

UNISA - Universidade Santo Amaro
Biblioteca Campus I

UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

FÁBIO MATOS CHIARELLI

**AVALIAÇÃO CLÍNICA E MICROBIOLÓGICA DA EFETIVIDADE
DE UMA PASTA CONTENDO CLOREXIDINA A 0,12%
NO CONTROLE DO BIOFILME DENTAL E DA INFLAMAÇÃO
GENGIVAL EM INDIVÍDUOS COM HISTÓRICO DE PERIODONTITE**

SÃO PAULO

2004

FÁBIO MATOS CHIARELLI

**AVALIAÇÃO CLÍNICA E MICROBIOLÓGICA DA EFETIVIDADE
DE UMA PASTA CONTENDO CLOREXIDINA A 0,12%
NO CONTROLE DO BIOFILME DENTAL E DA INFLAMAÇÃO
GENGIVAL EM INDIVÍDUOS COM HISTÓRICO DE PERIODONTITE.**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação, nível mestrado, da Faculdade de Odontologia da Universidade de Santo Amaro, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Odontologia,
Área de concentração: Implantodontia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Fátima N. Faraco

Co-Orientadores: Prof. Dr. Mário Julio Ávila-Campos e Prof. Alfredo Carlos. R. Feitosa

SÃO PAULO

2004

B. 30122733
Class. U617.69
Cutter C455 a)
Patri nº 3871
Tipo entrada DOACAS
Nota Fiscal
Data rec. 3.11.08
Preço
Origem

**Ficha Catalográfica elaborada pela
Biblioteca Dr. Milton Soldani Afonso – Campus I**

Chiarelli, Fábio Matos.

"Avaliação clínica e microbiológica da efetividade de uma pasta contendo clorexidina 0,12% no controle do biofilme dental e da inflamação gengival em indivíduos com histórico de periodontite".

São Paulo: 2004

Dissertação (Mestrado). Área de Concentração em Implantodontia. Faculdade de Odontologia da Universidade de Santo Amaro. 130 p.

1. Dentifricio 2. Clorexidina 3. Periodontite 3.
periodontopatogeno, 4. *Porphyromonas gingivalis* 5.
PCR 6.

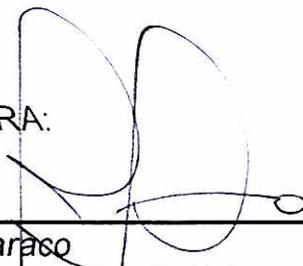
FÁBIO MATOS CHIARELLI

**AVALIAÇÃO CLÍNICA E MICROBIOLÓGICA DA EFETIVIDADE
DE UMA PASTA CONTENDO CLOREXIDINA A 0,12%
NO CONTROLE DO BIOFILME DENTAL E DA INFLAMAÇÃO
GENGIVAL EM INDIVÍDUOS COM HISTÓRICO DE PERIODONTITE**

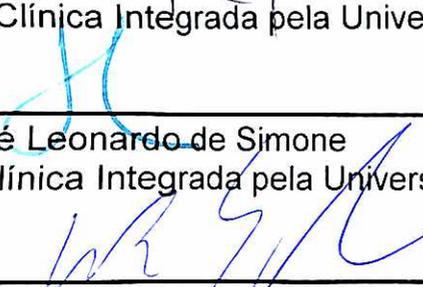
Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação, nível mestrado, da Faculdade de Odontologia da Universidade de Santo Amaro, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Odontologia,
Área de concentração: Implantodontia.

Aprovado: ____/____/____.

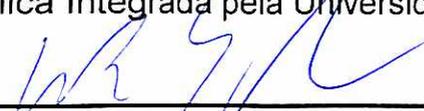
BANCA EXAMINADORA:



Prof.ª Dr.ª Fátima N. Faraco
Doutora em Clínica Integrada pela Universidade de São Paulo



Prof. Dr. José Leonardo de Simone
Doutor em Clínica Integrada pela Universidade de São Paulo



Prof. Dr. Wilson Roberto Sendyk
Doutor em Periodontia pela Universidade de São Paulo

CONCEITO FINAL: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, JOSÉ E LÚCIA,

pela permanente dedicação, incentivo e amor.

A minha esposa, FABIOLA,

pelo amor, paciência e constante apoio, obrigado.

Ao meu filho, AUGUSTO,

que tanto amo e razão do meu viver.

A VOCÊS,

que no anonimato, compartilharam de idéias, compreenderam - me e incentivaram - me o meu profundo reconhecimento pela grandeza com que souberam estar presentes,valorizando o sentido de minha luta, dispensando – me muitas vezes de seu convívio. De uma forma muito especial, as alegrias também são suas, pois o apoio, o estímulo, a paciência, a amizade e o carinho de vocês amenizaram as dificuldades de minha jornada.

*“A ciência sempre será uma busca, jamais uma descoberta real. É uma
viagem, nunca uma chegada”.*

Karl Popper
Filósofo austriaco

AGRADECIMENTOS

Obrigado a DEUS, que com seu amor infinito me dá discernimento e sabedoria para trilhar o meu caminho.

A minha orientadora Prof^a Dr^a FÁTIMA N. FARACO, meu sincero agradecimento pela atenção e orientação que tornou possível concretizar este estudo.

Ao meu amigo e Co-orientador Professor ALFREDO FEITOSA, o meu muito obrigado pelo incentivo que se fez presente em todos os momentos da minha carreira acadêmica.

Ao Prof. Dr. WILSON ROBERTO SENDYK pela amizade e convivência, permitindo a busca de um aprimoramento científico.

Ao Prof. Dr. MARIO JULIO AVILA-CAMPOS e Prof^a Dr^a VIVIANE NAKANO, pela presteza, dedicação e eficiência na execução da parte laboratorial.

Obrigado àqueles que repartiram comigo os seus conhecimentos, MESTRES, COLEGAS de MESTRADO, DIRETORIA e FUNCIONÁRIOS da UNISA, colocando nas minhas mãos ferramentas com as quais abrirei novos horizontes.

Ao NÚCLEO DE DOENÇAS INFECCIOSAS – UFES, na pessoa do Prof. Dr. Rodrigo Ribeiro Rodrigues, pela atenção e capacitação.

A todos estimados colegas de profissão e amigos:

EDUARDO DIAS, GUSTAVO BASSANI, FELIPE DE OLIVEIRA KIEPPER, LORENA DA RÓS, MICHELE G. DALLA BERNARDINA, PROF^a MARIA REBECA AMARAL GANHOTO, PROF. ANTÔNIO CARLOS BASSANI, ALEXANDRE BASSANI E AOS FUNCIONÁRIOS DO NÚCLEO DE PERIODONTIA PESQUISA, EXTENSÃO E TREINAMENTO / NUPET-UFES,

que contribuíram em todos os passos até a execução final deste trabalho.

RESUMO

Inúmeros agentes químicos e veículos têm sido utilizados para o controle da placa bacteriana. Dentre estes, os dentifrícios têm se apresentado como um excelente veículo para liberação de agentes antiplaca, uma vez que a escovação com esse veículo é o método de higiene oral mais comum empregado pela maioria dos indivíduos e oferece uma relação custo-benefício favorável para o controle químico do biofilme dental. A clorexidina tem sido considerada um agente antimicrobiano efetivo no controle do biofilme dental supragengival. O objetivo deste estudo é avaliar o efeito da pasta dental contendo clorexidina a 0,12% no controle do biofilme dental e da inflamação gengival, bem como sua ação sobre os microrganismos presentes na placa supragengival. Dezoito indivíduos foram divididos em dois grupos (controle e teste) e utilizaram os cremes dentais contendo clorexidina 0,12% e fluoreto de sódio e placebo apenas com fluoreto de sódio. Medidas dos índices de placa e gengival, nível de inserção clínica, sangramento gengival, profundidade clínica de sondagem e amostras de placa supragengival foram coletadas nas fases 0, 7, 14 e 21 dias. Para excluir o efeito do controle mecânico, o creme dental foi aplicado diariamente sobre as superfícies vestibulares dos dentes inferiores por meio de matriz individual de silicone, removendo-a nas refeições e ao dormir. A reação da polimerase em cadeia (PCR) foi empregada para identificar a bactéria periodontopatogênica *Porphyromonas gingivalis*. Os resultados desta investigação demonstraram associações estatisticamente significantes entre o índice de sangramento gengival e o dentifrício teste, bem como a positividade do periodontopatógeno *P.gingivalis* e sangramento gengival. Concluiu-se que foi comprovada a eficiência e sensibilidade do método molecular, reação em cadeia da

polimerase (PCR), na detecção do periodontopatógeno *P.gingivalis* e que o creme dental CARIAX não demonstrou diferenças significativas nas respostas clínicas.

Palavras chaves: dentifício, clorexidina, periodontite, periodontopatógeno, *Porphyromonas gingivalis*, PCR.

ABSTRACT

Several chemical agents and vehicles have been used to control dental bacterial plaque. In principle, a dentifrice provides an excellent vehicle for the delivery of antiplaque agents because toothbrushing with a toothpaste is arguably the most common form of oral hygiene practised by individuals and therefore a favourable cost-benefit ratio for the chemical controlling of dental biofilm. Chlorhexidine has been known as an effective antimicrobial agent to inhibit supragingival dental biofilm formation. The purpose of this study is to evaluate the effects of a 0,12% chlorhexidine toothpaste on plaque control, gingival inflammation and microbial composition of supragingival biofilm. Eighteen consenting volunteers were divided into 2 groups (test and control) and used the toothpastes containing chlorhexidine 0,12%, stannous fluoride and a placebo with stannous fluoride only, for 4-week period. To exclude the effect of mechanical cleaning, the toothpaste was applied daily to the lower buccal tooth surfaces by means of individually constructed silicon stent, removing it only to eat and sleep. Measures of Plaque and Gingival Index, clinical attachment level, clinical probing depth and supragingival plaque samples were collected on days 0, 7, 14 and 21. Polymerase Chain Reaction (PCR) will be used to identify the bacterium periodontopathogen: *Porphyromonas gingivalis*. Our results demonstrated significant statistically associations between Gingival bleeding Index and the test toothpaste, and the positivity of the *P.gingivalis* with gingival bleeding.

