.
Área de Concentração: Ciências Odontológicas.
Linha de Pesquisa: Biociências e Materiais Odontológicos.
Orientador: Prof. Dr. Patrick Veras Queleães

BANCA EXAMINADORA

1) Prof. Dr. Patrick Veras Queleães
Titulação: Doutor em Biotecnologia (Biotecnologia em Saúde)

2) Profa. Dra. Maria José dos Santos Soares
Titulação: Doutora em Ciências (Microbiologia)

3) Prof. Dr. Gláuber Campos Vale
Titulação: Doutor em Odontologia (Cariologia)

Suplente:

1) Prof^a. Dr^a. Thaís Torres Barros Dutra
Titulação: Doutora em Odontologia

Dedico este trabalho aos meus pais, pelo amor incondicional e irrestrito, por serem meus parceiros de vida; aos meus familiares e amigos próximos pelo apoio e, a todos que direta ou indiretamente colaboraram com a materialização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, agradeço a **Deus** pela minha vida, vida das pessoas que me cercam e me apoiam.

Aos meus pais, **Dorinha e Jonas** pelo suporte irrestrito desde o dia que nasci, eles são meus alicerces e responsáveis por tudo que tenho e que construí até aqui. Aos meus amigos, especialmente **Carol Ferrer e Lucas Maia**, por estarem presentes e serem meus parceiros leais durante tanto tempo, desde os momentos mais felizes até aqueles mais difíceis.

Ao meu orientador, professor **Dr. Patrick Quelemes**, sobretudo por sua paciência, sinceridade, competência, sabedoria e seus “puxões de orelha”. Saio do mestrado com mais “casca” e com um aprendizado enorme na bagagem. Agradeço também ao meu orientador por me tornar mais resiliente e por me fazer enxergar sob outras perspectivas as diferentes situações que surgiram durante o mestrado.

A Universidade Federal do Piauí, por ter me abrigado por mais dois anos. Ao todo já são 9 anos e meio de UFPI!

Aos professores do Programa de Pós-graduação de Odontologia pelo conhecimento compartilhado e por sua perseverança em fazer o melhor pela pós-graduação.

A professora **Dra. Maria José Soares**, por ter aberto as portas do seu laboratório para que eu pudesse realizar minha pesquisa. A doutoranda e amiga **Alyne Lopes** por ter me ensinado tanto, ter literalmente pego em minha mão, por ser um exemplo de organização, delicadeza, empatia e humildade. Sem dúvidas tê-la conhecido foi um diferencial na minha trajetória. A funcionária **Miriam Albino** que é outro exemplo de perseverança e luta e que sempre me recebeu com muito carinho e de braços abertos. Aos demais colaboradores do laboratório e do LASAN-UFPI.

Aos meus amigos do mestrado, pessoas de confiança que dividi alegrias, experiências diversas, conquistas, tristezas, insatisfações, frustrações e inseguranças e que foram fundamentais no processo, aqui destaco: **Meiryellen, Simonny, Guedes e Ariane**.

A minha psicóloga **Cláudia**, por me acolher, me ouvir e me ajudar na condução dos pensamentos.

A **mim** mesmo por ter chegado até aqui.

Aos **membros da banca examinadora**, pelas observações e sugestões que certamente enriquecerão este trabalho e a minha formação como mestre.

RESUMO

Introdução: A endocardite infecciosa (EI) representa um risco significativo para crianças com cardiopatias congênitas ou portadoras de próteses valvares, podendo ser decorrente de bacteremia associada a procedimentos odontológicos invasivos. Dentre os microrganismos mais envolvidos nessa patologia, destacam-se os estreptococos do grupo viridans, cujos perfis de virulência incluem adesão e formação de biofilme. Embora a profilaxia antibiótica (PA) com amoxicilina (AMX) seja recomendada como prevenção à EI, a crescente resistência dos estreptococos orais a esse antibiótico compromete sua eficácia, evidenciando a necessidade de antibióticos alternativos e de estratégias complementares que possam diminuir a bacteremia, como o uso de antissépticos. **Objetivo:** Avaliar o perfil fenotípico de adesão e formação de biofilme de estreptococos orais resistentes à amoxicilina (EORA), bem como sua suscetibilidade a antibióticos alternativos e à clorexidina (CHX). **Material e Métodos:** Vinte e cinco cepas de EORA, previamente isoladas da cavidade bucal de crianças cardiopatas com risco para EI, foram analisadas por meio de ensaios *in vitro*. A adesão à matriz extracelular (MEC) foi avaliada por meio da incubação das bactérias por 1,5 hora em poços de placas revestidos com colágeno do tipo I. A formação de biofilme de 24 horas foi analisada utilizando-se a coloração por cristal violeta. A susceptibilidade antimicrobiana foi determinada pelo método de difusão em ágar com discos dos antibióticos azitromicina (AZI), claritromicina (CLA), eritromicina (ERI) e clindamicina (CLI), com a subsequente verificação da presença dos fenótipos de resistência M e MLS. Também foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) da CHX e seu efeito, na concentração de 0,12%, sobre biofilmes pré-formados, por meio do ensaio metabólico do XTT. Os dados foram analisados estatisticamente utilizando-se ANOVA de uma ou duas vias, seguida dos pós-testes apropriados, sendo o nível de significância fixado em 5%. **Resultados:** A maioria dos EORA (84%) apresentou alto padrão de adesão à MEC. Quanto à formação de biofilme, 64% foram classificadas como fortes formadores de biofilme, enquanto 32% foram considerados moderados produtores. Foi observada uma elevada taxa de resistência aos macrolídeos, em que 60% das cepas apresentaram resistência simultânea à ERI, AZI e CLA. Em contraste, a CLI manteve ampla eficácia, com 96% dos isolados classificados como sensíveis. Apenas uma cepa apresentou resistência à CLI, com concomitante resistência aos três macrolídeos testados, caracterizando-a como multirresistente, já que também apresentava resistência à AMX. A CIM da CHX foi de 2 µg/mL para todos os isolados, e o tratamento com CHX a 0,12% eliminou a viabilidade dos biofilmes ($p < 0,0001$). **Conclusão:** Os EORA demonstraram alta capacidade de adesão à MEC e formação de biofilme. Verificou-se também uma preocupante prevalência de resistência aos macrolídeos. No entanto, a CHX mostrou-se altamente eficaz frente às formas planctônicas e organizadas em biofilme dos isolados testados.

Palavras-Chave: Placa dental, matriz extracelular, resistência a antibióticos, enxágue bucal.

ABSTRACT

Introduction: Infective endocarditis (IE) poses a significant risk for children with congenital heart disease or prosthetic valves and may result from bacteremia associated with invasive dental procedures. Among the most frequently implicated microorganisms in this condition are viridans group streptococci, whose virulence traits include adhesion and biofilm formation. Although antibiotic prophylaxis (AP) with amoxicillin (AMX) is recommended to prevent IE, the increasing resistance of oral streptococci to this antibiotic compromises its effectiveness. This highlights the need for alternative antibiotics and complementary strategies to reduce bacteremia, such as the use of antiseptics. **Objective:** To evaluate the phenotypic profile of adhesion and biofilm formation of amoxicillin-resistant oral streptococci (AROS), as well as their susceptibility to alternative antibiotics and chlorhexidine (CHX). **Materials and Methods:** Twenty-five AROS strains, previously isolated from the oral cavity of children with heart disease at risk for IE, were analyzed through *in vitro* assays. Adhesion to the extracellular matrix (ECM) was assessed by incubating the bacteria for 1.5 hours in collagen type I-coated wells. Biofilm formation after 24 hours was analyzed using crystal violet staining. Antimicrobial susceptibility was determined by agar diffusion against azithromycin (AZI), clarithromycin (CLA), erythromycin (ERI), and clindamycin (CLI), followed by the identification of M and MLS resistance phenotypes. The minimum inhibitory concentration (MIC) of CHX was determined, as well as its effect at 0.12% on preformed biofilms using the XTT metabolic assay. Data were statistically analyzed by one- or two-way ANOVA, followed by appropriate post hoc tests, with a significance level of 5%. **Results:** Most AROS strains (84%) exhibited a high adhesion pattern to ECM. Regarding biofilm formation, 64% were classified as strong biofilm producers, while 32% were moderate producers. A high rate of moderate or intermediate resistance to macrolides was observed, with 60% showing simultaneous resistance to ERI, AZI, and CLA. In contrast, CLI remained broadly effective, with 96% of strains classified as sensitive. Only one strain was resistant to CLI and simultaneously resistant to all three macrolides tested, characterizing it as multidrug-resistant due to its concurrent resistance to AMX. The MIC of CHX was 2 µg/mL for all isolates, and treatment with CHX at 0.12% eliminated biofilm viability ($p < 0.0001$). **Conclusion:** AROS strains demonstrated high adhesion capacity to ECM and significant biofilm-forming ability. A concerning prevalence of macrolide resistance was identified. Nevertheless, CHX proved to be highly effective against both planktonic and biofilm-associated forms of the tested isolates.

Keywords: Dental plaque, extracellular matrix, antibiotic resistance, mouthwash.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Cepas de EORA classificadas de acordo com a produção de biofilme.....	49
Tabela 2: Perfis de suscetibilidade antibiótica (macrolídeos e clindamicina) das cepas de estreptococos estudadas.....	50
Tabela 3: Suscetibilidade a clorexidina.....	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Adesão a matriz de colágeno.....	46
Figura 2 - Formação do biofilme.....	48
Figura 3 - Heatmap dos perfis de suscetibilidade de isolados clínicos de Streptococcus a macrolídeos e clindamicina.....	51
Figura 4 - Ensaio do XTT.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

EI	Endocardite infecciosa
AHA	<i>American Heart Association</i>
VGS	Estreptococos do grupo viridans
PA	Profilaxia antibiótica
CHX	Clorexidina
MEC	Matriz extracelular
AZI	Azitromicina
CLA	Claritromicina
ERI	Eritromicina
CLI	Clindamicina
CIM	Concentração inibitória mínima
EORA	Estreptococos orais resistentes a amoxicilina
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
TFS	Tampão fosfato-salino
UFC	Unidades formadoras de colônia
TSB	<i>Tryptic soy broth</i> (caldo de triptcaseína de soja)
TSA	<i>Tryptic soy agar</i> (ágar de triptcaseína de soja)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO DE LITERATURA	29
4. DESENVOLVIMENTO (ARTIGO A SER SUBMETIDO).....	34
5. ANEXO	64

1. INTRODUÇÃO

A endocardite infecciosa (EI) é uma condição sistêmica grave com importantes implicações para a prática odontológica, especialmente em indivíduos com cardiopatias congênitas ou próteses valvares.^{1,2} A doença geralmente resulta de bacteremia decorrente de procedimentos odontológicos invasivos, como extrações dentárias, raspagens periodontais e tratamentos endodônticos.³ Dentre os principais microrganismos envolvidos, destacam-se os estreptococos do grupo viridans, que apresentam fatores de virulência relacionados à adesão e à formação de biofilme.^{4,5}

A *American Heart Association* (AHA) recomenda a profilaxia antibiótica (PA) com amoxicilina (AMX) por via oral para pacientes de risco a serem submetidos a procedimentos odontológicos invasivos.⁶ No entanto, relatos crescentes de resistência à AMX entre os estreptococos orais, especialmente em indivíduos com cardiopatia congênita, têm levantado preocupações quanto à eficácia da PA convencional.⁷⁻⁹ Além disso, essa resistência pode também ser cumulativa para antibióticos alternativos, incluindo macrolídeos e clindamicina¹⁰, utilizados em pacientes alérgicos às penicilinas.

A capacidade desses microrganismos de aderir a válvulas cardíacas, materiais protéticos e superfícies endocárdicas lesadas potencializa sua patogenicidade, especialmente quando associada a possíveis alterações fenotípicas de adesão e formação de biofilme.^{4,11} Como abordagem preventiva complementar, o uso de antissépticos como a clorexidina (CHX) antes de procedimentos odontológicos tem sido utilizado para reduzir a carga microbiana oral.¹² No entanto, são escassos os estudos que avaliam a eficácia da CHX frente a estreptococos orais resistentes a antibióticos.¹³

Diante disso, o presente estudo teve como objetivo avaliar os perfis fenotípicos de adesão e formação de biofilme de estreptococos resistentes à amoxicilina, previamente isolados da cavidade bucal de crianças com risco para EI.⁹ Além disso, buscou-se investigar a suscetibilidade dessas cepas a antibióticos alternativos, bem como à CHX, tanto em formas planctônicas quanto em biofilmes. A hipótese é que esses estreptococos resistentes à AMX apresentam elevados padrões de virulência e resistência a outros antibióticos, embora sejam suscetíveis à CHX.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Esta revisão foi elaborada com base em artigos indexados nas bases de dados PubMed e Portal da Capes abrangendo o período de 2011-2025. Foi utilizada a seguinte chave de busca com o auxílio dos operadores booleanos OR e AND: ("*Streptococcus*" OR "*oral streptococci*") AND ("*amoxicillin resistance*" OR "*antibiotic resistance*") AND ("*biofilm formation*" OR "*bacterial adhesion*" OR "*collagen adhesion*") AND ("*chlorhexidine*" OR "*alternative antibiotics*") AND ("*oral cavity*" OR "*dental*" OR "*endocarditis risk*"). Foram incluídos nesta revisão de literatura, 19 artigos descritos em ordem cronológica de publicação, conforme normas do Programa de Pós-graduação em Odontologia da UFPI. Para facilitar a compreensão, a revisão foi organizada nos seguintes tópicos: Microbiota oral e estreptococos orais; Adesão bacteriana e formação de biofilme; Resistência a amoxicilina; Clorexidina; Endocardite infecciosa. A caracterização quanto a autor, ano e informações relevantes dos artigos que compõem o referencial teórico deste projeto está apresentada no quadro 1.