Key words: toothpastes, chlorhexidine, periodontitis, periodontopathogens, *Porphyromonas gingivalis*, PCR.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Diagrama limites anatômicos da gengiva	24
Figura 2: Diagrama de fibras dentogengivais	24
Figura 3: Complexos microbianos segundo Socransky, 1998.	26
Figura 4: Diagrama representando associação biofilme dental / bactéria com a superfície do dente e tecidos periodontais	35
Figura 5: Molécula de clorexidina	42
Figura 6: Amplificação por PCR do DNA de <i>Porphyromonas gingivalis</i> detectado em amostras clínicas	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Associação entre o creme dental e variáveis de caracterização da amostra	65
Tabela 2: Associação entre o creme dental Cariax e a variável sangramento gengival / SG.	66
Tabela 3. Freqüência de positividade para o periodontopatógeno <i>P. gingivalis</i> /dente 44	67
Tabela 4. Freqüência de positividade para o periodontopatógeno <i>P. gingivalis</i> 98/dente 45	67
Tabela 5. Freqüência de positividade para o periodontopatógeno <i>P. gingivalis</i> /dente 46	67
Tabela 6. Associação entre a variável NIC versus <i>P.gingivalis</i> .	68
Tabela 7. Associação entre a positividade de <i>P.gingivalis</i> e o índice de sangramento gengival / SG.	70

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Tempos das coletas dos espécimes clínicos e variáveis periodontais. 60

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

°C: graus centígrados ou grau celsius

µg: micrograma

µl: microlitros

µM: micromolar

bp: pares de bases

DNA: ácido desoxirribonucleico

Dntp: di-nucleotídeo fosfato (mistura de oligonucleotídeos)

g: gravidade

HLA: antígeno humano leucocitário

ig: índice gengival

IL: interleucinas

ip: índice de placa

Kb: Kilo base

LPS - lipopolissacarídeo

MgCl₂: cloreto de magnésio

ml: mililitro

mM: milimolar

nic: nível de inserção clínica

PCR: reação em cadeia da polimerase

PCS: profundidade clínica de sondagem

P.gingivalis: Porphyromonas gingivalis

qsp: quantidade suficiente para

sg: índice sangramento gengival

Taq: *Termophilus aquaticus*

U: unidade

V: volts (voltagem)

SUMÁRIO

Resumo	
Abstract	
Lista de ilustrações	
Lista de tabelas	
Lista de quadros	
Lista de abreviaturas e símbolos	
1 INTRODUÇÃO	18
2 PROPOSIÇÃO	22
3 REVISÃO DE LITERATURA	23
3.1. Biofilme dental	23
3.1.1. Composição microbiana do biofilme dental	25
3.2. Microbiologia da doença periodontal	26
3.2.1. Estudos pioneiros	27
3.2.2 Declínio do interesse em microrganismos	28
3.2.3. Hipótese da placa não específica	28
3.2.4. Retorno da especificidade na etiologia microbiana das doenças periodontais	29
3.2.5. Mudança nos conceitos da etiologia microbiana das doenças periodontais	30
3.2.6 A importância da <i>Porphyromonas gingivalis</i> na doença periodontal	31

3.3. PCR na identificação de patógenos periodontais supra e subgengivais	32
3.4. Pré-requisitos para início e progressão da doença periodontal	33
3.5. Importância do controle de placa supragengival na doença periodontal	36
3.6. Tipos de sistemas de liberação para manutenção da saúde periodontal	38
3.7. Características dos dentifrícios	38
3.8. Requisitos para sistemas de liberação de agente antimicrobiano	39
3.9. Considerações sobre o agente antimicrobiano	40
3.10 Modo de ação da clorexidina	41
3.11. Efeitos colaterais da clorexidina	44
3.12 Indicações quanto ao uso da clorexidina	46
3.13 Aplicação clínica da clorexidina	47
4 MATERIAIS E MÉTODOS	55
4.1 Seleção dos indivíduos	55
4.1.1 Critérios de inclusão	55
4.1.2 Critérios de exclusão	56
4.1.3 Metodologia da seleção dos indivíduos	56
4.2 Coleta dos espécimes clínicos	58
4.3 Procedimentos laboratoriais	61
4.3.1 Extração dos DNA bacterianos	61

4.3.2 PCR – Amplificação	61
4.3.3 Iniciadores (Primers)	62
4.4 Análise estatística	62
5 RESULTADOS	65
6 DISCUSSÃO	72
7 CONCLUSÕES	81
8.REFERÊNCIAS	82
ANEXO 1: Materiais permanentes e de consumo	98
ANEXO 2: Fotos clínicas durante a dinâmica do experimento	100
ANEXO 3: Carta de recomendação aos pacientes	101
ANEXO 4: Prontuário periodontal	102
ANEXO 5: Ficha clínica periodontal	103
ANEXO 6 :Carta de apresentação e consentimento esclarecido do participante da pesquisa.	104
ANEXO 7: Carta de autorização para fins de diagnóstico periodontal	105
ANEXO 8: Carta de responsabilidade	106
ANEXO 9 : Índices de Ainamo & Bay, Løe & Silness, Silness & Løe e Coleta de dados	107
ANEXO 10: Registro CEP UNISA Nº 12/2003	108
ANEXO 11: Registro no comitê de ética em pesquisa do centro biomédico - UFES	109
ANEXO 12: Registro da ata de aprovação do projeto de pesquisa	110
ANEXO 13: Registro do extrato da ata de aprovação do projeto de pesquisa	111
ANEXO 14: Registro do projeto de pesquisa no CONEP	112

ANEXO 14.1: Continuação do registro do projeto de pesquisa no CONEP	113
ANEXO 15: Tabelas e gráficos	114

1 INTRODUÇÃO

A doença periodontal é um termo amplamente utilizado para definir uma variedade de condições que atingem as estruturas de suporte do dente, influenciando negativamente a saúde bucal. Este problema pode ser consequência de distúrbios sistêmicos ou pode ter sede no próprio periodonto (SILVA et al., 1997).

A partir do modelo de gengivite experimental de Løe et al. (1965) deduziu-se que a placa supragengival é o fator etiológico principal para a gengivite. Estudos posteriores que utilizaram o mesmo protocolo experimental demonstraram que agentes que inibiram substancialmente o acúmulo de placa supragengival podiam prevenir o desenvolvimento da gengivite (SIEGRIST et al., 1986). Inicialmente, pensou-se que toda gengivite levaria à destruição periodontal, entretanto, atualmente, já é compreendido que nem toda gengivite progride para periodontite (LISTGARTEN, 1986). Mas é geralmente aceito que a presença da gengivite, como resultado da resposta inflamatória à presença da placa supragengival, é um fator predisponente para progressão da doença, ao fornecer um nicho ecológico para mudanças da microbiota da placa, que pode se tornar mais patogênica e conseqüentemente facilitar um tipo de colonização microbiana subgengival, podendo levar à destruição periodontal (CHRISTERSSON et al., 1989).

Há uma forte evidência de que um excelente controle do biofilme supragengival reduz e pode prevenir a colonização subgengival (SANTOS, 2003; DAHLÉN et al., 1992). Estudos longitudinais têm mostrado que um excelente controle do biofilme dental individual obtido com a profilaxia, instrução de higiene oral e motivação, pode resultar na cessação da progressão da doença periodontal nas populações estudadas (LINDHE e NYMAN, 1975; AXELSSON e LINDHE, 1978). Conseqüentemente, o princípio de prevenção da doença periodontal por meio do

controle de placa supragengival é bem estabelecido. Infelizmente, os estudos demonstram alta incidência de inflamação gengival, associando ao fato de que grande parte dos indivíduos não realiza o controle de placa requerido para manter a saúde periodontal (VAN DER OUDERAA, 1991). Para muitos pacientes, o método usual de escovação geralmente é insuficiente em garantir um controle de placa compatível com a saúde oral por longos períodos de tempo (WILSON, 1987; MARSH, 1991).

O conhecimento a respeito do papel dos microrganismos na iniciação da gengivite e progressão para periodontite aumentou drasticamente, após o reconhecimento da placa bacteriana como o fator etiológico principal na gengivite. Baseado na associação de microrganismos com doenças periodontais, tem sido defendida a incorporação de agentes antimicrobianos nos produtos dentários como um meio de controlar a placa dental e a gengivite (HULL, 1980; KORNMAN, 1986), principalmente os compostos que agem como adjuntos aos métodos mecânicos (ADDY, 1986). Assim, o digluconato de clorexidina a 0,2% (enxaguatório) foi o primeiro antimicrobiano que mostrou inibir a formação da placa e desenvolvimento da gengivite (LÖE e SCHIÖTT, 1970). No entanto, enquanto o colutório é um veículo bem sucedido para liberação de agentes antiplaca, a incorporação desses compostos nos dentifrícios é mais difícil de ser obtida devido a problemas na formulação (MARSH, 1991).