2.1 Microbiota oral e estreptococos orais

Caselli *et al.* (2020) realizaram uma pesquisa com o objetivo de catalogar o microbioma oral de indivíduos saudáveis, incluindo características de resistência a antimicrobianos. Ao todo foram selecionados 10 homens e 10 mulheres segundo os critérios de inclusão. Foram coletadas amostras de diferentes regiões bucais: dorso lingual, palato duro, mucosa jugal, gengiva inserida, placa supra e subgengival e saliva. Cada nicho foi

avaliado isoladamente evidenciando comunidades microbianas diferentes em cada um deles, o que incluiu bactérias, fungos e vírus. *Streptococci* foi o gênero bacteriano mais prevalente, com as espécies *S. oralis*, *S. mitis*, *S. mutans*, *S. sobrinus*, sendo descritas. Observou-se a presença de genes de resistência a macrolídeos (erm B e mef A) em bactérias do grupo viridans (VGS), o mecanismo de resistência descrito foi a bomba de efluxo.

Han *et al.* (2022) reuniram informações acerca da relação de influência mútua entre a composição diversa da microbiota oral associada à presença da doença inflamatória intestinal e vice-versa. Observou-se que o gênero *Streptococci* é o mais prevalente e que existe uma translocação de micro-organismos entre a cavidade oral com o intestino, o que sugere sob determinadas condições que essa colonização esteja envolvida na patogênese de afecções gastrintestinais e orais. Através de procedimentos odontológicos invasivos *S. mutans* e *S. sanguinis* são capazes de cair na corrente sanguínea e expressar a formação de proteínas ligadoras de colágeno. Tais proteínas podem estimular os hepatócitos a produzirem citocinas inflamatórias, além do mais, essas bactérias induzem as células de defesa (linfócitos CD4 e CD8) a também produzirem citocinas que podem agravar a inflamação da mucosa intestinal.

Bloch *et al.* (2024) discutiram acerca da diversidade de espécies estreptocócicas presentes na microbiota oral, seu papel na homeostase local, sua implicação para a saúde e sua patogênese bucal chamando atenção aos fatores de virulência específicos que tais espécies utilizam. Dentre os estreptococos do grupo viridans (VGS) o mais prevalente foi o *S. mitis*. Os autores trazem que os VGS induzem a expressão de citocinas pró-inflamatórias em células endoteliais primárias de artérias coronárias humanas assim como indução de citocinas em células sinoviais, o que sugere seu papel na etiologia da endocardite bacteriana e da doença reumática, respectivamente.

2.2 Adesão bacteriana e formação de biofilme

Hirromishi *et al.* (2019) exploraram como os estreptococos orais, especialmente os do grupo *viridans*, podem agir como agentes patogênicos em doenças sistêmicas, apesar de normalmente serem considerados comensais. Os estreptococos são os primeiros colonizadores da cavidade oral e participam ativamente na formação de biofilmes dentários. Quando esse equilíbrio é rompido, pode haver translocação bacteriana para outras partes do corpo por meio de bacteremia (p. ex., procedimentos odontológicos invasivos), desencadeando doenças como endocardite infecciosa, meningite, pneumonia, doenças intestinais, renais e autoimunes. Os autores descrevem diversos fatores de virulência dos estreptococos, incluindo proteínas de adesão (como Antigen I/II, proteínas de ligação ao colágeno e fibronectina), pili, enolase, toxinas como a SpeB, peptidases, e estruturas que favorecem evasão do sistema imune. Destacam também o papel do DNA extracelular (eDNA) e das proteínas semelhantes a histonas (HLP) na formação e manutenção dos biofilmes, além de seu potencial inflamatório. A sinalização bacteriana via c-di-GMP, um mensageiro intracelular, também é apontada como essencial na transição entre vida livre e biofilme, regulando virulência e formação da matriz extracelular. Por fim, autores concluem que os biofilmes orais são uma fonte importante de infecção sistêmica, especialmente em idosos e imunossuprimidos, e defende o desenvolvimento de estratégias preventivas que não dependam apenas de antibióticos, considerando como alvos terapêuticos o eDNA, HLP e vias de sinalização como c-di-GMP.

Em uma pesquisa conduzida por Katsumata *et al.* (2021) foram analisadas seis proteínas de superfície dependentes da enzima sortase A (SrtA) em *Streptococcus mutans*, uma bactéria associada à cárie dental. Foram criados mutantes deficientes em cada proteína

e em SrtA para avaliar adesão à saliva, formação de biofilme, agregação e ligação à matriz extracelular de colágeno. O mutante sem SrtA apresentou redução drástica em todas essas funções. Entre as proteínas, SpaP teve o maior impacto individual, especialmente na adesão salivar e ligação ao colágeno. Os demais mutantes mostraram efeitos mais discretos, sugerindo que essas proteínas atuam de forma coordenada na virulência da bactéria.

Wang *et al.* (2021) realizaram uma pesquisa para avaliar o impacto de cinco extratos de chá (verde, oolong, preto, pu-erh e crisântemo) sobre a formação de biofilme por espécies de *Streptococcus* orais (*S. mutans*, *S. salivarius* e *S. mitis*) em diferentes superfícies (vidro, aço inox, hidroxiapatita e titânio). Os extratos influenciaram propriedades celulares importantes para adesão bacteriana, como hidrofobicidade da superfície celular e autoagregação. Os resultados mostraram que todos os extratos reduziram a hidrofobicidade celular (até 57,9%), e alguns modificaram significativamente a capacidade de autoagregação (aumentada por chá oolong e reduzida por chá pu-erh). A formação de biofilme foi inibida pelo chá pu-erh (até $-2,61 \log \text{ CFU/cm}^2$) e promovida pelo chá oolong (até $+0,81 \log \text{ CFU/cm}^2$). O chá de crisântemo reduziu o biofilme apenas em superfícies de titânio. A análise estatística do estudo revelou que a formação de biofilme está correlacionada com a combinação entre hidrofobicidade e autoagregação, mas não com cada uma isoladamente. O titânio foi a superfície mais suscetível à formação de biofilme, especialmente por *S. mutans*. As observações sugerem que os extratos de chá atuam interferindo nas propriedades físico-químicas celulares que influenciam a adesão bacteriana. Conclusivamente, os extratos de chá podem modular a formação de biofilme oral, e sua aplicação em produtos odontológicos pode oferecer benefícios adicionais no controle da microbiota oral e na prevenção de cáries e doenças periodontais.

Kumar et al (2024), revisaram o papel dos estreptococos orais, especialmente o grupo *viridans*, na saúde bucal e seu potencial envolvimento na carcinogênese. Esses microrganismos representam cerca de 80% da microbiota oral e são fundamentais na formação e manutenção do biofilme dental. Os autores destacam que certas espécies, como *Streptococcus mutans* e *S. anginosus*, estão associadas à progressão de tumores em locais como boca, esôfago, estômago, cólon e pulmões. Mecanismos como produção de metabólitos pró-inflamatórios, formação de biofilme, ativação do sistema imune, modulação da barreira mucosa e produção de acetaldeído (carcinógeno) foram discutidos. Além disso, o artigo apresenta estudos que relacionam essas bactérias ao aumento da expressão de IL-6 e ativação da via inflamatória NF- κ B em modelos de câncer. Por outro lado, algumas cepas de estreptococos demonstram efeitos protetores, suprimindo inflamações ou sendo exploradas como ferramentas terapêuticas, como probióticos ou veículos de entrega de fármacos em ambientes tumorais hipóxicos. Por fim, concluiu-se que, embora os estreptococos orais desempenhem papéis ambíguos — tanto pró quanto antitumorais —, sua compreensão pode abrir caminhos para estratégias não invasivas de diagnóstico precoce e terapias contra o câncer.

Sangeetha et al., (2024) investigaram como as bactérias orais *Streptococcus anginosus* e *Streptococcus mitis* afetam os macrófagos murinos (RAW264.7) em termos de morfologia, inflamação e metabolismo. *S. anginosus* induziu uma resposta imune inflamatória intensa, com aumento de citocinas pró-inflamatórias (TNF, IL-6, IL-1 β), ativação da via NF- κ B e expressão de enzimas inflamatórias como iNOS e COX2. Essa resposta foi acompanhada de mudanças morfológicas marcantes e reprogramação metabólica, incluindo aumento da glicólise (ECAR) e alterações em metabólitos como succinato e itaconato. Em contrapartida, *S. mitis* causou alterações morfológicas e

metabólicas mais sutis e não desencadeou uma resposta inflamatória significativa. Ambos não afetaram a viabilidade celular, sugerindo que os efeitos observados estão relacionados à ativação imune e não à toxicidade. Os resultados demonstram que essas duas espécies de estreptococos, embora do mesmo gênero e comensais da cavidade oral, provocam respostas imunes e metabólicas distintas nos macrófagos. Isso pode ter implicações importantes na compreensão do papel da microbiota oral em doenças inflamatórias e no câncer oral.

2.3 Resistência à amoxicilina

Nemoto *et al.* (2011) investigaram a presença de estreptococos orais altamente resistentes à amoxicilina (AMPC) em amostras de placa dental de 253 crianças e adolescentes saudáveis no Japão. Entre 344 amostras analisadas, 18 cepas (5,2%) de estreptococos com MICs ≥ 16 $\mu\text{g/mL}$ foram identificadas em 14 indivíduos (5,5%). As espécies resistentes incluíam *Streptococcus oralis*, *S. mitis*, *S. salivarius*, *S. sanguinis*, *S. parasanguinis* e *S. australis*. Essas cepas apresentaram também resistência cruzada a outras penicilinas e à eritromicina, mas permaneceram sensíveis à levofloxacina. A maioria dos isolados resistentes foi detectada apenas uma vez, sugerindo que podem ser transitórios. No entanto, em um paciente, os mesmos clones foram encontrados repetidamente, indicando possível colonização estável. Comparações com cepas isoladas de sangue mostraram que essas últimas tinham MICs muito mais baixas. Os autores alertam para a presença de cepas resistentes mesmo em indivíduos saudáveis e ressalta a importância do monitoramento da resistência antimicrobiana, especialmente para prevenção de endocardite infecciosa, onde a amoxicilina é amplamente usada como profilaxia.

Em outro estudo, Nemoto et al. (2013) avaliaram a presença de estreptococos orais resistentes à amoxicilina (AMPC) em 34 crianças e adolescentes japoneses com doenças cardíacas congênitas que os colocam em risco para endocardite infecciosa (EI). Amostras de placa dental foram coletadas e analisadas quanto à presença de cepas com concentração inibitória mínima (MIC) ≥ 16 $\mu\text{g/mL}$. Foi detectada resistência em 7 pacientes (20,6%), uma taxa significativamente maior que a observada em crianças saudáveis em estudo anterior (5,5%). As cepas resistentes identificadas incluíam *Streptococcus mitis*, *S. oralis*, *S. salivarius*, e *S. australis*. Algumas delas foram detectadas em coletas repetidas após 3 meses, sugerindo colonização persistente. Além da resistência à AMPC, as cepas também mostraram resistência cruzada a outras penicilinas, macrolídeos e cefalosporinas, mas foram suscetíveis às quinolonas levofloxacino e tosufloxacino. Os autores alertam para a necessidade de considerar antibióticos alternativos ao prescrever profilaxia para pacientes com risco de EI, especialmente diante da crescente presença de cepas resistentes na microbiota oral.

Numa pesquisa realizada por Suzuk et al. (2016) foi avaliada a suscetibilidade antimicrobiana de estreptococos do grupo *viridans* (VGS) presentes na microbiota oral de 49 pacientes com risco de endocardite infecciosa (EI), como aqueles com válvulas cardíacas protéticas ou doenças cardíacas reumáticas. Foram isoladas e identificadas bactérias de amostras de mucosa bucal e gengiva, e testada sua sensibilidade a penicilina, ampicilina e vancomicina. Os principais grupos encontrados foram *Streptococcus mitis* (32,6%), *S. anginosus* (32,6%), *S. sanguinis* (16,3%), *S. mutans* (12,2%) e *S. salivarius* (6,1%). A taxa de resistência ou sensibilidade reduzida foi de 61,2% para penicilina e 55,1% para ampicilina, enquanto todas as cepas foram sensíveis à vancomicina. O grupo *S. salivarius* apresentou 100% de resistência aos dois antibióticos beta-lactâmicos testados. Os autores

concluem que há uma alta taxa de resistência às penicilinas entre os VGS em pacientes com risco de EI, o que pode comprometer a eficácia de profilaxias com esses antibióticos. Ressaltam a importância de monitorar localmente a resistência antimicrobiana para guiar decisões terapêuticas e profiláticas mais eficazes.

Araújo-Júnior et al. (2022) realizaram uma revisão sistemática e meta-análise para investigar a prevalência de estreptococos resistentes à amoxicilina (AMPC-RS) na cavidade oral de crianças, com foco especial em indivíduos com risco de desenvolver endocardite infecciosa (EI). Foram analisados 13 artigos publicados entre 2000 e 2021, com metodologias variadas de isolamento bacteriano (biofilme dental, saliva, conteúdo endodôntico) e identificação (testes bioquímicos ou biologia molecular). A resistência foi avaliada por difusão em disco (38,3%), E-test (15,4%) e microdiluição (46,2%), com valores de concentração inibitória mínima (MIC) atingindo até 128 µg/mL, especialmente em espécies como *Streptococcus mitis*, *S. sanguinis*, *S. oralis* e *S. salivarius*. A prevalência de crianças portadoras de AMPC-RS variou entre 5,5% e 86,3% entre os estudos, sendo a média da meta-análise de 21,3% ($I^2 = 0\%$, $p = 0,705$), com baixa heterogeneidade. A maioria dos trabalhos foi classificada como de alta qualidade metodológica. Os achados ressaltam a necessidade de atenção à profilaxia antibiótica em crianças susceptíveis à EI, sugerindo que o uso indiscriminado de antibióticos pode comprometer a eficácia da amoxicilina como agente preventivo padrão.

Plainvert et al. (2023) realizaram um estudo multicêntrico, conduzido pelo Centro Nacional de Referência de Estreptococos da França, onde foram avaliados 522 casos de infecções invasivas causadas por estreptococos não beta-hemolíticos (NBHS) entre março e abril de 2021. As espécies mais prevalentes foram do grupo *Streptococcus anginosus* (33%), *S. mitis* (28%), *S. sanguinis* (16%), *S. bovis/equinus* (15%), *S. salivarius* (8%) e *S. mutans*

(<1%). A maioria dos casos ocorreu em homens (razão M/F de 2,1:1) e idosos (mediana de 68 anos). As principais manifestações clínicas foram bacteremia sem foco (46%), infecções intra-abdominais (18%) e endocardite (11%). Quanto à susceptibilidade antimicrobiana, todas as cepas de *S. anginosus*, *S. bovis/equinus* e *S. mutans* foram sensíveis aos beta-lactâmicos. No entanto, houve elevada taxa de resistência a esses antibióticos nos grupos *S. mitis* (31%), *S. salivarius* (28%) e *S. sanguinis* (52%). A resistência aos macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas (MLS) foi comum, superando 30% em todos os grupos. Apesar disso, todas as cepas permaneceram sensíveis à vancomicina, dalbavancina e apresentaram apenas resistência intrínseca de baixo nível à gentamicina. Os autores destacaram a falha dos testes de triagem baseados em disco de penicilina para detectar corretamente todos os casos de resistência aos beta-lactâmicos, enfatizando a necessidade de testes de MIC para guiar o tratamento adequado. Além disso, reforça a importância da vigilância contínua e da identificação precisa das espécies de NBHS, dada sua relevância clínica, especialmente em infecções graves como a endocardite infecciosa.

Jagadeesan et al. (2024) analisaram, em um estudo retrospectivo, o perfil de sensibilidade antimicrobiana de estreptococos do grupo viridans (VGS) isolados de pacientes com endocardite infecciosa (EI) entre 2018 e 2023, em um hospital cardiológico na Índia. Foram isolados 100 VGS a partir de hemoculturas, com identificação e teste de suscetibilidade realizados pelo sistema Vitek 2. As espécies mais prevalentes foram *Streptococcus sanguinis* (25%) e *S. mitis/oralis* (23%). A análise revelou taxas preocupantes de baixa suscetibilidade à penicilina, principalmente no grupo *S. mitis/oralis* (52%) e *S. alactolyticus* (40%), com resistência variando também para ampicilina e ceftriaxona. A resistência observada é atribuída à modificação de proteínas ligadoras de penicilina, especialmente em espécies como *S. mitis*, dificultando a terapêutica com betalactâmicos. A

presença de cepas com MIC elevado reforça a importância do uso criterioso de antibióticos e da realização de testes de suscetibilidade com valores de MIC para orientar a terapia adequada. A emergência de resistência representa um desafio significativo no tratamento eficaz da EI, exigindo abordagem multidisciplinar e, em casos específicos, uso de antibióticos alternativos como vancomicina ou daptomicina em combinação.

2.4 Clorexidina

Queiroz et al. (2016) investigaram a influência do meio de cultura no efeito dose-resposta da clorexidina (CHX) sobre biofilmes de *Streptococcus mutans* UA159, com o objetivo de validar o uso do caldo Mueller-Hinton ajustado com cátions (MH), com ou sem adição de sangue, para avaliação da atividade antibacteriana. Biofilmes foram cultivados por 5 dias em lâminas de vidro imersas em três meios diferentes (UTYEB, MH e MHS), contendo 1% de sacarose, sendo tratados com diferentes concentrações de CHX (0,0001% a 0,12%) por 1 minuto, duas vezes ao dia. Foram avaliadas a biomassa seca, viabilidade bacteriana (UFC/mg) e pH do meio. Todos os meios permitiram observar um efeito dose-resposta da CHX, porém os meios MH e MHS foram significativamente mais sensíveis que o UTYEB, permitindo melhor discriminação entre concentrações e impacto sobre a biomassa, viabilidade e acidogenicidade do biofilme. Concentrações de 0,12% CHX mostraram efeito bactericida, enquanto concentrações menores apresentaram efeitos limitados. Os resultados demonstram que a escolha do meio de cultura afeta significativamente os resultados da avaliação antimicrobiana *in vitro*, e que o MH pode ser uma alternativa válida e padronizada, conforme recomendação do CLSI.

Lee & Lee (2019) avaliaram a suscetibilidade de 80 cepas de estreptococos orais, em formas planctônicas e em biofilme, aos antissépticos clorexidina e cloreto de cetilpiridínio. Foram determinadas as concentrações inibitórias mínima (MIC), bactericida mínima (MBC), inibitória mínima de biofilme (MBIC) e de erradicação de biofilme (MBEC). Os resultados mostraram que a clorexidina apresentou valores de MIC, MBC, MBIC e MBEC mais altos que o cetilpiridínio, indicando menor potência relativa. As diferenças de suscetibilidade variaram entre as espécies, com *S. mutans* mostrando menor MIC e *S. salivarius* menor MBC à clorexidina. As cepas em biofilme demonstraram significativamente mais resistência aos antissépticos que as planctônicas, com valores de MBIC e MBEC até 200 vezes superiores. A clorexidina teve diferenças estatisticamente significativas nos valores de MIC, MBC e MBIC entre as espécies, enquanto o cetilpiridínio apresentou variações significativas apenas nos valores de MBEC. O estudo destaca que a formação de biofilme compromete significativamente a eficácia dos antissépticos, sendo necessária maior concentração para erradicação completa. Esses dados são relevantes para o uso clínico e formulação de produtos bucais eficazes contra estreptococos orais.

Vasconcelos *et al.* (2022) investigaram o potencial de dois óleos essenciais (OEs) extraídos de espécies de *Croton* (*C. argyrophyllus* e *C. pluriglandulosus*), nativas da Caatinga, em potencializar a ação da clorexidina (CHX) contra formas planctônicas e biofilmes de estreptococos orais. A composição química dos OEs foi determinada por GC-MS, com destaque para o α -pineno (54,74%) no EO de *C. argyrophyllus* e para 1,8-cineol, metileugenol e elemicina no EO de *C. pluriglandulosus*. Embora os OEs isoladamente apresentem baixa atividade antimicrobiana ($MIC \geq 8.000 \mu\text{g/mL}$), a combinação com CHX demonstrou efeito sinérgico contra três das quatro cepas testadas, com redução significativa dos valores de MIC e maior inibição do crescimento bacteriano. Ensaio com biofilmes de

24h revelaram que a associação OE/CHX reduziu significativamente a biomassa e a viabilidade celular em comparação com a CHX isolada, especialmente para *S. mutans* ATCC 25175. A combinação EOAr/CHX apresentou maior eficácia do que EO/CHX em algumas cepas, sugerindo que os OEs atuam como adjuvantes naturais ao aumentar a permeabilidade da membrana bacteriana e facilitar a ação da CHX. Os resultados indicam que os óleos essenciais de *Croton* podem ser promissores como coadjuvantes no controle de biofilmes orais, embora mais estudos sejam necessários para avaliar a toxicidade e eficácia em modelos multiespécies.

2.5 Endocardite infecciosa

Vähäsarja et al. (2020) estudaram o impacto da interrupção da profilaxia antibiótica (AP) em procedimentos odontológicos na Suécia, implementada em outubro de 2012, sobre a incidência de endocardite infecciosa (EI) causada por estreptococos do grupo viridans (VGS). A análise foi baseada em dados do Registro Nacional Sueco de EI entre 2008 e 2017, utilizando uma análise de séries temporais interrompidas (ITSA). A incidência mensal de EI total, EI por VGS e por *Staphylococcus aureus* foi calculada e comparada entre os períodos pré e pós-intervenção. Os resultados mostraram que, apesar de uma leve elevação na incidência de EI por VGS após 2012 (0,065 casos por 10 milhões de indivíduos/mês), essa tendência não foi estatisticamente significativa quando comparada à tendência anterior. Da mesma forma, não houve aumento significativo na incidência de EI total ou por *S. aureus*. A prescrição de amoxicilina por dentistas suecos caiu 20% em 2013, sugerindo adesão às novas diretrizes. A conclusão do estudo é que a suspensão da profilaxia antibiótica em odontologia não levou a um aumento significativo da EI causada por VGS

na população sueca. No entanto, os autores recomendam cautela na interpretação, devido ao tempo limitado de acompanhamento, ausência de análise específica de grupos de alto risco e possível subnotificação de casos com etiologia microbiana desconhecida.

Epprecht et al., 2024 realizaram um estudo observacional, conduzido no Hospital Universitário de Zurique, investigando o impacto da mudança nas diretrizes de profilaxia antibiótica (PA) em 2008 — que passaram a recomendar PA apenas para pacientes de alto risco antes de procedimentos odontológicos invasivos — sobre a incidência de endocardite infecciosa (EI) causada por estreptococos orais em pacientes de risco moderado. Foram analisados 752 episódios de EI entre 2000 e 2022, classificados segundo diretrizes da Sociedade Europeia de Cardiologia e autoridades suíças. Os resultados mostraram que, embora a proporção geral de EI por estreptococos orais tenha permanecido estável, houve aumento significativo nos pacientes de risco moderado após a mudança da diretriz (de 24,4% para 39%). A análise multivariada indicou que esses pacientes apresentaram mais que o dobro de chance de desenvolver EI por estreptococos orais no período pós-PA (OR: 2,59; IC 95%: 1,16–5,81). Esse aumento foi especialmente associado a condições como válvula aórtica bicúspide e prolapso da válvula mitral, sugerindo que esses subgrupos dentro da categoria de risco moderado têm risco semelhante ao de pacientes de alto risco. Além disso, o estudo identificou que procedimentos odontológicos recentes e má higiene oral também foram fatores significativamente associados ao desenvolvimento de EI por estreptococos orais. Os autores recomendam reavaliar as indicações de PA em pacientes com anomalias valvares congênitas classificadas como risco moderado, enfatizando a importância de exames odontológicos regulares e estratégias educativas para prevenção.

A seguir é apresentado uma tabela referente a um resumo dos estudos elencados neste revisão:

Características dos estudos incluídos na revisão de literatura.