Em 1974, já existiam mais de 70 estudos a respeito do controle químico da placa estabelecendo que a clorexidina, nos enxaguatórios, é o agente antiplaca mais efetivo (ADAMS e ADDY, 1994) sendo importante também na prevenção da gengivite (HULL, 1980; ADDY, 1986; KORNMAN, 1986). A eficácia clínica da clorexidina parece ser derivada da adsorção do anti-séptico às superfícies oral, com

persistência de atividade antimicrobiana por muitas horas (SCHIOTT et al., 1970; ADDY et al., 1991), sendo denominada de substantividade. Essa característica relacionada à natureza dicatiônica da molécula, permite interações com moléculas carregadas negativamente na cavidade oral (ROLLA et al., 1970, 1971). Assim, é empregada como controle positivo de novas fórmulas. A redução do índice de placa pode estar em torno de 60%, enquanto o índice gengival pode ser reduzido em 1/3 (ADAMS e ADDY, 1994).

De todos os métodos de remoção de placa, a escovação é o método universalmente mais usado. A escovação dental, ao empregar uma variedade de técnicas e escovas, reduz a quantidade de placa presente nas superfícies bucal e lingual e, em alguns casos, sobre a superfície interproximal dos dentes. (SILVA et al., 1997).

A adição de agentes antimicrobianos aos dentífrícios tem sido sugerida como um possível método de controle de placa e prevenção de doença periodontal. Embora a adição de antibióticos não seja aceitável devido ao seu dano potencial, materiais anti-sépticos, extrato de ervas, químicos naturais e enzimas têm sido incorporados com o objetivo de produzir um efeito anti-placa clínico (MORAN et al., 1988; WU-YUAN et al., 1990).

Entretanto, a mesma reatividade da clorexidina também cria dificuldades nas suas formulações. Ingredientes comumente usados nos produtos de higiene oral, tais como detergentes aniônicos, podem reduzir a efetividade da clorexidina. Cremes dentais com clorexidina parecem difíceis de serem manipulados, e isso pode explicar resultados equivocados de estudos clínicos (JOHANSEN et al., 1972; 1975).

Deste modo, considerando que o uso diário de escova e creme dental é o método mais comumente utilizado para controle de placa pela população e uma vez

que a clorexidina é um antimicrobiano comprovadamente eficaz no controle de placa bacteriana e desenvolvimento da gengivite, parece relevante avaliar o efeito clínico-microbiológico da aplicação de um dentifício contendo 0,12% de clorexidina sobre o biofilme da placa dentária supragengival em indivíduos com histórico de periodontite tratada.

2 PROPOSIÇÃO

A proposta deste trabalho é avaliar o efeito da pasta dental contendo clorexidina no controle da inflamação gengival e da retenção do biofilme dental em indivíduos periodontalmente tratados conduzido de forma aleatorizada e duplo-cego.

A avaliação clínica utilizará como parâmetros: os Índices de Placa (SILNESS e LÖE, 1964), Gengival (LÖE e SILNESS, 1967), Sangramento Gengival (AINAMO e BAY, 1975), Profundidade Clínica de Sondagem e Nível de Inserção Clínica.

A avaliação microbiológica será realizada qualitativamente, através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), verificando o microrganismo periodontopatogênico, *Porphyromonas gingivalis*, considerado o mais agressivo dos complexos microbianos presentes no biofilme dental em sulcos gengivais de pacientes periodontalmente tratados.

3 REVISÃO DE LITERATURA

As doenças periodontais e cáries dentárias são consideradas as doenças orais mais prevalentes e também estão entre as causas principais de perda de dentes permanentes no homem. As doenças periodontais destrutivas são caracterizadas pela perda de tecido de suporte do dente. Essa perda freqüentemente compromete a função e estética e também pode estar associada com dor e desconforto (ALBANDAR et al., 1999). Além disso, há uma recente evidência sugerindo que a periodontite destrutiva pode ser um fator de risco para problemas sistêmicos, tais como doença cardiovascular e nascimento de bebês com baixo peso (BECK et al., 1996; OFFENBACKER et al., 1996).

A prevalência de doença periodontal varia significativamente em diferentes regiões do mundo e há indicativos que seja mais prevalente em países em desenvolvimento. Em um recente estudo com 853 adultos de uma população urbana no Brasil (estado do Rio Grande do Sul) foi constatado que há uma alta ocorrência de perda de inserção nesses indivíduos, pois 79% e 52% deles possuíam dentes com nível de inserção clínica ≥ 5 e ≥ 7 mm respectivamente (SUSIN et al., 2004). Por ser de alta prevalência e por ter um impacto na qualidade de vida do indivíduo, a prevenção desta patologia se faz muito importante, mesmo em níveis epidemiológicos.

3.1 Biofilme dental

As doenças periodontais são infecções causadas por microrganismos que colonizam a superfície dentária podendo estar abaixo da margem gengival (Fig.1 e 2). Enquanto essas infecções possuem muitas propriedades em comum com outras infecções, elas exibem propriedades únicas devido ao seu sítio de colonização e a natureza do ambiente em que elas residem (SOCRANSKY e HAFFAJEE, 2002).

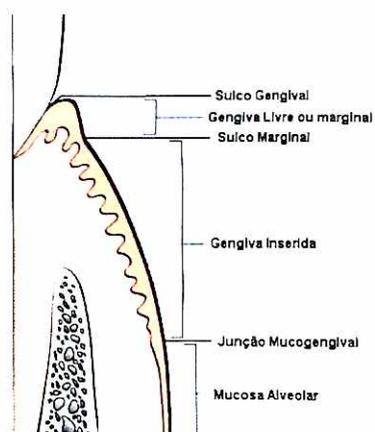


Fig.1. Diagrama limites anatômicos da gengiva

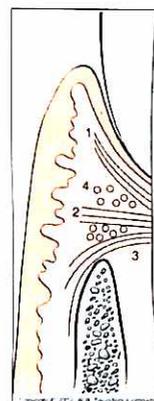


Fig.2. Diagrama de fibras dentogengivais

O biofilme oral é uma denominação mais recente para placa bacteriana. Em linhas gerais, os biofilmes consistem em uma ou mais comunidades de microrganismos, embebidos no glicocálix, inseridos em uma superfície sólida. A razão para a existência do biofilme é o fato de o mesmo permitir adesão e multiplicação dos microrganismos na superfície (SOCRANSKY e HAFFAJEE, 2002).

A película adquirida é a precursora da placa dental. Ela recobre todas as superfícies da cavidade bucal, inclusive as superfícies dos tecidos mineralizados ou não. O material que forma a película é originado da saliva, do fluido gengival, de produtos microbianos e dos tecidos do hospedeiro. As bactérias podem ser encontradas na película em poucas horas. A colonização primária é feita por espécies bacterianas predominantemente facultativas e gram-positivas *Actinomyces ssp* e *Streptococcus sp*. Esta colonização inicial ocorre de maneira específica e seletiva.

Os colonizadores secundários da placa são microrganismos que não iniciam a colonização da película adquirida e dependem de uma colonização prévia. Dentre eles, estão bactérias consideradas periodontopatogênicas como *Prevotella*

intermedia, espécies de *Capnocytophaga*, *Fusobacterium nucleatum spp*, e *Porphyromonas gingivalis*. Diferentes das bactérias constituintes da colonização inicial, as bactérias que predominam na placa madura são anaeróbicas, assacarolíticas e usam aminoácidos e pequenos peptídeos como fonte de energia. Um mecanismo importante que possibilita certas bactérias de colonizarem o biofilme é a coagregação. A placa denominada madura é caracterizada por um equilíbrio entre as espécies que compõem o biofilme. Nela ocorre pouca sucessão bacteriana e o seu aumento de volume é determinado pelo equilíbrio entre os fatores ecológicos do meio e as bactérias do biofilme (MARSH, BRADSHAW, 1995; KOLENBRANDER, LONDON, 1993).

3.1.1 Composição microbiana do biofilme dental

Estima-se que mais de 500 espécies possam ser encontradas na placa dental. Recentemente, Socransky et al. (1998), examinaram mais de 13000 amostras de placa bacteriana em 185 indivíduos (Fig.3). Demonstraram que há presença de grupos microbianos específicos no interior da placa. Foram encontrados seis grupos intimamente associados de espécies bacterianas. Eles incluíam: *Actinomyces*, um complexo amarelo com membros do gênero *Streptococcus*, um complexo verde com espécies *Capnocytophaga*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* sorotipo A, *Eikenella corrodens* e *Campylobacter concisus*; e um complexo roxo, com *Veillonella parvula* e *Actinomyces odontolyticus*. Esses grupos de espécies são colonizadores recentes da superfície dentária, e seu crescimento geralmente precede a multiplicação dos complexos laranja e vermelho. O complexo laranja inclui *Fusobacterium nucleatum spp*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Peptostreptococcus micros* e espécies de *Campylobacter*, considerados periodontopatógenos de segundo nível. O aparecimento do complexo

laranja parece depender da colonização prévia dos complexos verde e amarelo. O complexo vermelho é considerado o mais patogênico, incluindo microrganismos como *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis* e *Treponema denticola*. Este complexo foi fortemente relacionado com o aumento da profundidade de bolsa, sangramento à sondagem e com a periodontite crônica.