Referência	País	Principais resultados
Nemoto et al. (2011)	Japão	Identificou estreptococos orais resistentes à amoxicilina em crianças saudáveis; detectou resistência cruzada a outras penicilinas e eritromicina; destacou risco potencial à profilaxia da endocardite.
Nemoto et al. (2013)	Japão	Detectou resistência à amoxicilina em crianças com cardiopatias congênicas, com taxa significativamente superior à de saudáveis; sugeriu necessidade de revisão das práticas profiláticas.
Suzuki et al. (2016)	Japão	Avaliou suscetibilidade antimicrobiana em pacientes com risco de EI; encontrou elevada resistência a penicilinas; todas as cepas

		sensíveis à vancomicina; destacou importância do monitoramento local.
Queiroz et al. (2016)	Brasil	Investigou influência do meio de cultura na atividade da clorexidina sobre biofilmes de <i>S. mutans</i> ; demonstrou efeito dose-resposta e recomendou caldo Mueller-Hinton como alternativa padronizada.
Hirromishi et al. (2019)	Japão	Descreveu fatores de virulência dos estreptococos, como proteínas de adesão, pili e toxinas; destacou a importância do DNA extracelular e proteínas semelhantes à histona na formação de biofilmes e infecções sistêmicas.
		Avaliou suscetibilidade de estreptococos orais a clorexidina e cetilpiridínio;

Lee & Lee (2019)	Coreia do Sul	confirmou maior resistência em biofilmes; destacou necessidade de concentrações elevadas para erradicação.
Caselli et al. (2020)	Itália	Catalogou o microbioma oral de indivíduos saudáveis, identificando espécies prevalentes como <i>S. oralis</i> e <i>S. mitis</i> , e detectou genes de resistência a macrolídeos (<i>ermB</i> e <i>mefA</i>) associados a bombas de efluxo.
Vähäsarja et al. (2020)	Suécia	Analisou impacto da suspensão da profilaxia antibiótica em odontologia; não encontrou aumento significativo na incidência de EI por VGS; recomendou cautela e mais estudos.
		Estudou proteínas dependentes de sortase A em <i>S. mutans</i> ; identificou SpaP

Katsumata et al. (2021)	Japão	como a mais relevante na adesão e ligação ao colágeno; demonstrou que mutantes deficientes apresentaram redução significativa na formação de biofilme.
Wang et al. (2021)	China	Demonstrou que extratos de chá modificam propriedades físico-químicas das células, alterando hidrofobicidade e autoagregação; o chá pu-erh reduziu a formação de biofilme enquanto o chá oolong promoveu.
Han et al. (2022)	China	Identificou translocação de estreptococos orais para o intestino, com impacto na patogênese de doenças inflamatórias intestinais; demonstrou indução de citocinas pró-inflamatórias por proteínas ligadoras de colágeno.

<p>Araújo Júnior et al. (2022)</p>	<p>Brasil</p>	<p>Realizou revisão sistemática e meta-análise; constatou prevalência média de 21,3% de estreptococos resistentes à amoxicilina em crianças; sugeriu risco à eficácia profilática convencional.</p>
<p>Vasconcelos et al. (2022)</p>	<p>Brasil</p>	<p>Demonstrou efeito sinérgico de óleos essenciais de Croton com clorexidina contra biofilmes de estreptococos; sugeriu potencial como adjuvantes naturais no controle da microbiota oral.</p>
<p>Plainvert et al. (2023)</p>	<p>França</p>	<p>Estudo multicêntrico revelou resistência significativa aos beta-lactâmicos entre VGS invasivos; destacou necessidade de testes de MIC para tratamento</p>

		adequado e vigilância contínua.
Bloch et al. (2024)	Alemanha	Revisou a diversidade de VGS na microbiota oral; destacou <i>S. mitis</i> como o mais prevalente, associado à indução de citocinas em células endoteliais e sinoviais, sugerindo papel na etiologia da endocardite bacteriana e doença reumática.
Kumar et al. (2024)	Índia	Revisou o papel ambíguo dos estreptococos na carcinogênese; destacou mecanismos como produção de acetaldeído e inflamação crônica; discutiu potenciais usos terapêuticos como probióticos e vetores de fármacos.
		Investigou respostas imunometabólicas distintas de macrófagos frente a <i>S.</i>

Sangeetha et al. (2024)	Índia	<i>anginosus</i> e <i>S. mitis</i> ; <i>S. anginosus</i> induziu forte inflamação e reprogramação metabólica, enquanto <i>S. mitis</i> teve efeitos mais sutis.
Jagadeesan et al. (2024)	Índia	Analisou perfil de sensibilidade antimicrobiana em pacientes com EI; encontrou preocupante resistência à penicilina em <i>S. mitis</i> e <i>S. oralis</i> ; recomendou uso criterioso de antibióticos e testes de CIM.
Epprecht et al. (2024)	Suíça	Estudo observacional revelou aumento de EI por estreptococos orais em pacientes de risco moderado após mudança nas diretrizes; sugeriu reavaliação das indicações de profilaxia.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

NEMOTO, H. et al. High prevalence of amoxicillin-resistant oral streptococci in healthy children in Japan. *Oral Microbiology and Immunology*, v. 26, n. 4, p. 236-242, 2011.

NEMOTO, H. et al. Distribution of amoxicillin-resistant oral streptococci in Japanese children with heart disease. *Journal of Infection and Chemotherapy*, v. 19, n. 1, p. 89-94, 2013.

QUEIROZ, L. L. et al. Influence of the Culture Medium in Dose-Response Effect of the Chlorhexidine on *Streptococcus mutans* Biofilms. *Journal of Contemporary Dental Practice*, v. 17, n. 3, p. 218-223, 2016.

SUZUK, T. et al. Antimicrobial susceptibility of oral viridans group streptococci in patients at risk for infective endocarditis. *Journal of Infection and Chemotherapy*, v. 22, n. 5, p. 340-343, 2016.

LEE, H. J.; LEE, S. H. Susceptibility of oral streptococci to chlorhexidine and cetylpyridinium chloride. *Journal of Periodontal & Implant Science*, v. 49, n. 3, p. 158-164, 2019.

HIROMISHI, K. et al. Oral Streptococci as Pathogens in Systemic Diseases. *Journal of Oral Biosciences*, v. 61, n. 3, p. 122-130, 2019.

CASELLI, E. et al. Defining the oral microbiome by whole-genome sequencing and resistome analysis: the complexity of the healthy picture. *BMC Microbiology*, v. 20, p. 120, 2020.

VÄHÄSARJA, N. et al. Incidence of infective endocarditis caused by viridans group streptococci in Sweden – effect of cessation of antibiotic prophylaxis in dentistry for risk individuals. *Clinical Infectious Diseases*, v. 70, n. 4, p. 730-735, 2020.

KATSUMATA, K. et al. Contributions of Sortase A-Dependent Proteins to *Streptococcus mutans* Biofilm Formation. *Journal of Oral Microbiology*, v. 13, n. 1, 1921480, 2021.

WANG, X. et al. Anti-biofilm effects of five kinds of tea extracts on oral streptococci. *Archives of Oral Biology*, v. 126, 105116, 2021.

HAN, D. H. et al. Oral microbiota in patients with inflammatory bowel disease: current evidence and future directions. *Frontiers in Immunology*, v. 13, 865402, 2022.

VASCONCELOS, N. F. et al. Enhancement of chlorhexidine activity against planktonic and biofilm forms of oral streptococci by two *Croton* spp. essential oils from the Caatinga biome. *Microbial Pathogenesis*, v. 172, 105761, 2022.

ARAÚJO JÚNIOR, G. C. et al. Amoxicillin-Resistant Streptococci Carriage in the Mouths of Children: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of Evidence Based Dental Practice*, v. 22, n. 1, 101720, 2022.

PLAINVERT, C. et al. Characterization of invasive infections due to non-beta-hemolytic streptococci in France: a multicenter study. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, v. 42, n. 3, p. 499-507, 2023.

BLOCH, I. et al. Streptococcal diversity in the oral cavity: role in health and systemic disease. *Oral Diseases*, v. 30, n. 1, e13866, 2024.

KUMAR, S. et al. The double-edged sword of oral streptococci in cancer: friend or foe? *Critical Reviews in Microbiology*, v. 50, n. 1, p. 45-59, 2024.

SANGEETHA, A. et al. Immunometabolic response of murine macrophages to *Streptococcus anginosus* and *Streptococcus mitis*: implications in oral cancer. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 14, 1173654, 2024.

JAGADEESAN, N. et al. Antimicrobial susceptibility of viridans group of streptococci isolated from infective endocarditis patients from 2018 to 2023. *Indian Journal of Medical Microbiology*, v. 42, n. 1, p. 34-40, 2024.

EPPRECHT, L. et al. Increase in oral streptococcal endocarditis among moderate-risk patients: impact of guideline changes on endocarditis prevention. *Clinical Infectious Diseases*, v. 78, n. 2, p. 287-296, 2024. N.J.M Opdam, Longevity of posterior composite restorations: a systematic review and metaanalysis, *J. Dent. Res.* 93 (2014) 943–949, <https://doi.org/10.1177/0022034514544217>.

4. DESENVOLVIMENTO

Este trabalho de dissertação está baseado no Manual de Dissertações do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal do Piauí, que regulamenta o formato alternativo para dissertações de Mestrado e permite a inserção de artigos científicos de autoria ou coautoria do candidato. Assim sendo, esta dissertação é composta de um capítulo, contendo: um artigo científico em processo de redação para submissão no periódico “*Journal of Applied Oral Science*”, conforme descrito abaixo:



Journal of Applied Oral Science

Publicação de: **Faculdade De Odontologia De Bauru - USP**

Área: Ciências Da Saúde

Versão impressa ISSN: 1678-7757

Versão on-line ISSN: 1678-7765

Título anterior: Revista Da Faculdade De Odontologia De Bauru

PÁGINA DE TÍTULO

Título:

Estreptococos orais resistentes à amoxicilina – adesão, formação de biofilme e suscetibilidade a antibióticos alternativos e clorexidina

Autores:

1 – Patrick Saboia Beserra – Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Piauí – Teresina (PI) – patrick.beserra@ufpi.edu.br

2 – Dr. Patrick Veras Queleles – Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Piauí – Teresina (PI) – pqueleles@gmail.com

Demais coautores serão inseridos quando da submissão.

RESUMO

Objetivo: Avaliar o perfil fenotípico de adesão e formação de biofilme de estreptococos orais resistentes à amoxicilina (EORA), bem como sua suscetibilidade a antibióticos alternativos e à clorexidina (CHX). **Material e Métodos:** Vinte e cinco cepas de EORA, previamente isoladas da cavidade bucal de crianças cardiopatas com risco para EI, foram analisadas por meio de ensaios *in vitro*. A adesão à matriz extracelular (MEC) foi avaliada por meio da incubação das bactérias por 1,5 hora em poços de placas revestidos com colágeno do tipo I. A formação de biofilme de 24 horas foi analisada utilizando-se a coloração por cristal violeta. A susceptibilidade antimicrobiana foi determinada pelo método de difusão em ágar com discos dos antibióticos azitromicina (AZI), claritromicina (CLA), eritromicina (ERI) e clindamicina (CLI), com a subsequente verificação da presença dos fenótipos de resistência M e MLS. Também foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) da CHX e seu efeito, na concentração de 0,12%, sobre biofilmes pré-formados, por meio do ensaio metabólico do XTT. Os dados foram analisados estatisticamente utilizando-se ANOVA de uma ou duas vias, seguida dos pós-testes apropriados, sendo o nível de significância fixado em 5%. **Resultados:** A maioria dos EORA (84%) apresentou alto padrão de adesão à MEC. Quanto à formação de biofilme, 64% foram classificadas como fortes formadores de biofilme, enquanto 32% foram considerados moderados produtores. Foi observada uma elevada taxa de resistência aos macrolídeos, em que 60% das cepas apresentaram resistência simultânea à ERI, AZI e CLA. Em contraste, a CLI manteve ampla eficácia, com 96% dos isolados classificados como sensíveis. Apenas uma cepa apresentou resistência à CLI, com concomitante resistência aos três macrolídeos testados, caracterizando-a como multirresistente, já que também apresentava resistência à

AMX. A CIM da CHX foi de 2 µg/mL para todos os isolados, e o tratamento com CHX a 0,12% eliminou a viabilidade dos biofilmes ($p < 0,0001$). **Conclusão:** Os EORA demonstraram alta capacidade de adesão à MEC e formação de biofilme. Verificou-se também uma preocupante prevalência de resistência aos macrolídeos. No entanto, a CHX mostrou-se altamente eficaz frente às formas planctônicas e organizadas em biofilme dos isolados testados.

Palavras-Chave: Placa dental, matriz extracelular, resistência a antibióticos, enxágue bucal.

1. INTRODUÇÃO

A endocardite infecciosa (EI) é uma condição sistêmica grave com importantes implicações para a prática odontológica, especialmente em indivíduos com cardiopatias congênitas ou próteses valvares.^{1,2} A doença geralmente resulta de bacteremia decorrente de procedimentos odontológicos invasivos, como extrações dentárias, raspagens periodontais e tratamentos endodônticos.³ Dentre os principais microrganismos envolvidos, destacam-se os estreptococos do grupo viridans, que apresentam fatores de virulência relacionados à adesão e à formação de biofilme.^{4,5}

A *American Heart Association* (AHA) recomenda a profilaxia antibiótica (PA) com amoxicilina (AMX) por via oral para pacientes de risco a serem submetidos a procedimentos odontológicos invasivos.⁶ No entanto, relatos crescentes de resistência à AMX entre os estreptococos orais, especialmente em indivíduos com cardiopatia congênita, têm levantado preocupações quanto à eficácia da PA convencional.⁷⁻⁹ Além disso, essa resistência pode

também ser cumulativa para antibióticos alternativos, incluindo macrolídeos e clindamicina¹⁰, utilizados em pacientes alérgicos às penicilinas.