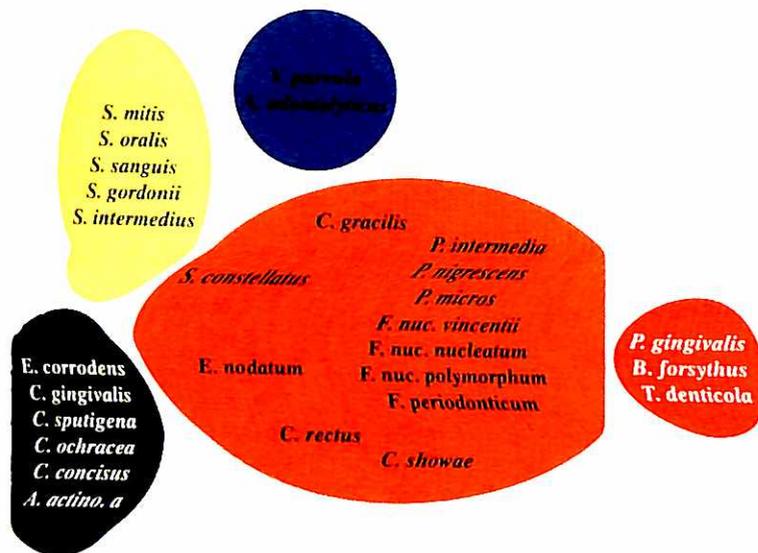


Fig.3. Complexos microbianos segundo Socransky et al., 1998.

No biofilme dental subgingival encontra-se uma proporção mais elevada de microrganismos dos complexos vermelho e laranja, enquanto que no biofilme dental supragingival, foram identificadas maiores proporções de microrganismos dos complexos verde e roxo (SOCRANSKY; HAFFAJEE, 2002).

Inúmeras técnicas têm sido pesquisadas e utilizadas para detecção de patógenos periodontais como microscopia, métodos imunológicos, detecção molecular e testes enzimáticos (FERES; GONÇALVES, 2001).

3.2 Microbiologia da doença periodontal

As doenças periodontais são infecções causadas por microrganismos que colonizam a superfície do dente abaixo ou na própria margem gengival. Embora seja

estimado que centenas de milhões ou bilhões de bactérias colonizam continuamente o dente ou a margem gengival ao longo da vida, a maioria dos sítios periodontais, na maior parte dos indivíduos, não exhibe perda das estruturas de suporte dos dentes em nenhum momento. A compreensão deste fato é crítica. A relação ecológica entre a microbiota periodontal, o hospedeiro e o dano às estruturas de suporte do dente não são freqüentes. Ocasionalmente, espécies bacterianas são introduzidas, crescem ou exibem novas propriedades que levam à destruição do periodonto. O resultado desse equilíbrio ecológico estressante geralmente é corrigido espontaneamente, ou mantido por terapia. Em um outro momento, espécies microbianas continuam a colonizar abaixo ou acima da margem gengival, à espera de um novo equilíbrio.

Os microrganismos que causam doença periodontal residem em biofilmes presentes nos dentes ou superfícies epiteliais. O biofilme fornece um ambiente protetor para colonização de microrganismos e execução de suas atividades metabólicas. Por outro lado, podem ser um ambiente efetivo para o hospedeiro destruir os microrganismos. Fatores como concentração de íons hidrogênio (pH), potencial de oxi-redução (Eh) e enzimas proteolíticas podem afetar o desempenho dos mecanismos de defesa do hospedeiro (SOCRANSKY; HAFFAJEE, 2003).

3.2.1 Estudos pioneiros

A busca dos fatores etiológicos das doenças periodontais iniciou-se na “Era de Ouro da Microbiologia” (1880-1920). Grupos de pesquisadores aplicaram as técnicas microbiológicas disponíveis nessa época para o estudo da microbiota oral e sugeriram a existência de agentes etiológicos específicos relacionados às doenças periodontais. Dentre esses agentes destacaram-se as amebas (apud BARRETT,

1914; LE CLEAR, 1915), as espiroquetas (apud KOLLE, 1917) e os *Streptococcus* (apud FISHER, 1927).

Neste período as mais variadas terapias foram propostas, incluindo injeções intramusculares de mercúrio (apud WHITE, 1915), amebicidas (apud SMITH, 1915) e vacinas autógenas preparadas com placa bacteriana dos próprios pacientes (apud BRIGGS, 1924; PATTERSON, 1915). Esses tratamentos, na maioria das vezes, traziam poucos benefícios aos pacientes. Com isso houve um declínio no entusiasmo inicial em se estabelecer a natureza infecciosa das doenças periodontais, e este conceito foi, então, completamente ignorado nas quatro décadas seguintes.

3.2.2 Declínio do interesse em microrganismos

O entusiasmo inicial na identificação das doenças periodontais destrutivas perpetuou até meados de 1930. Durante o período de 1920 até o início de 1960, a atitude em relação à etiologia da doença periodontal mudou. Nas primeiras duas décadas desse período, pensou-se que a doença periodontal era resultado de alguma alteração sistêmica do paciente (apud BUNTING, 1922), atrofia por desuso (apud GOTTLIEB, 1928) ou trauma de oclusão (apud PRINTZ, 1926). As bactérias seriam meramente invasores secundários desse processo, contribuindo para a inflamação observada na destruição periodontal (apud GOTTLIEB, 1928).

3.2.3 Hipótese da placa não específica

O tratamento dos pacientes baseados na compreensão dos defeitos constitucionais ou trauma de oclusão não foi efetivo no controle das doenças periodontais. Ao final de 1950, os clínicos reconheceram que o controle de placa era essencial para o tratamento satisfatório de pacientes periodontais. Então,

novamente pensou-se que a bactéria tinha papel essencial na etiologia da doença periodontal destrutiva, mas como agente causal não específico. De acordo com essa hipótese de placa não-específica, qualquer acúmulo de microrganismos na margem gengival ou abaixo da mesma iria produzir irritantes que levariam à inflamação, que seriam então responsáveis pela destruição periodontal (SOCRANSKY e HAFFAJE 2003).

3.2.4 Retorno da especificidade na etiologia microbiana das doenças periodontais

Em 1960, o interesse na etiologia microbiana específica da doença periodontal foi reacendido por dois grupos de experimentos. O primeiro demonstrou que a doença periodontal poderia ser transmitida entre animais portadores ou não de doenças periodontais. Foi observado, por meio de cultura, que espécies isoladas de placas bacterianas tinham capacidade de causar a doença em animais saudáveis, ao passo que outras não (KEYES e JORDAN, 1964).

Nesse mesmo período foi demonstrado que espiroquetas, com uma morfologia ultra-estrutural única, poderiam ser detectadas em culturas puras de amostras de tecido conjuntivo e epitelial coletadas de lesões de gengivite necrosante. Fato este, que não foi observado nas amostras de indivíduos saudáveis ou com outras formas da doença (ARMITAGE, 1982; LISTGARTEN, 1965).

O reconhecimento de que a composição da placa associada a sítios com perda progressiva de inserção diferia consideravelmente da placa bacteriana encontrada em sítios saudáveis, e que certas formas de doença periodontal eram patologias associadas a microrganismos específicos, trouxe à tona a “hipótese da placa específica” (MANDELL e SOCRANSKY, 1981; LISTGARTEN e HELLDEN, 1978).

3.2.5 Mudança nos conceitos da etiologia microbiana das doenças periodontais

Ao final de 1960, foi aceito que a placa dental, de alguma forma, era associada à doença periodontal humana. Acreditava-se que a presença de placa bacteriana iniciava uma série de eventos não definidos que levariam à destruição do periodonto. Assim, a composição da placa era similar de paciente para paciente e de sítio a sítio em um mesmo paciente. A variabilidade foi reconhecida, mas a verdadeira extensão nas diferenças da composição bacteriana não foi apreciada.

Estudos clássicos como do de Løe et al. (1965, 1967) demonstraram que o acúmulo de placa precedia diretamente e iniciava a gengivite. Muitos pesquisadores acreditavam que a gengivite era danosa e levava à eventual destruição dos tecidos periodontais, provavelmente por eventos mediados pelo hospedeiro.

Ainda certas discrepâncias continuam confundindo clínicos e pesquisadores. Se todas as placas são mais ou menos semelhantes e induzem uma resposta sistêmica no hospedeiro, por que a destruição periodontal pode ser localizada, ao afetar um único dente e não o seu adjacente? Se a placa é importante para a destruição periodontal, por que certos pacientes acumulam muita placa, freqüentemente acompanhado por gengivite, mas falham, mesmo após muitos anos, em desenvolver destruição das estruturas de suporte? Por outro lado, por que alguns indivíduos com pouca placa ou inflamação clínica detectável desenvolvem destruição periodontal severa? Se a inflamação é o principal mediador da destruição periodontal, por que muitos dentes continuam presentes mesmo com gengivite? (SOCRANSKY e HAFFAJEE, 2003)

O reconhecimento das diferenças na composição da placa bacteriana de paciente para paciente e sítio a sítio em um mesmo paciente levou a uma série de pesquisas (SOCRANSKY e HAFFAJEE, 2003).

3.2.6 A importância da *Porphyromonas gingivalis* na doença periodontal:

A bactéria *P. gingivalis* são bastonetes gram - negativos, anaeróbios estritos sendo um dos periodontopatógenos mais importantes que habitam o biofilme oral. O *P. gingivalis* possui um dos mais altos potenciais de virulência dos microrganismos testados até então. São três os fatores que expressam virulência: fimbrias, gingipaína e lipopolissacarídeos. A fimbria do *P. gingivalis* e outros patógenos humanos mediam a aderência a receptores específicos nas células do hospedeiro, tais como células epiteliais. As fimbrias também induzem a internalização bacteriana ao ativar e mobilizar o citoesqueleto da célula epitelial. As gingipaínas são proteases cujas principais funções são a aquisição de nutrientes através da degradação de proteínas em peptídeos. A degradação de opsoninas séricas do hospedeiro pelas gingipaínas contribui para a resistência à fagocitose e formação de abscessos difusos em camundongos (GENCO et al., 1991). O lipopolissacarídeo (LPS) é uma molécula presente na membrana externa de bactérias gram-negativas, importante para a integridade estrutural e a atividade biológica bacteriana. O LPS do *P. gingivalis* é único, baseado na sua estrutura química e distribuição de polissacarídeos e regiões lipídicas, bem como na sua atividade biológica (EZZO, CUTLER, 2003). Essas propriedades podem estar entre as razões pelas quais esse microrganismo é freqüentemente associado à destruição tecidual ativa (PAGE et al., 1997), ou seja, ao ser liberado após a morte bacteriana, o LPS ativa a resposta imunológica (imunidade adaptativa) tanto humoral quanto celular.

Antes de iniciar a discussão a respeito dos estudos longitudinais, é importante considerar que o *P. gingivalis* e *T. forsythensis* freqüentemente são encontrados juntos em sítios com a doença periodontal, sendo difícil discuti-los isoladamente.

Sendo assim, Tanner et al. (1998) observaram que o número de *T. forsythensis* é mais elevado na gengivite, ocasião em que o *P. gingivalis* é encontrado em baixos números. A situação se inverte à medida que a perda óssea avança nos casos de periodontite, sendo o mesmo observado por Matchei et al. (1999) ao acompanhar 415 indivíduos com doença mínima por 5 anos.

Em alguns estudos tem sido demonstrado que existe uma correlação positiva entre níveis elevados de imunoglobulinas G (IgG) para *P. gingivalis* e a severidade da doença, onde o número de anticorpos é alto para este microrganismo (LAMSTER, ET AL, 1998; SAKAI, ET AL, 2001).

Chavez et al. (2000) submeteram 39 indivíduos a tratamento periodontal inicial e observaram que o *P. gingivalis* foi freqüentemente encontrado no biofilme de pacientes que apresentavam perda óssea progressiva após o tratamento.

Por fim, Ezzo e Cluter (2003) concluíram em revisão de literatura recente que a presença do *P. gingivalis* na placa subgengival aumenta o risco de desenvolvimento de periodontite crônica e reduz a possibilidade de sucesso após terapia periodontal.

3.3 PCR na identificação de patógenos periodontais supra e subgengivais

Até o momento várias tecnologias diagnósticas têm sido utilizadas para detectar e quantificar espécies bacterianas que foram identificadas como patógenos periodontais. Dentre os métodos disponíveis citam-se a cultura e o PCR. O método de cultura tem desempenhado um papel fundamental na caracterização da microbiota do biofilme dentário e ainda é considerado como método de referência. Nessa abordagem, o biofilme é inserido num meio seletivo ou não seletivo, e a microbiota cultivável predominante é identificada. A principal vantagem da cultura é a identificação da maior parte dos microrganismos. Além disso, é o único método

disponível atualmente para determinar a suscetibilidade e resistência bacteriana a antibióticos. Os métodos de cultura ainda são procedimentos de rotina na maioria dos laboratórios microbiológicos médicos. Entretanto, esse método é de alto custo, sensível à técnica e consome muito tempo até sua finalização (WOLFF et al., 1994). Além disso, a cultura não detecta microrganismos não viáveis e algumas espécies bacterianas que não crescem nos meios disponíveis. Essas dificuldades na técnica levaram ao desenvolvimento de outros meios de detecção bacteriana, incluindo a tecnologia com PCR (TSAI et al., 2003).

A PCR é um método de detecção molecular que envolve a amplificação de uma região de molécula de DNA. Um pedaço de DNA, consistindo em uma seqüência conhecida de nucleotídeos (primer), específica para o microrganismo-alvo e empregada na reação. O produto da amplificação do DNA, obtido depois de repetidos ciclos de desnaturação, anelamento e extensão do DNA indicará a presença do microrganismo procurado. A vantagem do PCR em relação aos outros métodos está no fato de ser relativamente simples, ser extremamente sensível e rápido (MULLIS e FALOONA, 1987). A limitação está no fato de detectar espécies viáveis e não viáveis. Essa técnica não é quantitativa, mas a princípio, fornece um controle positivo ou negativo para espécies bacterianas específicas. É um teste que detecta apenas o microrganismo alvo (VAN WINKELHOF, 2003).

3.4 Pré-requisitos para início e progressão da doença periodontal

Uma característica comum de muitas doenças infecciosas é o fato de espécies patogênicas poderem colonizar o hospedeiro e o mesmo poder não manifestar características clínicas da doença por semanas ou décadas. Então, parece que a progressão da doença periodontal é dependente da ocorrência simultânea de um número de fatores (SOCRANSKY e HAFFAJEE, 1992; 1993).

O início da periodontite crônica está associado ao acúmulo de biofilme dental supragengival na margem gengival. A gengivite também pode predispor alguns sítios suscetíveis a formas mais graves de doença periodontal desde que certas espécies bacterianas que predominam na periodontite, mas que não são detectáveis no periodonto saudável, tenham sido encontradas em baixas proporções na gengivite (MOORE et al., 1987). Tais dados sugerem que condições ambientais que são desenvolvidas durante a gengivite (por exemplo, sangramento, aumento do fluxo do fluido gengival, etc.) podem favorecer a subsequente colonização ou crescimento de algumas das espécies implicadas na periodontite. Esses microrganismos podem estar presentes na saúde e em números baixos não sendo capazes de induzir doença. A periodontite também pode se desenvolver em alguns indivíduos independente de uma gengivite pré-existente (CHRISTERSSON et al., 1989). Nesta situação, a colonização por bactérias periodontopatogênicas pode ser favorecida por outros fatores, tais como os genéticos (receptores HLA na superfície de células eucarióticas).

No entanto, embora as bactérias sejam essenciais para o início e progressão da doença, provavelmente não são suficientes. Esse conceito está baseado no fato de que patógenos periodontais podem estar presentes em indivíduos sem sinais clínicos da doença. Para que a doença se desenvolva, é necessário que o hospedeiro seja suscetível. A natureza da suscetibilidade para a doença periodontal destrutiva ainda não está totalmente elucidada. Atualmente, vários fatores têm sido associados ao aumento da suscetibilidade, e esses incluem a idade, pobre higiene oral, fumo, estresse, doenças sistêmicas, imunodepressão (neutropenia) e traços genéticos (polimorfismo). Nenhum desses fatores provavelmente é capaz de provocar doença isoladamente, pois acredita-se que a associação desses fatores

de risco seja necessária para iniciar o processo de doença. Por esta razão, a periodontite é considerada uma desordem multifatorial (VAN WINKELHOF, 2003).

Uma outra característica essencial da periodontite é o fato de que nem todos os pacientes com a doença são infectados subgengivalmente pelos mesmos patógenos. Pelo contrário, a composição do biofilme subgengival difere significativamente entre pacientes com periodontite (VAN WINKELHOF, 2003).

O mecanismo preciso pelo qual a bactéria causa destruição tecidual ainda está sendo estabelecido (Fig. 4). Estudos laboratoriais têm mostrado que bactérias dos sítios com destruição periodontal podem liberar enzimas com potencial danoso para o tecido, produtos citotóxicos do metabolismo tais como ácidos, amônia e aminas, e antígenos com atividades biológicas, incluindo alguns que são quimiotáticos (SLOTS; GENCO, 1984). O hospedeiro pode elaborar uma resposta imunológica à agressão bacteriana e a inflamação resultante também pode levar ao dano tecidual, por exemplo, seguindo a liberação de enzimas proteolíticas e linfocinas a partir de células fagocíticas do hospedeiro (GENCO, SLOTS, 1984).

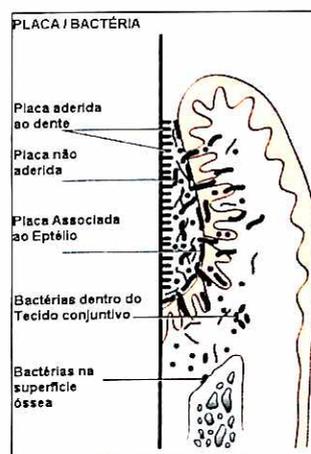


Fig.4 Diagrama representando associação biofilme dental / bactéria com a superfície do dente e tecidos periodontais.

Em linhas gerais, pode-se concluir que o hospedeiro deve estar susceptível tanto sistemicamente como localmente. O ambiente local deve conter espécies bacterianas capazes de levar à infecção ou pelo menos não inibir a atividade do patógeno. O ambiente também deve ser um meio condutor para expressão de fatores de virulência pelo patógeno. O patógeno deve estar em quantidade suficiente para iniciar e causar a progressão da infecção no indivíduo em um dado local. Felizmente a ocorrência simultânea desses fatores não ocorre freqüentemente, pois, caso contrário, a doença periodontal seria mais prevalente e severa na população (SOCRANSKY e HAFFAJEE, 1992; 1993).

Assim, o tratamento da periodontite é baseado no controle do número bacteriano supra e subgingival. Os outros fatores de risco são muito difíceis (fumo, estresse) ou impossíveis de controlar (idade, hereditariedade).

3.5 Importância do controle de placa supragengival na doença periodontal

O papel da placa bacteriana na etiologia da gengivite e periodontite já foi bem estabelecido. O estudo de Løe et al. (1965) claramente demonstrou que a inflamação gengival esteve presente consistentemente após a formação da placa e a sua remoção pôde reverter esse processo.