A capacidade desses microrganismos de aderir a válvulas cardíacas, materiais protéticos e superfícies endocárdicas lesadas potencializa sua patogenicidade, especialmente quando associada a possíveis alterações fenotípicas de adesão e formação de biofilme.^{4,11} Como abordagem preventiva complementar, o uso de antissépticos como a clorexidina (CHX) antes de procedimentos odontológicos tem sido utilizado para reduzir a carga microbiana oral.¹² No entanto, são escassos os estudos que avaliam a eficácia da CHX frente a estreptococos orais resistentes a antibióticos.¹³

Diante disso, o presente estudo teve como objetivo avaliar os perfis fenotípicos de adesão e formação de biofilme de estreptococos resistentes à amoxicilina, previamente isolados da cavidade bucal de crianças com risco para EI.⁹ Além disso, buscou-se investigar a suscetibilidade dessas cepas a antibióticos alternativos, bem como à CHX, tanto em formas planctônicas quanto em biofilmes. A hipótese é que esses estreptococos resistentes à AMX apresentam elevados padrões de virulência e resistência a outros antibióticos, embora sejam suscetíveis à CHX.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Microrganismos e condições de cultivo

Foram avaliadas 25 cepas clínicas de estreptococos orais resistentes à amoxicilina (EORA), isoladas da cavidade bucal de crianças com cardiopatias congênitas, previamente caracterizadas quanto à presunção do gênero (Ferreira et al.⁹ 2025). As culturas de estoque foram cultivadas caldo de triptcaseína de soja – TSB (Sigma-Aldrich, EUA) a 37 °C por 24 h

sob condições de microaerofilia (MA). Logo após, a turbidez das suspensões bacterianas foi ajustada à escala de McFarland 0.5 (aproximadamente $1-2 \times 10^8$ UFC/mL), sendo posteriormente diluída à concentração adequada para cada ensaio.

As seguintes cepas de estreptococos padrões foram utilizadas nos experimentos de avaliação de fenótipo e antimicrobianos: *Streptococcus mutans* UA159, *S. mutans* ATCC 25175, *S. sobrinus* ATCC 27351; *S. sanguinis* ATCC 10556, *S. oralis* ATCC 35037 e *S. mitis* ATCC 49456. Uma cepa do gênero *Bacillus* spp. (isolado clínico), foi utilizada como controle negativo no teste de adesão à matriz extracelular.

2.2 Avaliação da adesão dos EORA à matriz extracelular (MEC)

Para o ensaio de adesão em MEC, culturas crescidas em TSB por 24h foram centrifugadas e lavadas com tampão salina-fostafo (TSF), sendo o *pellet* obtido diluído em TSF até formar a turbidez 0.5 da escala de McFarland. Logo após, 100 μ L da suspensão bacteriana (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL) de cada uma das cepas foi adicionado a placas de 96 poços previamente revestidas com colágeno tipo I (Corning Inc., EUA). Após incubação por 1,5 h a 37 °C, os poços foram lavados duas vezes com 100 μ L TSF para a remoção das células não aderidas.

As bactérias aderidas foram, então, recuperadas por meio de pipetagem com 100 μ L de tripsina a 0,025% (Gibco, EUA) por um período de 30 s. O conteúdo coletado foi diluído em série (10^{-1} a 10^{-3}), semeado em ágar de triptcaseína de soja - TSA (Kasvi, Brasil), sendo as placas incubadas a 37 °C sob MA. Após 48h, o número de colônias foi quantificado.

De acordo com o número de células microbianas aderidas, a capacidade de adesão à MEC de cada cepa foi classificada como: $<10^3$ n. de células aderidas = baixo padrão de

adesão; entre 10^3 e 10^4 n. de células aderidas = moderado padrão de adesão, e $>10^4$ n. de células aderidas = alto padrão de adesão.

2.3 Perfil de formação de biofilme dos EORA em placas de poliestireno

Suspensões bacterianas (10^6 UFC/mL) em TSB suplementado com 1% de sacarose foram inoculadas em placas de 96 poços de fundo chato e incubadas a 37°C por 24 h sob MA. Após incubação, os poços foram lavados duas vezes com TSF para remover as células não aderidas. Os biofilmes foram fixados com metanol P.A por 10 min, secos em temperatura ambiente e corados com cristal violeta (CV) a 0,1% (Synth, Brasil) por 10 min. Após nova secagem, adicionou-se 200 μL de etanol para solubilização do corante por 20 min. O conteúdo foi, então, transferido para outra placa e a absorbância foi lida no comprimento de onda de 595 nm em espectrofotômetro (Multiskan GO, Thermo Fisher Scientific, EUA), tabulando-se as densidades óticas (DO) de cada microrganismo.

Os experimentos foram realizados em seis replicadas e a classificação do padrão de formação de biofilme seguiu os critérios descritos por Stepanović et al.¹⁴ (2007). O valor de corte da densidade ótica (DOc) foi calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{DOc} = \text{média da DO do controle negativo} + (3 \times \text{desvio padrão do controle negativo})$$

As cepas foram classificadas como: não formadora de biofilme ($\text{DO} \leq \text{DOc}$); fraca produtora de biofilme ($\text{DOc} < \text{DO} \leq 2 \times \text{DOc}$); moderada produtora de biofilme ($2 \times \text{DOc} < \text{DO} \leq 4 \times \text{DOc}$) e forte produtora de biofilme ($\text{DO} > 4 \times \text{DOc}$).

2.4 Teste de suscetibilidade dos EORA a antibióticos por meio de disco-difusão

A susceptibilidade aos discos de claritromicina (CLA) 15 µg, eritromicina (ERI) 15 µg, clindamicina (CLI) 2 µg e azitromicina (AZI) 15 µg (CECON, Brasil) foi avaliada pelo método de disco-difusão, conforme as diretrizes estabelecidas pelo CLSI¹⁵ (2023). De culturas crescidas em caldo TSB por 24h, foram feitas suspensões padronizadas (0.5 da escala de McFarland) em solução salina estéril, as quais foram semeadas em três direções em ágar sangue de carneiro desfibrinado, com auxílio de “swab” estéril.

Os discos foram posicionados com pinça estéril, e as placas incubadas a 37 °C por 24 h sob MA. Após incubação, os diâmetros dos halos de inibição foram medidos em milímetros com o auxílio de um paquímetro digital. Os testes foram realizados em triplicata, e os resultados interpretados segundo os pontos de corte do CLSI¹⁵ (2023).

Para identificação dos fenótipos de resistência M e MLSb, foi realizado o teste da zona-D, com os discos de ERI e CLI posicionados a 15–20 mm entre si. A presença de zona de inibição em forma de “D” ao redor do disco de CLI, adjacente ao disco de ERI, indica fenótipo MLSb induzível, e a resistência simultânea às duas classes de antibióticos indica MLSb constitutivo. Após a tabulação dos resultados, a prevalência dos perfis de resistência foi também visualizada em forma de “heatmap” (mapa de calor), gerado pelo programa Python v3.3.13.

2.5 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) da CHX sobre os EORA

As CIMs do digluconato de clorexidina (Maquira – Brasil) foram determinadas pelo método de microdiluição em caldo, conforme CLSI¹⁶ (2018). Diluições seriadas em razão 2, com concentrações variando de 8 a 0,125 µg/mL, foram preparadas em TSB em placas de 96 poços de fundo chato, e inoculadas com 5×10^5 UFC/mL de cada cepa. As placas foram

incubadas a 37 °C sob MA por 24 h. A CIM foi definida como a menor concentração que inibiu visivelmente o crescimento. Os testes foram realizados em triplicata.

2.6 Efeito da clorexidina sobre biofilmes de EORA

Os biofilmes foram formados como descrito no item 2.3. Após 24 h, os poços foram lavados com TSF para a remoção de células não aderidas e, logo após, tratados com 100 µL de CHX 0,12% (Periogard – Colgate, Brasil) ou água destilada estéril (controle), por 3 minutos. Após um novo processo de lavagem com TSF, atividade metabólica das células foi avaliada com o ensaio de redução do XTT (Sigma-Aldrich, EUA) conforme metodologia descrita por Magaña-Montiel et al.¹⁷ (2024). Uma solução de 50µL XTT (2 mg/mL) foi adicionada aos poços, sendo esses incubados a 37 °C, no escuro, por 3 h. O sobrenadante, então, foi transferido para nova placa e a absorbância foi lida a 490 nm em espectrofotômetro (Multiskan GO, Thermo Fisher Scientific, EUA).

2.7 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism v8.01 (GraphPad Software, EUA). Foi aplicada ANOVA de uma via, seguida do pós-teste de Dunnett, para os testes de verificação de fenótipo e ANOVA de duas vias, seguida do pós-teste de Sidack, para o teste do efeito da CHX sobre o biofilme formado. Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1 Adesão dos EORA à matriz extracelular (MEC)

A capacidade de adesão dos EORA à MEC foi avaliada por meio da contagem de colônias originadas das células viáveis aderidas aos poços revertidos por colágeno do tipo I, após 1,5 h de incubação. Conforme demonstrado na **Figura 1**, a maioria dos isolados apresentou alto padrão de adesão, com 84% (n = 21) exibindo valores superiores a 4 Log₁₀ número de células aderidas, comparando-se assim, com as cepas padrões de estreptococos utilizados como referência (barras azuis). Quatro cepas (16%) apresentaram um padrão moderado e nenhuma cepa dos EORA mostrou-se com baixo padrão de adesão.

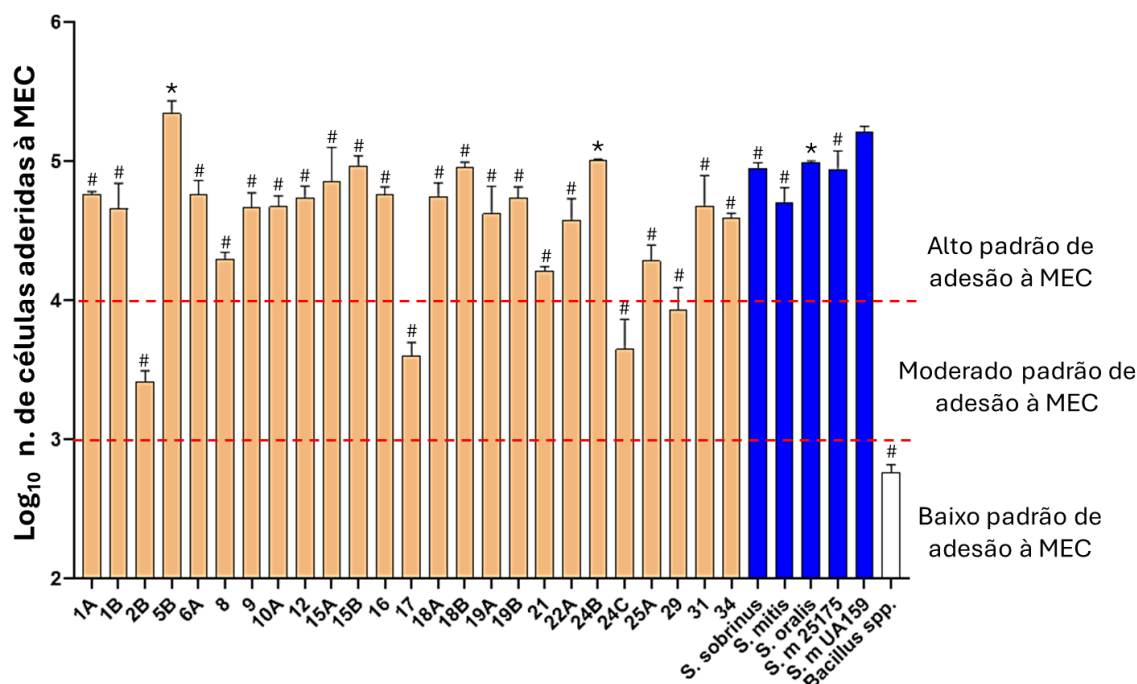


Figura 1. Adesão de EORA e cepas controles à MEC. As barras representam o Log₁₀ do número de células aderidas à MEC ± desvio padrão, após incubação por 1,5 hora. #p<0,0001 e *p<0,05 - diferenças significantes em relação aos valores apresentados pelo *S. mutans* UA159.

As cepas 5B e 24B demonstraram os maiores níveis de adesão, ultrapassando 5 Log₁₀ número de colônias aderidas, enquanto as cepas 2B, 17, 24C e 29 apresentaram os menores valores, porém, ainda sendo consideradas de moderado padrão de adesão. A cepa de *Bacillus* spp. foi utilizada como controle de baixo padrão de adesão, devido a seu reconhecido baixo potencial de hidrofobicidade¹⁸, apresentando uma média de <1000 células aderidas (**Figura 1**).

Todos os microrganismos apresentaram um número significativo de células aderidas menores que os apresentados pela cepa de *S. mutans* UA159 (p<0,0001), utilizado como controle de alto padrão de adesão¹⁹, exceto o isolado 5B, que apresentou um número de células aderidas maior que a própria cepa de referência para este perfil fenotípico (p<0,05).

3.2 Formação de biofilme dos EORA em placas de poliestireno

A capacidade de formação de biofilme dos EORA foi avaliada após 24 horas de incubação. A **Figura 2** apresenta os valores de densidade óptica (DO) obtidos após a leitura espectrofotométrica do CV. Foi constatado que todas as bactérias apresentaram valores menores de formação de biofilme que o *S. mutans* UA159 (p<0,0001), exceto o *S. mutans* ATCC 25175. O valor de corte da DO calculado para o experimento foi de 0,085, a partir do qual foram as cepas foram classificadas quanto seu padrão de formação de biofilme.

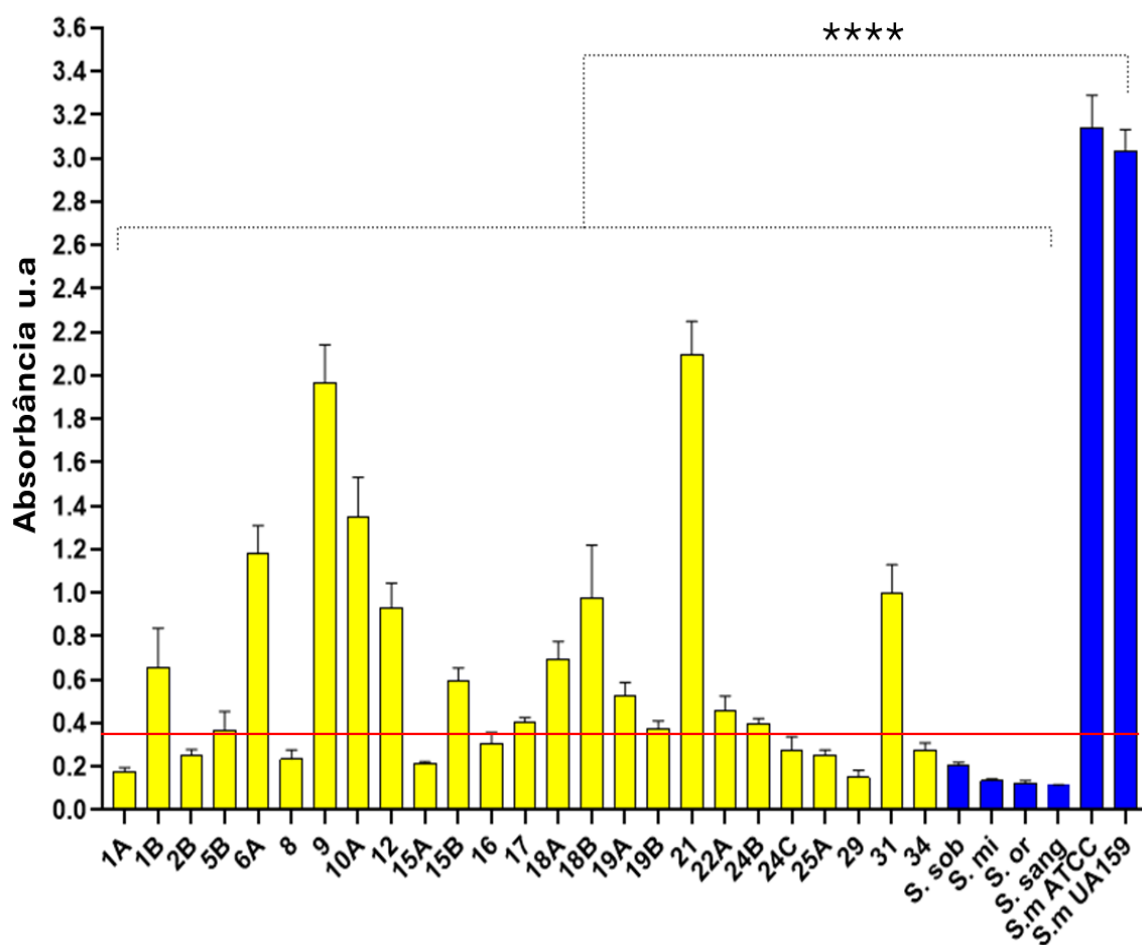


Figura 2. Formação de biofilme pelos EORA (barras amarelas) e cepas de referência (barras azuis). As barras representam a densidade óptica \pm desvio padrão após coloração com CV. A linha vermelha indica o valor da DO acima da qual a cepa foi considerada forte produtora de biofilme ($DO > 0,34$). **** $p < 0,0001$ - diferença significativa em relação aos valores obtidos pelo *S. mutans* UA159.

Na **Tabela 1** os EORA estão classificados quanto à formação de biofilme, onde observa-se que 16 cepas (64%) foram classificadas como fortes formadores de biofilme ($DO > 0,34$), enquanto 32% ($n = 8$) foi considerada com um padrão moderado ($0,17 < DO \leq 0,34$). Apenas a cepa 29 foi considerada fraca produtora de biofilme ($0,086 < DO \leq 0,17$), assim como o *S. mitis*, *S. oralis* e *S. sanguinis*.

Tabela 1. EORA classificados de acordo com a produção de biofilme.

Classificação	N (%)	EORA (codificação)
Fraco produtor	1 (4)	29
Moderado produtor	8 (32)	1A, 2B, 8, 15A, 24C, 25A, 34.
Forte produtor	16 (64)	1B; 5B; 6A; 9; 10A; 12; 15B; 17; 18A; 18B; 19A; 19B; 21; 22A; 24B; 31;

3.3 Suscetibilidade dos EORA aos macrolídeos e à clindamicina

A **Tabela 2** apresenta os perfis de suscetibilidade dos EORA frente aos antibióticos alternativos testados. A interpretação foi realizada com base nos pontos de corte estabelecidos pelo CLSI¹⁵. Foi observada uma elevada taxa de resistência aos macrolídeos, em que 60% das cepas (n = 15) apresentaram resistência simultânea à ERI, AZI e CLA, com halos de inibição inferiores aos valores de sensibilidade definidos. Em contraste, a CLI manteve ampla eficácia, com 96% das cepas (n = 24) classificadas como sensíveis.

A análise fenotípica de resistência revelou a presença do fenótipo M (resistência à ERI e sensibilidade à CLI) em 5 cepas, e do fenótipo MLSb induzível em outras 4 cepas, conforme identificado pelo teste da zona-D. Uma única cepa apresentou o fenótipo MLSb constitutivo, evidenciado pela resistência simultânea à ERI e CLI, porém, sem formação de zona em D.

Tabela 2. Perfis de suscetibilidade aos macrolídeos e à clindamicina de EORA, segundo os pontos de corte estabelecidos pelo CLSI (2023). Valores expressos em milímetros \pm desvio padrão das medidas (n=3). Em vermelho - valores indicativos de resistência ou resistência intermediária.

Isolado	ERI 15 mcg	AZI 15 mcg	CIA15 mcg	CLI 2 mcg
	≥ 21 (S) 16-20 (I) ≤ 15 (R)	≥ 18 (S) 14-17 (I) ≤ 13 (R)	≥ 21 (S) 17-20 (I) ≤ 16 (R)	≥ 19 (S) 16-18 (I) ≤ 15 (R)
<i>S. mutans</i>	21 \pm 0.2	16 \pm 0.61	21 \pm 0.61	26 \pm 0.41
UA159				
1A	12 \pm 0.2	11 \pm 0.4	12 \pm 0.4	21 \pm 0.2
1B	26 \pm 0.4	25 \pm 0.2	27 \pm 0.7	26 \pm 0.4
2B	20 \pm 0.0	14 \pm 0.2	19 \pm 0.41	30 \pm 0.0
5B	29 \pm 0.5	25 \pm 0.4	29 \pm 0.04	24 \pm 0.5
6A	28 \pm 0.3	26 \pm 0.4	30 \pm 0.6	28 \pm 0.4
8	13 \pm 0.5	11 \pm 0.2	14 \pm 0.0	12 \pm 0.1
9	17 \pm 0.8	12 \pm 0.0	19 \pm 1.3	28 \pm 0.6
10A	19 \pm 0.1	14 \pm 0.4	20 \pm 0.4	25 \pm 0.5
12	25 \pm 0.7	27 \pm 0.1	32 \pm 1.6	27 \pm 0.5
15A	18 \pm 0.2	12 \pm 0.04	19 \pm 0.1	30 \pm 0.4
15B	15 \pm 0.7	11 \pm 0.4	14 \pm 0.4	30 \pm 0.8
16	35 \pm 0.8	30 \pm 0.9	34 \pm 0.7	29 \pm 0.4
17	16 \pm 0.04	13 \pm 0.7	16 \pm 0.0	33 \pm 0.6
18A	16 \pm 0.04	12 \pm 0.4	15 \pm 0.04	24 \pm 0.1
18B	15 \pm 0.0	0	15 \pm 0.4	23 \pm 0.1
19A	17 \pm 0.04	12 \pm 0.2	16 \pm 0.12	25 \pm 0.04
19B	15 \pm 0.8	11 \pm 0.04	14 \pm 0.04	24 \pm 0.04
21	14 \pm 0.04	12 \pm 0.4	14 \pm 0	26 \pm 0.8
22A	15 \pm 0.1	12 \pm 0.2	15 \pm 0.4	26 \pm 0.8
24B	25 \pm 0.04	24 \pm 0.0	25 \pm 0.5	24 \pm 0.5
24C	26 \pm 0.04	25 \pm 0.5	26 \pm 0.4	24 \pm 0.2
25A	27 \pm 1.6	29 \pm 0.4	31 \pm 0.1	29 \pm 0.6
29	38 \pm 0.4	30 \pm 0.0	36 \pm 0.4	32 \pm 0.04
31	28 \pm 0.1	26 \pm 0.2	27 \pm 0.5	28 \pm 0.6
34	16 \pm 0.3	11 \pm 0.2	15 \pm 0.0	27 \pm 0.04

Nota: S=sensível; I=resistência intermediária e R=resistente.

A Figura 3 apresenta o número e percentual de EORA (n = 25) classificados como suscetíveis (S), intermediários (I) ou resistentes (R) aos antibióticos testados com base nos pontos de corte do CLSI¹⁵ (2023). Tons de azul mais escuros do “heatmap” indicam um número maior de isolados (e seu respectivo percentual) em cada categoria. Destaca-se que apenas uma cepa (código 8) apresentou resistência à CLI, com concomitante resistência aos três macrolídeos testados, caracterizando-a como multirresistente, já que apresentava uma resistência previamente detectada à AMX.⁹

Figura 3. “Heatmap” da distribuição categórica da suscetibilidade antimicrobiana (número de cepas e porcentagem) dos 25 isolados de EORA.

Antibiótico	Eritromicina	10 (40.0%)	8 (32.0%)	7 (28.0%)
	Azitromicina	10 (40.0%)	2 (8.0%)	13 (52.0%)
	Claritromicina	10 (40.0%)	4 (16.0%)	11 (44.0%)
	Clindamicina	24 (96.0%)	0 (0.0%)	1 (4.0%)
		S	I	R
		Categoria de suscetibilidade		

3.4 Atividade antimicrobiana da clorexidina

A suscetibilidade dos EORA à CHX foi inicialmente avaliada por meio da determinação da concentração inibitória mínima (CIM). Todas as 25 cepas clínicas testadas apresentaram CIM de 2 µg/mL (**Tabela 3**). Em contrapartida, as cepas de referência apresentaram maior variabilidade. As cepas de *S. mutans* demonstraram maior sensibilidade (CIM = 1 µg/mL), enquanto os demais estreptococos padrões apresentaram CIM igual a 4

$\mu\text{g/mL}$ (Tabela 3). Esses resultados indicam que, embora resistentes à AMX e antibióticos alternativos, os isolados clínicos mantiveram uma resposta consistente à CHX.

Tabela 3. Concentração inibitória mínima (CIM) da CHX sobre os EORA e cepas de referência.

Isolados	CIM ($\mu\text{g/mL}$)
25 EORA	2
<i>S. oralis</i> 35037	4
<i>S. sanguinis</i> 10556	4
<i>S. mitis</i> 49456	4
<i>S. mutans</i> 25175	1
<i>S. sobrinus</i> 27607	4
<i>S. mutans</i> UA159	1

A eficácia da clorexidina a 0,12% sobre biofilmes maduros foi investigada por meio do ensaio de redução do XTT. Como demonstrado na **Figura 4**, a atividade metabólica dos biofilmes formados por todas as cepas clínicas e padrões foi eliminada após o tratamento, com valores de absorvância significativamente menores em comparação ao grupo controle ($p < 0,0001$). Essa redução foi observada independentemente da intensidade prévia de formação de biofilme, indicada pelos controles sem tratamento.