A placa supragengival é exposta na saliva e aos mecanismos de remoção natural existentes na cavidade oral. Entretanto, embora esses mecanismos possam eliminar restos alimentares, eles não podem remover adequadamente a placa bacteriana. Portanto, a prática de higiene oral regular é um requisito para a apropriada eliminação da placa supragengival.

Essa prática requer não apenas técnica e motivação adequada do paciente, como também instrumentos específicos (ECHEVERRÍA e SANZS, 2003).

Embora as medidas de higiene oral possam prevenir a presença de gengivite, diferentes estudos têm demonstrado que a higiene oral regular, executada pelo próprio indivíduo e não supervisionada, não pode ser considerada um meio efetivo no tratamento periodontal, na ausência de uma terapia básica. (LOOS et al., 1988; LINDHE et al., 1989). Por outro lado, excelente higiene oral doméstica pode modificar tanto a quantidade como a composição da placa subgengival, sem futura perda de inserção (DAHLÉN et al., 1992). Estudos longitudinais a respeito do tratamento periodontal demonstraram que a manutenção de um alto padrão de higiene oral evita ou reduz a progressão da periodontite (AXELSSON e LINDHE, 1978; KALDAHL et al. 1993).

Além disso, há evidências que demonstram que a melhora da saúde oral e gengival, por várias décadas, observada em países desenvolvidos, tem sido associada com a diminuição da incidência de doença periodontal (HUGOSON et al., 1998). Assim, pode-se concluir que o controle supragengival da placa bacteriana é fundamental para a prevenção e tratamento das doenças periodontais, e com apropriada motivação e instrução por parte dos profissionais, a responsabilidade é dividida entre o profissional e o indivíduo (ADDY; 2003).

A limpeza mecânica dos dentes através da escovação com creme dental é a forma mais comum e potencialmente efetiva de higiene oral praticada pelos cidadãos de países desenvolvidos.

A limpeza mecânica regular dos dentes objetiva a manutenção de um nível de placa, qualitativa e/ou quantitativamente, que é compatível com a saúde gengival. Teoricamente, a limpeza mecânica dos dentes poderia prevenir as doenças periodontais, porém esse conceito parece não considerar a multiplicidade de fatores que influenciam a capacidade dos indivíduos em limparem os seus dentes o

suficiente para prevenir as doenças periodontais, como a motivação e coordenação motora na execução dessas atividades. Isso pode explicar, em parte, a alta prevalência da gengivite e periodontite. Assim, a adição de agentes químicos ao controle de placa pode ser justificada como meio de suprir as deficiências do controle mecânico (ADDY, 2003).

3.6 Tipos de sistemas de liberação para manutenção da saúde periodontal

Agentes designados para agir no biofilme dental supragengival podem ser liberados, a princípio, por veículos tópicos de liberação tais como dentifrícios, géis, colutórios, "sprays", vernizes e gomas de mascar (AINAMO e ETEMADZADEH, 1987), supondo compatibilidade apropriada do agente e do veículo durante a aplicação. Agentes para ação no biofilme dental subgengival podem ser aplicados sistemicamente ou localmente na bolsa e/ou sulco gengival periodontal utilizando irrigadores subgengivais ou sistemas com dispositivos de liberação lenta (VAN DER OUDERAA, 1991; KILLOY, 1998).

3.7 Características dos dentifrícios

Os dentifrícios possuem essencialmente três funções: leve ação abrasiva para prevenir formação de manchas, liberação de aroma e formação de espuma e presença de agentes antiplaca. Os géis se diferenciam dos dentifrícios por não conterem materiais abrasivos ou agentes espumígenos. Para liberar o agente antiplaca eficazmente, o dentifrício deve manter suas propriedades sem comprometer as funções básicas. A mistura complexa dos componentes deve ser química e fisicamente compatível com o agente antiplaca, gerando um produto que seja estável durante a estocagem, e que permita a liberação do agente para os sítios de ação, na forma biologicamente ativa, durante o tempo de aplicação. Na prática, poucos agentes antiplaca têm sido incorporados de modo eficaz em dentifrícios,

devido à incompatibilidade destes agentes com os excipientes (por exemplo, a interação da clorexidina com o lauril sulfato de sódio), além da natureza e complexidade do ambiente oral (CUMMINS e CREETH, 1992).

3.8 Requisitos para sistemas de liberação de agente antimicrobiano

Para qualquer tipo de sistema de liberação de agente antimicrobiano, os produtos designados para o controle do biofilme dental supragengival devem ser formulados de forma a consentir, tendo como princípios básicos:

- O produto deve fornecer um ambiente físico, químico e microbiologicamente estável para o agente ser dosado acima da meia vida projetada do produto.
- A formulação deve ser realizada para facilitar a ótima biodisponibilidade dos agentes no sítio de ação, na cavidade oral, durante o uso.
- O sistema de liberação do produto deve ser de fácil aceitação pelo paciente. Por isso, colutórios e, em particular, os dentífricos, são amplamente utilizados. Isso se deve às suas propriedades cosméticas que aumentam a percepção de frescor na boca e, portanto, são socialmente aceitáveis. Para manter essa aceitação, certas propriedades do produto tais como: aroma, remoção de manchas e sensação de frescor não devem ser comprometidas pela inclusão de agentes antiplaca. Conseqüentemente, os componentes básicos incorporados em um dentífrico para garantir essas propriedades, em particular agentes abrasivos suaves, agentes aromatizantes e espumígenos, devem ser compatíveis com o sistema antiplaca e vice-versa.
- O sistema antiplaca deve oferecer relação favorável de custo-benefício.

- O uso do sistema não deve resultar em reações adversas tais como manchas nos dentes e língua, alteração no paladar, descamação da mucosa ou alterações patogênicas na microbiota bucal (VAN DER OUDERAA, 1991).

É importante considerar que fatores como pH, força iônica, interação entre o agente e veículo de liberação, metabolismo e solubilidade podem influenciar a biodisponibilidade do agente antiplaca (VAN DER OUDERAA e CUMMINS, 1989).

Processos danosos envolvendo reação química e / ou interação química podem ocorrer entre o agente e os excipientes no veículo. O exemplo clássico de incompatibilidade química é a precipitação de sais de clorexidina e compostos quaternários de amônia na presença de moléculas de longas cadeias de surfactantes, tais como, o estearato e laurilsulfato de sódio (BARKVOLL et al., 1989). Essa precipitação inativa a clorexidina, sendo a principal razão da sua não biodisponibilidade quando incorporada ao dentifício convencional (JOHANSEN et al., 1975; VAN DER OUDERAA e CUMMINS, 1989). Além disso, essa reação prejudica a atividade da clorexidina quando na forma de enxaguatório, logo após a escovação com qualquer dentifício contendo este detergente na fórmula (OWENS et al., 1997).

3.9 Considerações sobre o agente antimicrobiano:

Um considerável número de fatores influencia o grau de eficácia do agente antiplaca obtido *in vivo*. Alguns desses fatores são propriedades do agente e outros resultam da necessidade de dosar o agente via o veículo de liberação. Os agentes antiplaca para aplicação tópica necessitam possuir 6 propriedades:

A – Eficácia antimicrobiana intrínseca contra microrganismos orais; o que sugere que agentes de amplo espectro devem ser usados;

- B – Substantividade;
- C – Estabilidade química durante a estocagem;
- D – Ausência de reações adversas, tais como alteração de cor ou interações com a mucosa;
- E – Segurança toxicológica;
- F–Segurança ecológica. Por exemplo, o agente não deve resultar em desenvolvimento de resistência bacteriana ou crescimento exagerado de espécies oportunistas.

Dessas seis propriedades, os três primeiros são relevantes a respeito de sua eficácia *in vivo*. A demais são considerações invioláveis para determinar se o agente pode ser usado (VAN DER OUDERAA, 1991).

Embora as propriedades antibacterianas não estejam necessariamente correlacionadas com atividade antiplaca, um agente antimicrobiano pode ter um considerável valor clínico ao suprimir seletivamente bactérias periodontopatogênicas em condições que poderiam proliferar, mesmo se tiver poucos efeitos na biomassa da placa dental. Por outro lado, um agente que interfere na taxa de acúmulo ou metabolismo da placa supragengival poderia inibir a produção de mediadores inflamatórios e assim reduzir o risco de desenvolvimento da gengivite (MARSH, 1991).

3.10 Modo de ação da clorexidina

A clorexidina (Fig.5) é uma base com carga positiva com átomos de hidrogênio uniformemente distribuídos ao longo de sua molécula; geralmente contém relativamente pequenos grupos lipofílicos, sendo mais freqüentemente usada como um sal de digluconato. O balanço hidrofílico/lipofílico é o principal fator

que influencia a atividade antibacteriana em uma série de biguanidinas relacionadas (DAVIES, 1973).

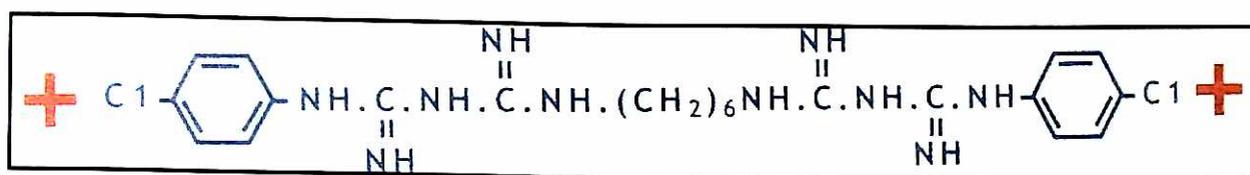


Fig.5. Molécula de clorexidina

O digluconato de clorexidina possui uma superfície extremamente ativa, reduzindo a tensão da água para 50 dinas/cm a 0,59% (concentração em que há formação de micelas). Isso indica que a molécula pode dobrar sobre si mesma, o que indica que possui uma porção hidrofílica e outra hidrofóbica (DAVIES, 1973).