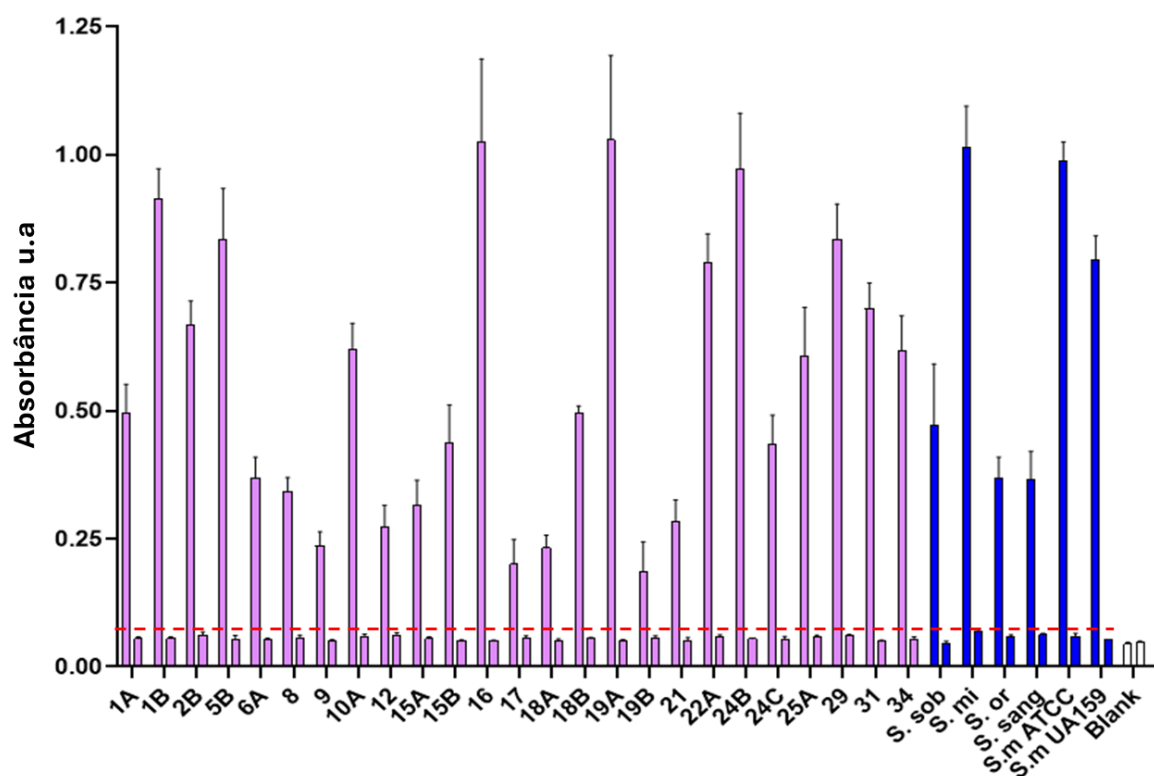


Figura 4. Viabilidade celular dos biofilmes de EORA após tratamento com CHX 0,12% por 3 minutos, determinada pelo ensaio de redução do XTT. Cada cepa é representada por um par de barras (\pm desvio padrão), sendo a da esquerda o controle não tratado e a da direita o efeito da CHX. A linha vermelha tracejada sobre os valores de absorbância dos biofilmes tratados representa uma diferença significativa em relação aos valores dos respectivos controles ($p < 0,0001$).

4. DISCUSSÃO

A adesão bacteriana a proteínas da matriz extracelular, como o colágeno, é um dos primeiros passos no desenvolvimento da endocardite infecciosa (EI).¹⁰ Neste estudo, 84% dos isolados clínicos demonstraram forte adesão ao colágeno tipo I, evidenciando o potencial patogênico dessas cepas, especialmente por terem sido isoladas de crianças com cardiopatia.

Estudos anteriores indicam que cepas de *S. sanguinis*, *S. oralis* e *S. mitis*, comuns na flora oral comensal, podem expressar proteínas de superfície com afinidade por colágeno e fibronectina, facilitando sua fixação em válvulas cardíacas danificadas.^{8,9,11} Nomura et al.²⁰ (2020) mostraram que a expressão do gene *cnm*, codificador de uma proteína de ligação ao colágeno, está associada a uma maior capacidade invasiva de *S. mutans*, sugerindo que até espécies geralmente não ligadas à EI podem adquirir mecanismos de virulência em condições favoráveis.

A forte adesão observada nos EORA pode estar relacionada tanto à expressão de proteínas específicas de ligação quanto à adaptação fenotípica induzida pelo uso frequente de antibióticos em pacientes cardiopatas. Yeh, Chen e Chia²¹ (2006) demonstraram que ambientes inflamatórios e antimicrobianos podem modular a expressão de genes de adesão e de citocinas pró-inflamatórias em estreptococos orais.

A formação de biofilme é outro importante fator de virulência, podendo se associar à resistência antimicrobiana e à persistência bacteriana.⁴ Neste estudo, 64% dos isolados foram classificados como fortes formadores de biofilme, o que é preocupante, considerando que biofilmes aumentam a resistência bacteriana frente às respostas imunes do hospedeiro.^{4,5,7,8,11}

A metodologia empregada seguiu os critérios de Stepanović et al.¹⁴ (2007), permitindo uma classificação padronizada do potencial de formação de biofilme das cepas. A formação de biofilmes, além de dificultar a ação antimicrobiana, favorece a bacteremia persistente em pacientes de risco, uma vez que fragmentos podem ser liberados na corrente sanguínea durante procedimentos odontológicos.²²

A resistência aos antibióticos representa um desafio crescente no manejo de pacientes com risco para EI, especialmente quando a profilaxia com amoxicilina (AMX) possa ser

ineficaz.²³ No presente estudo, observou-se alta taxa de resistência aos macrolídeos em que 60% dos isolados foram resistentes simultaneamente à ERI, AZI e CLA. Esse achado é alarmante, visto que os macrolídeos são utilizados como alternativa à penicilina em pacientes alérgicos, especialmente para profilaxia odontológica.⁶

Estudos como o de Berbel et al.¹⁰ (2022), com isolados orais de crianças, já demonstraram alta resistência aos macrolídeos, reforçando a necessidade de reavaliar seu uso empírico em populações de risco. Por outro lado, a CLI manteve eficácia em 96% das cepas, sendo a única com ampla sensibilidade entre os antibióticos testados. No entanto, seu uso tem sido evitado devido ao risco de colite associada ao *Clostridioides difficile*.²⁴

Neste estudo, diferentes fenótipos de resistência foram identificados. O fenótipo M (resistência ERI e sensibilidade à CLI) foi encontrado em cinco isolados. Quatro cepas apresentaram o fenótipo MLSb induzível, e uma cepa o fenótipo MLSb constitutivo, detectados pelo teste da zona-D. A distinção desses fenótipos é crucial, pois influencia a eficácia terapêutica. Sutcliffe et al.²⁵ (1996) alertam que o uso de clindamicina frente a cepas com resistência induzível pode resultar em falhas terapêuticas.

A combinação entre resistência antimicrobiana e alta virulência encontrada nos resultados deste trabalho é especialmente preocupante. Alves et al.⁵ (2022) mostraram que cepas de *S. oralis* e *S. mitis* resistentes a macrolídeos apresentaram maior adesividade ao colágeno, reforçando o risco de EI em pacientes com válvulas cardíacas danificadas. Tais evidências reforçam a importância da revisão contínua dos protocolos de PA.

O uso de antissépticos bucais antes de procedimentos invasivos é uma medida eficaz para redução da carga microbiana.^{26,27} A CHX é amplamente utilizada na odontologia devido à sua ação antimicrobiana e efeito residual, por sua capacidade de aderir aos tecidos bucais.²⁸

Neste estudo, a CHX demonstrou elevada eficácia frente aos EORA, onde a CIM foi de 2 µg/mL para todas as cepas, e a formulação comercial a 0,12% eliminou totalmente os biofilmes formados. Esses achados estão de acordo com estudos prévios, como os de De Queiroz et al.¹² (2016) e Moreira et al.¹³ (2008), que relataram efeito dose-dependente e significativa redução da viabilidade de biofilmes de *S. mutans* após exposição à CHX.

No entanto, o uso contínuo e indiscriminado da CHX levanta preocupações. Cieplik et al.²⁹ (2019) alertam que sua exposição prolongada pode induzir alterações fenotípicas, selecionar cepas menos suscetíveis e favorecer resistência cruzada a outros antimicrobianos. Ainda assim, neste estudo, a CHX mostrou-se eficaz de forma uniforme e imediata, reforçando sua utilidade como adjuvante na profilaxia odontológica, desde que usada com critério e por tempo limitado. Seu uso contribui para a redução da carga bacteriana e, consequentemente, do risco de bacteremia em pacientes vulneráveis.

Apesar dos achados relevantes, este estudo apresenta limitações como seu caráter *in vitro*, que não permite extrapolação direta para o ambiente clínico. Embora os modelos utilizados (adesão ao colágeno e biofilme em placas de poliestireno) sejam amplamente aceitos^{4,5,20,21}, o comportamento bacteriano em condições fisiológicas pode variar significativamente. Outra limitação é o número reduzido de isolados, ainda que representativos da população estudada. A inclusão de um maior número de cepas, de diferentes contextos geográficos e clínicos, permitiria uma compreensão mais abrangente dos perfis de resistência e virulência entre os estreptococos orais.

5. CONCLUSÃO

Os estreptococos orais resistentes à amoxicilina apresentaram elevada capacidade de adesão à matriz extracelular e formação de biofilme, características que reforçam seu potencial de virulência. Observou-se, ainda, uma preocupante prevalência de resistência aos antibióticos macrolídeos, o que limita as opções terapêuticas em pacientes alérgicos às penicilinas. Por outro lado, a clorexidina demonstrou alta eficácia antimicrobiana, tanto contra as formas planctônicas quanto contra os biofilmes formados pelos isolados clínicos avaliados, configurando-se como uma importante estratégia adjuvante no controle dessas infecções.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à UFPI, pelo apoio e pela viabilização da execução deste estudo. Também à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Piauí (FAPEPI). PROGRAMA PRIMEIROS PROJETOS-PPP/EDITAL FAPEPI/MCT/CNPq/CT-INFRA N°007/2018 (PROJETO DE PESQUISA 006/2019) pelo financiamento de parte desse trabalho.

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

P.S.B.: pesquisa *in vitro* e redação do artigo. P.V.Q.: supervisor do projeto, desenho do estudo, análise de dados e redação do artigo. Demais autores serão inseridos quando da submissão.

DISPONIBILIDADE DOS DADOS

Os dados das instituições são confidenciais, mas os autores se disponibilizam a compartilhar os dados das planilhas obtidas com os responsáveis pelo periódico, se necessário.

DECLARAÇÕES

Aprovação ética: Os procedimentos de coleta de dados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Piauí (protocolo n.º 2.654.176).

Consentimento informado: As instituições de ensino foram informadas dos objetivos da pesquisa, e a coleta de dados foi realizada somente após autorização e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido.

Conflito de interesses: Os autores declaram não haver conflitos de interesses.

6. REFERÊNCIAS

1. Kussainova A, Bekturova M, Sabitova A, Khamidulina M, Omarova G. Infective endocarditis and oral health: review of literature. *J Clin Exp Dent*. 2025;17(1):e1–e7. doi:10.4317/jced.60864.
2. Burbán JM, Decobert M, Cotillon M, Galmier M, Lanotte P, Giraud T, et al. Infective endocarditis in children with congenital heart disease: A 20-year retrospective multicenter study. *Int J Cardiol*. 2024;383:60–6. doi:10.1016/j.ijcard.2023.11.042.
3. Hirumoto T, Kobayashi T, Nagashima H, Sato Y, Hayashi Y, Ando T, et al. Virulence of *Streptococcus mutans* in experimental endocarditis. *Oral Dis*. 2019;25(2):456–64. doi:10.1111/odi.12983.
4. Tahei D, Kobayashi T. Pathogenic mechanisms of viridans group streptococci in infective endocarditis: focus on adhesion and biofilm formation. *Microbiol Immunol*. 2021;65(4):213–22. doi:10.1111/1348-0421.12886.
5. Alves LA, Silva-Boghossian CM, Colombo APV. Resistance and virulence patterns of oral streptococci from at-risk cardiac pediatric patients. *Oral Dis*. 2022;28(5):1175–84. doi:10.1111/odi.13968.
6. Wilson W, Taubert KA, Gewitz M, Lockhart PB, Baddour LM, Levison M, et al. Prevention of infective endocarditis: Guidelines from the American Heart Association. *Circulation*. 2021;143(6):e963–78. doi:10.1161/CIR.0000000000000969.
7. Nemoto H, Nomura R, Otsugu M, Yamaguchi M, Nakano K, Ooshima T. Interrelationship between the biofilm-forming ability of *Streptococcus sanguinis* and its tolerance to antibiotics. *Int J Antimicrob Agents*. 2013;42(3):242–5. doi:10.1016/j.ijantimicag.2013.05.006.