A clorexidina, sendo positiva, interage com bactérias, pois estas carregam cargas negativas na sua superfície em valores de pH fisiológicos. Na neutralidade, a adsorção é rápida, extensiva e a concentração de clorexidina livre na solução é baixa embora dependente da cepa bacteriana. Sob condições ácidas, a superfície ionizada é suprimida e o efeito bactericida da clorexidina é fortemente reduzido. A afinidade da bactéria pelo bactericida é um importante fator determinante da potência antimicrobiana (DAVIES, 1973).

Esse agente se une fortemente às membranas celulares das bactérias, podendo levar a um aumento da permeabilidade com extravasamento de componentes intracelulares de baixo peso molecular, sendo uma ação bacteriostática. Porém, em concentrações maiores pode provocar a precipitação do citoplasma e morte celular, atuando como bactericida (GJERMO, 1989).

Após o primeiro relato da inibição completa da formação da placa pela clorexidina (LÖE e SCHIÖTT, 1970), se tornou-se evidente que esse efeito não

poderia ser explicado pela supressão geral da microbiota oral devido à morte bacteriana durante o bochecho.

Gjerme et al. (1970) mostraram que outros agentes antibacterianos com atividade igual ou mais intensa *in vitro* contra bactérias salivares não foram capazes de prevenir a formação da placa *in vivo*.

Ao mesmo tempo, Rölla et al. (1970) mostraram que a clorexidina possui uma forte afinidade às mucinas salivares *in vitro* e sugeriu que isso pode ser um importante mecanismo para explicar esse efeito *in vivo* da droga. Os autores sugeriram que as moléculas de clorexidina podem ser retidas nas superfícies orais por união eletrostática reversível, com uma subsequente liberação lenta a partir dos sítios de retenção, à medida que a concentração salivar diminui e a concentração relativa do cálcio aumenta.

Ainda nesse sentido, Hjeljord et al. (1973) estudaram a adesão da clorexidina a proteínas (albumina) *in vitro*. Observaram que a relativa força de adesão às proteínas pode ser significativa na retenção da clorexidina na cavidade oral, agindo como reservatório de atividade antibacteriana na boca. Para os autores, o estudo *in vitro* com as proteínas precipitadas em quantidade correspondente à provável quantidade presente *in vivo*, poderia sugerir a ocorrência de uma leve desnaturação da proteína adsorvida às membranas mucosas e aos dentes, e a lenta reversibilidade dessa reação pode ser uma explicação parcial para a retenção *in vivo* observada pela clorexidina na boca. Tal explicação pode ser considerada em relação ao fato de que a clorexidina permanece por um extenso período na cavidade oral, apesar da constante e relativamente rápida renovação salivar.

O alto grau de substantividade é uma das características mais importantes das drogas e agentes usados para o controle da placa bacteriana. Pode ser avaliado

por mensuração do número de bactérias salivares produzidas por agentes antimicrobianos (ELWORTH et al., 1996). Esse termo transmite a idéia de uma associação entre o agente e seu substrato, sendo uma associação maior ou mais prolongada do que a esperada por uma simples deposição mecânica. Agentes com alta substantividade manifestam uma adesão não específica por forças de Van der Waals (força de atração intermolecular que ocorre entre dipolos induzidos, sendo consideradas ligações fracas), atração iônica, atração hidrofóbica ou atração covalente a outros sítios além dos sítios primários de ação da droga tais como seus receptores. Dessa forma, agentes com alta substantividade são muito desejáveis para aplicação tópica oral (GOODSON, 1989).

Assim, as superfícies orais podem agir como um reservatório, ao liberar moléculas do agente por um período de tempo prolongado, em quantidades suficientes para manter o ambiente bacteriostático da cavidade oral e inibir as bactérias de suas atividades metabólicas essenciais para multiplicação e aderência (GJERMO, 1989).

Um exemplo da importância desta característica é verificado ao se comparar eficácia do bochecho de clorexidina com o composto quaternário de amônia na redução da contagem bacteriana. Para se aproximar ao efeito da clorexidina são necessários 4 bochechos diários com o composto quaternário de amônia (BONESVOLL e GJERMO, 1978).

3.11 Efeitos colaterais da clorexidina

O sabor amargo das soluções aquosas da clorexidina foi inicialmente considerado um grande obstáculo ao uso clínico da droga. Entretanto, a subsequente alteração de paladar (principalmente para doce e salgado) é um efeito colateral relatado por uma minoria de pessoas. A interferência na sensação é

causada por desnaturação de proteínas de superfície presentes nas papilas gustativas. Assim, Saxer e Linden (1977) e Asikainen et al. (1981) mostraram que o acréscimo de aromatizantes não reduziu sua eficácia, porém para Addy (1986) o sabor desagradável não pode ser totalmente mascarado por agentes aromatizantes.

Efeitos colaterais sistêmicos são extremamente raros, sendo que uma série de estudos não encontrou qualquer alteração. Com exceção da gengiva, dorso da língua e palato duro, a mucosa oral é revestida por um epitélio não queratinizado, sendo um tecido eficiente na absorção de muitas drogas e agentes aplicados topicamente. Como resultado, as drogas destinadas para uso tópico têm que apresentar baixa toxicidade aguda ou crônica (GOODSON, 1989). Desta forma, Foulkes (1973) e Løe (1973) afirmaram que o emprego da clorexidina nos procedimentos de higiene oral pode ser realizado seguramente, devido ao seu baixo nível de toxicidade, pois trata-se de uma molécula altamente estável e pobremente absorvida.

Existem relatos a respeito de erosão de mucosa devido ao emprego da clorexidina, porém não é um achado comum e parece ser dependente da concentração. Outro efeito extremamente raro e menos compreendido é o inchaço uni ou bilateral das glândulas parótidas (ADDY, 1986).

A alteração de cor dos dentes tem sido freqüentemente relatada como consequência da aplicação de clorexidina na boca e acredita-se que seja o efeito colateral mais importante, devido a problemas cosméticos que são criados (BANTING et al., 1989). As manchas são facilmente removidas através de profilaxia e polimento coronário (LÖE, 1973). Acredita-se que estejam relacionadas com a concentração deste agente, modo de aplicação e presença na dieta de agentes cromógenos. (GJERMO, 1989).

Segundo Jenkins et al. (1993) a euforia inicial com os estudos que demonstraram as propriedades antiplaca da clorexidina se confrontou com o reconhecimento de um efeito colateral local e cosmético deste anti-séptico. Para todos os tipos de fórmulas que incluem a clorexidina a formação de manchas nos dentes foi considerada o fator principal limitante ao uso de clorexidina por longo prazo como adjunto ou substituto da limpeza mecânica. Entretanto, os indivíduos deficientes mentais e de membros superiores são considerados uma exceção. Assim, as aplicações foram reduzidas a um período de médio e curto prazo, para obter os benefícios antimicrobianos em relação aos efeitos colaterais, e assim tem-se provado ser benéfica em uma variedade de situações clínicas (BINNEY et al., 1995; SMITH et al., 1995; RENTON-HAPER et al., 1996).

3.12 Indicações quanto ao uso da clorexidina

As indicações quanto ao uso da clorexidina no biofilme dental supragengival são diversas:

- (A) Auxiliar a higiene oral mecânica na terapia periodontal básica (GJERMO, 1974);
- (B) Pré-cirúrgico e pós-cirúrgico incluindo cirurgias periodontais, e alisamento radicular (DAVIES, 1977) e cirurgias para instalação de implantes;
- (C) Fixação intermaxilar (NASH e ADDY, 1979);
- (D) Deficientes físicos e mentais (STORHAUG, 1977; PANNUTI et al., 2003);
- (E) Pacientes comprometidos por medicação e predispostos à infecção oral (LANGSLET et al., 1974);
- (F) Pacientes com alto índice de cáries (ZICHERT et al, 1984);
- (G) ulceração oral recorrente (ADDY, 1977).

(H) Usuários de aparelho ortodôntico fixo e removível (BRIGHTMAN e TEREZHALMY, 1991).

3.13 Aplicação clínica da clorexidina

Løe e Schiott (1970) avaliaram o efeito do emprego do bochecho com clorexidina a 0,2% diário (1 ou 2 vezes ao dia) e aplicação tópica do gel a 2%. Observaram que o bochecho duas vezes ao dia preveniu efetivamente a formação da placa bacteriana e o desenvolvimento da gengivite ao contrário de um bochecho diário, ao passo que a aplicação do gel preveniu a formação de placa completamente.

Após esse estudo (LÖE e SCHIOTT, 1970), que levantou a possibilidade de controle de vários índices relativos aos tecido periodontais, Hennessey (1973) realizou um estudo para avaliar o espectro de ação do bochecho com digluconato de clorexidina a 0,2% em 3 voluntários. Foi observado que as bactérias presentes na saliva desses diferentes indivíduos variou consideravelmente em sua suscetibilidade à ação bacteriostática da clorexidina e sugeriu que possivelmente houve uma redução transitória. Nessa época os autores sugeriram a necessidade de mais estudos clínicos para avaliar se haveria indução de resistência bacteriana com o emprego desse agente.