8. Galvão EL, Silva-Boghossian CM, do Souto RM, Colombo APV. Macrolide resistance and biofilm formation in oral streptococci isolated from children with congenital heart defects. *J Appl Microbiol.* 2022;132(5):3458–69. doi:10.1111/jam.15341.
9. Ferreira LC. Prevalência de estreptococos com resistência à amoxicilina na boca de crianças com risco de endocardite infecciosa [dissertação]. Teresina (PI): Universidade Federal do Piauí; 2023.
10. Berbel D, Camarinha M, Lopes G, de Carvalho MD, Ribeiro A, Cavassan AO. Resistance phenotypes and genotypes of *Streptococcus mitis* group in pediatric dental patients. *J Glob Antimicrob Resist.* 2022;29:204–11. doi:10.1016/j.jgar.2022.01.002.
11. Ajami B, Shirmohammadi A, Ghodsian B, Abolfazli N, Vaziri F. Adhesion capacity of oral streptococci to extracellular matrix proteins: implications for infective endocarditis. *J Infect Public Health.* 2015;8(5):440–6. doi:10.1016/j.jiph.2015.01.002.
12. De Queiroz AC, Medeiros AC, Oliveira PT, Cabral LM, Cavalcante RM, Lima KC. Influence of the culture medium in dose-response effect of the chlorhexidine on *Streptococcus mutans* biofilms. *Biomed Res Int.* 2016;2016:2816812. doi:10.1155/2016/2816812.
13. Moreira D, Zanin ICJ, Dos Santos VR, Pimenta FJGS, Rodrigues LKA. Efficacy of chlorhexidine on biofilm: a comparative study on *Streptococcus mutans*. *Braz Oral Res.* 2008;22(1):70–4. doi:10.1590/S1806-83242008000100013.
14. Stepanović S, Vuković D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukić S, Ćirković I, et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and

- practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS*. 2007;115(8):891–9. doi:10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x1.
15. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 33rd ed. CLSI supplement M100. Wayne (PA): CLSI; 2023.
 16. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 11th ed. CLSI standard M07. Wayne (PA): CLSI; 2018.
 17. Magaña-Montiel N, Muriel-Millán LF, Pardo-López L. XTT assay for detection of bacterial metabolic activity in water-based polyester polyurethane. *PLoS One*. 2024;19(6):e0303210. doi:10.1371/journal.pone.0303210.
 18. Ganji-Azad E, Javadi A, Jahanbani Veshareh M, Ayatollahi S, Miller R. Bacteria cell hydrophobicity and interfacial properties relationships: a new MEOR approach. *Colloids Interfaces*. 2021;5(4):49. doi:10.3390/colloids5040049.
 19. Katsumata T, Nguyen-Tra Le M, Kawada-Matsuo M, Taniguchi Y, Ouhara K, Oogai Y, et al. Comprehensive characterization of sortase A-dependent surface proteins in *Streptococcus mutans*. *Microbiol Immunol*. 2022;66:145–56.
 20. Nomura R, Otsugu M, Hamada M, Matayoshi S, Teramoto N, Iwashita N, et al. Potential involvement of *Streptococcus mutans* possessing collagen binding protein Cnm in infective endocarditis. *Sci Rep*. 2020;10(1):19118. doi:10.1038/s41598-020-75933-6.
 21. Yeh CY, Chen JY, Chia JS. Glucosyltransferases of viridans group streptococci modulate interleukin-6 and adhesion molecule expression in endothelial cells and augment monocytic cell adherence. *Infect Immun*. 2006;74(2):1273–83. doi:10.1128/IAI.74.2.1273-1283.2006.

22. Parahitiyawa NB, Jin LJ, Leung WK, Yam WC, Samaranayake LP. Microbiology of odontogenic bacteremia: beyond endocarditis. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22(1):46–64. doi:10.1128/CMR.00028-08. Erratum in: *Clin Microbiol Rev.* 2009;22(2):386.
23. Araújo Júnior AG, Costa MLVA, Silva FRP, Arcanjo DDR, Moura LFAD, Oliveira FAA, et al. Amoxicillin-resistant streptococci carriage in the mouths of children: a systematic review and meta-analysis. *Pathogens.* 2022;11:1114. doi:10.3390/pathogens11101114.
24. Miller AC, Arakkal AT, Sewell DK, Segre AM, Tholany J, Polgreen PM; CDC MInD-Healthcare Group. Comparison of different antibiotics and the risk for community-associated *Clostridioides difficile* infection: a case-control study. *Open Forum Infect Dis.* 2023;10(8):ofad413. doi:10.1093/ofid/ofad413.
25. Sutcliffe J, Grebe T, Tait-Kamradt A, Wondrack L. Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996;40(11):2562–6. doi:10.1128/AAC.40.11.2562.
26. Kosutic D, Uglesic V, Perkovic D, Persic Z, Solman L, Lupi-Ferandin S, et al. Preoperative antiseptics in clean/contaminated maxillofacial and oral surgery: prospective randomized study. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2009;38(2):160–5. doi:10.1016/j.ijom.2008.11.023.
27. Karpiński TM, Szkaradkiewicz AK. Chlorhexidine--pharmaco-biological activity and application. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2015;19(7):1321–6. PMID: 25912596.
28. Deus FP, Ouanounou A. Chlorhexidine in dentistry: pharmacology, uses, and adverse effects. *Int Dent J.* 2022;72(3):269–77. doi:10.1016/j.identj.2022.01.005.

29. Cieplik F, Jakubovics NS, Buchalla W, Maisch T, Hellwig E, Al-Ahmad A. Resistance toward chlorhexidine in oral bacteria—is there cause for concern? *Front Microbiol.* 2019;10:587. doi:10.3389/fmicb.2019.00587.

ANEXO – Normas para submissão do artigo

DISPONÍVEL EM: <https://www.scielo.br/journal/jaos/about/#about>

Journal of Applied Oral Science

Publicação de: Faculdade De Odontologia De Bauru – USP Área: Ciências Da Saúde

Versão impressa ISSN: 1678-7757 Versão on-line ISSN: 1678-7765

Título anterior: Revista Da Faculdade De Odontologia De Bauru

Instruções para os autores

Preparação do manuscrito

Formato de Envio dos Artigos

Title page

Deverá ser submetida em arquivo separado do arquivo principal e conter:

- a) O título do manuscrito em inglês.
- b) Os nomes dos autores na ordem direta seguido da sua afiliação institucional. Para autores brasileiros, as afiliações devem vir em português, em espanhol para latino-americanos e em inglês para as demais nacionalidades.

A autoria deverá ser atribuída seguindo as recomendações do ICMJE: contribuições substanciais à concepção ou projeto do estudo; ou coleta, análise, ou interpretação dos dados do estudo; redação ou revisão crítica com importante contribuição intelectual; aprovação final da versão a ser publicada; e concordância de se responsabilizar por todos os aspectos do trabalho, assegurando que as questões relacionadas com a exatidão e integridade de qualquer parte do estudo foram devidamente investigadas e resolvidas.

Todos os autores devem ter registro no ORCID (<https://orcid.org/>) e vinculá-lo ao registro no ScholarOne. Consulte o Guia do Autor para orientações de como vincular o ORCID a sua conta no ScholarOne.

Todos os autores deverão ser adicionados na etapa 4 do processo de submissão no sistema ScholarOne.

Todos os autores devem descrever a sua participação na elaboração do manuscrito, usando a estrutura de taxonomia do CREDiT, contidas no Formulário de Submissão e também durante a submissão do manuscrito no ScholarOne.

c) Endereço completo do autor correspondente, a quem todas as correspondências serão endereçadas, incluindo telefone e endereço de e-mail.

d) Informação sobre o depósito do manuscrito em um servidor de preprints, quando for o caso, indicando o endereço de acesso e número DOI; citação e referenciamento dos dados de pesquisa especificando o repositório e o número DOI. Anexar o formulário de Conformidade com a Ciência Aberta.

e) Nota obrigatória informando se o manuscrito é derivado de dissertações ou teses e seu respectivo endereço de acesso quando disponível.

Arquivo principal

O manuscrito deverá ser previamente traduzido ou revisado quanto à língua inglesa por empresa, profissional autônomo ou autores que tenham a língua inglesa como nativa.

a) Título do trabalho em inglês.

b) Resumo estruturado de no máximo 300 palavras em parágrafo único, contendo as seguintes subseções: breve introdução, objetivo, metodologia, resultados e conclusões.

c) Palavras-chave: correspondem às palavras ou expressões que identificam o conteúdo do artigo. Para determinação das palavras-chave, os autores deverão consultar a lista de assuntos do MeSH e DeCS. Deve-se adicionar de 3 a 5 palavras-chave separadas entre si por pontos e devem ter a primeira letra da primeira palavra em letra maiúscula.

d) Introdução: resumo do raciocínio e a proposta do estudo, citando somente referências pertinentes. Estabelecer a hipótese do trabalho.

e) Metodologia: o material e os métodos são apresentados com detalhes suficientes para permitir a confirmação das observações. Incluir cidade, estado e país de todos os fabricantes depois da primeira menção dos produtos, instrumentais, softwares, equipamentos, etc. Métodos publicados devem ser referenciados e discutidos brevemente, exceto se modificações tenham sido feitas. Indicar os métodos estatísticos utilizados, se aplicável. Consultar o item princípios éticos e registro de ensaios clínicos.

f) Resultados: devem ser apresentados em uma sequência lógica no texto, com tabelas e ilustrações. Não repetir no texto todos os dados das tabelas e ilustrações, enfatizando somente as observações importantes.

g) Discussão: enfatizar os aspectos novos e importantes do estudo contextualizando com observações de investigações prévias. Não repetir em detalhes dados ou informações citadas na introdução ou resultados. Apontar as implicações de seus achados e suas limitações.

h) Conclusão: Listar sucintamente as conclusões que podem ser extraídas da pesquisa. Não apenas reafirmar os resultados, mas estabelecer conclusões pertinentes aos objetivos e justificadas pelos dados. Na maioria das situações, as conclusões são verdadeiras apenas para a população do experimento.

i) Agradecimentos (quando apropriado): agradeça aos que tenham contribuído de maneira significativa para o estudo (pessoas, laboratórios, setores etc).

j) Financiamentos: especifique patrocinadores, auxílios financeiros, bolsas e/ou programas citando o nome da organização de apoio de fomento e o número do processo.

k) Declarações: adicionar, após os agradecimentos, quando houver, as declarações de conflito de interesse e de disponibilidade de dados de pesquisa.

l) Referências.

Resumo gráfico

Um resumo gráfico é um formato visual do manuscrito para resumir os achados essenciais do estudo. Ajuda a divulgar informações fáceis e concisas, que podem ser rapidamente incorporadas pelos leitores e ajudam a ser compartilhadas, inclusive nas mídias sociais. Portanto, o JAOS encoraja esta submissão. Uma figura original que indique claramente a

sequência descrita no manuscrito precisa ser projetada (JPEG, mínimo de 300 dpi e 1080 x 1080 pixels - largura x altura) e enviada como um arquivo separado.

Ativos Digitais

As ilustrações (fotografias, gráficos, desenhos, fluxogramas etc.) serão consideradas no texto como figuras, sendo limitadas ao mínimo indispensáveis e devem ser adicionadas em arquivos separados, numeradas consecutivamente em algarismos arábicos, segundo a ordem em que aparecem no texto. Devem apresentar formato .jpg, com no mínimo 300 dpi de resolução e entre 15 cm a 20 cm de largura.

Materiais provenientes de câmeras digitais devem ter no mínimo 3 megapixels de resolução óptica sem compressão (módulo high definition).

As tabelas deverão ser logicamente organizadas, numeradas consecutivamente em algarismos arábicos e a legenda será colocada na parte superior. Devem ser incluídas no texto do manuscrito.

As legendas das ilustrações e os títulos das tabelas deverão ser claros, concisos e localizados ao final do arquivo principal em forma de lista separada e precedidas da numeração correspondente.

As notas de rodapé de ilustrações e tabelas serão indicadas por asteriscos e restritas ao mínimo indispensável.

Citações e Referências

A citação dos autores no texto poderá ser feita de duas maneiras:

1) Somente numérica - As referências devem ser citadas em ordem crescente no parágrafo.

Referências

As Referências deverão obedecer aos requisitos "Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journals - Vancouver".

Toda referência deverá ser citada no texto. Elas devem ser ordenadas de acordo com sua apresentação no texto e numeradas sequencialmente em ordem crescente. As abreviaturas dos títulos dos periódicos citados deverão estar de acordo com o padrão MEDLINE.

Não incluir comunicações pessoais e materiais bibliográficos sem data de publicação na lista de referências.

Teses, dissertações, monografias e resumos não serão aceitos como referências, mesmo que apresentem DOI.

Minimizar referências a publicações em línguas que não a inglesa. O título traduzido em inglês deve ser citado entre colchetes e o idioma original inserido no final da referência.

Listar os nomes dos 6 primeiros autores do trabalho; excedendo este número, os 6 primeiros autores do trabalho devem ser citados, seguidos pela expressão "et al." não escrita em itálico e acompanhada por ponto final.

Não ultrapassar a citação de 40 referências.