No mesmo ano, Flotra (1973) apresentou resultados de uma série de estudos que estavam sendo realizados com o intuito de avaliar a eficácia de diferentes meios de aplicação local da clorexidina. Em um grupo de crianças com higiene oral supervisionada com dentifício de clorexidina a 0,8% observou-se que o índice de placa pode ser mantido em um baixo nível nesse sistema. Em pacientes deficientes a aplicação do gel de clorexidina a 0,8% em moldeiras por um período de 4 semanas levou à redução de 1/3 no índice de placa. Foi constatado que 15% das superfícies

interproximais e 7% das vestibulares apresentaram alteração na cor, que também ocorreu, em menor grau, nas restaurações. A aplicação do gel nos pacientes deficientes levou a uma descoloração intensa e 1/3 deles necessitaram de polimento profissional a cada 4 meses. Nenhum outro efeito colateral foi observado.

Posteriormente, Lennon e Davies (1975) avaliaram o emprego do gel de clorexidina 0,5% em 12 estudantes, que receberam profilaxia inicial (zero placa). Os participantes foram instruídos a escovar os dentes duas vezes ao dia com o gel, sendo que a cada período de duas semanas os grupos se alternavam entre o uso do gel placebo e do gel teste. Os resultados mostraram que o gel de clorexidina reduziu significativamente a formação de placa quando comparado com o gel placebo, mas a melhora na saúde gengival não foi estatisticamente significativa. Os autores justificam esse resultado devido à provável falta de calibração entre os examinadores.

Johansen et al. (1975) estudaram o efeito de dois dentifrícios com clorexidina a 0,1% e 0,4% na formação de placa, cárie e gengivite, em 73 estudantes por um período de 2 anos. Não encontraram diferenças significantes com o grupo controle nos índices avaliados e a alteração de cor nos dentes e restaurações foi a principal queixa dos participantes. Sugerem que os resultados podem estar relacionados com erros na metodologia empregada.

Assim, uma série de estudos foi realizada para analisar os efeitos do bochecho diário de gluconato de clorexidina a 0,2% por 2 anos, num grupo de estudantes dinamarqueses, sendo 61 no grupo teste e 59 no de controle. Em linhas gerais foi observado, em 1976, que o tratamento com clorexidina adicionado à escovação e profilaxia profissional reduziu a placa e a gengivite. O principal problema encontrado foi formação de manchas marrons na superfície dos dentes

(LÖE et al., 1976). Além disso, houve um decréscimo da 30 a 50% no total de microrganismos aeróbicos, anaeróbicos e *Streptococcus* na saliva, sem produzir uma alteração detectável ou relativa e sem favorecimento do crescimento de bacilos gram-negativos. Após cessação do tratamento, essa redução da microbiota desapareceu. O ecossistema microbiano na saliva pareceu relativamente pouco alterado (RINDOM-SCHIÖTT et al., 1976). O nível de toxicidade foi muito baixo segundo os parâmetros médicos analisados (hemoglobina, taxa de sedimentação, números de eritrócitos e leucócitos) (RINDOM-SCHIÖTT, et al., 1976). Da mesma forma, a análise do estrato córneo da mucosa oral nas amostras testes não foi detectavelmente diferente às do grupo controle (MACKENZIE et al., 1976). Também não foram observadas alterações nas atividades das enzimas estudadas, sendo que os tecidos não apresentaram qualquer evidência de alteração inflamatória crônica ou pré-maligna (NUKI et al, 1976).

Emilson e Fornell (1976) avaliaram o efeito da escovação diária (1X ao dia) com gel de clorexidina a 0,5% por 12 meses com 37 estudantes. Observaram que o gel teste não influenciou significativamente a formação de placa, condições gengivais, ou cáries ao ser comparado com o gel placebo. Nenhuma diferença foi observada do efeito do tratamento na contagem bacteriana salivar após 2 semanas, com exceção para o *S. sanguis*, que aumentou no grupo teste e reduziu após o término do tratamento. Não foram observadas tendências para a seleção ou proliferação de outros estreptococos, lactobacilos gram-negativos, leveduras ou estafilococos. Os autores sugerem que a quantidade de clorexidina no bochecho pode ser estimada em 20mg, sendo que apenas 2-3mg da droga foram usados a cada escovação. Assim, concluíram que a dose empregada pode não ter sido suficiente.

Do mesmo modo, Sjöblom et al. (1976) avaliaram a ação antimicrobiana de um dentífrico contendo clorexidina a 0,5% com 2 dentífricos contendo fluoreto. Dez estudantes participaram do estudo que se estendeu por 4 semanas. Cada dentífrico foi aplicado em moldeiras que foram utilizadas 2 vezes ao dia por 4 dias consecutivos. As moldeiras foram mantidas em posição por 1 minuto. Os resultados mostraram que o creme dental teste não se diferenciou do controle, segundo os parâmetros analisados, como o Índice de Placa (I.P.).

Russell e Bay (1978) realizaram um estudo clínico para avaliar o efeito da escovação diária de 3 minutos com dentífrico à base de gluconato de clorexidina a 1% não abrasivo (Cordysol®/Hibitane®) na placa dental, gengivite e aumento gengival em 30 crianças deficientes mentais epiléticas tratadas com fenitoína. Após 2 meses foi observada uma significativa redução no Índice de Placa (60%) e Índice Gengival, I.G. (1,14 para 0,91), sendo estatisticamente significativa, porém clinicamente não suficiente. Não houve redução do aumento gengival com o emprego do dentífrico. Foi observada alteração de cor dos dentes, porém em menor intensidade que no bochecho.

Etemadzadeh et al. (1985) realizaram um estudo para comparar o efeito inibitório de dois cremes dentais contendo fluoreto (0,1%), sendo um com adição de clorexidina (0,8%) e o outro com 1,7U/g de glucose oxidase. Empregaram dois grupos controle, sendo um com gel de clorexidina (1%) e outro com creme dental convencional à base de fluoreto. Foi observado que o controle positivo (gel de clorexidina a 1%) apresentou o melhor efeito inibidor de crescimento da placa dental, seguido do creme dental teste também à base de clorexidina. O outro dentífrico teste não diferenciou do controle negativo. Para os autores o efeito inibidor de placa do creme dental com clorexidina pode ser considerado satisfatório. Os autores ainda

sugerem que teoricamente a incorporação de clorexidina num agente abrasivo poderia ter a vantagem de que as partículas abrasivas poderiam eliminar as manchas causadas pelo agente antiplaca. O problema dessas combinações é que muitos cremes dentais tradicionais contêm sulfatos, fosfatos e detergentes aniônicos que interferem na atividade da clorexidina, não obtendo resultados comparáveis com os sistemas para bochecho ou géis (ETEMADZADEH et al., 1985).

Moran et al. (1988) mensuraram a contagem bacteriana salivar e a presença ou ausência de atividade antibacteriana na saliva após a escovação dentária com 7 dentifícios disponíveis comercialmente, comparando os seus efeitos com o gel de clorexidina a 1%. Em linhas gerais, todos os dentifícios produziram redução da contagem de estreptococos aeróbicos e anaeróbicos, sendo que o que continha hexetidina produziu efeitos mais significativos. Por outro lado, o dentifício contendo enzima e fluoreto de amina, teve pouco efeito na contagem bacteriana. O gel de clorexidina produziu uma grande redução na contagem salivar, que foi evidente por pelo menos 5 horas após a escovação. A atividade antibacteriana salivar esteve presente apenas imediatamente após a escovação com o creme dental com hexetidina, ao passo que o gel de clorexidina esteve presente por mais de 90 min após a escovação. Os autores sugerem que os dentifícios analisados possuem atividade antibacteriana salivar limitada e questionam o benefício relativo desses dentifícios na doença periodontal através do seu efeito antimicrobiano.

Addy et al. (1989) avaliaram o efeito na formação de placa por 4 dias de um dentifício comercialmente disponível de Triclosan a 0,2% de citrato de zinco a 0,5% com diferentes formulações experimentais de clorexidina a 0,5%. Todos os dentifícios avaliados reduziram significativamente a placa em comparação com a pasta controle (sem agente ativo), mas foram significativamente menos efetivos do

que o bochecho de clorexidina a 0,2%. Alguns participantes relataram distúrbios no paladar associados com a clorexidina (dentífrico). Os autores sugerem que a atividade do colutório com clorexidina é difícil de se igualar quando o agente é incorporado ao dentífrico. Acreditam que os detergentes podem reduzir a disponibilidade de clorexidina e assim explicar a redução de suas propriedades inibitórias. A complexidade de várias fórmulas torna difícil determinar se a atividade inibitória foi dependente somente do anti-séptico contido no dentífrico.

Jenkins et al. (1990) estudaram o efeito de vários dentífricos contendo clorexidina a 0,5% e triclosan a 0,2% com e sem citrato de zinco comparando os seus efeitos na redução de contagens salivares com o bochecho com clorexidina 0,2%. Participaram deste estudo 10 voluntários que realizaram a escovação por 1 minuto e as contagens bacterianas salivares foram realizadas ao final de 7 horas. Todos os dentífricos analisados diminuíram a contagem bacteriana, sendo que nenhum mostrou persistência de efeito antimicrobiano maior que 5 horas. Assim, observaram nesse estudo e em investigações anteriores, que a persistência da ação antimicrobiana de dentífricos após uma única escovação parece ser um útil modo de avaliar as contagens bacterianas salivares. Embora existam diferenças individuais entre vários dentífricos contendo clorexidina e triclosan, nenhum produziu reduções nas contagens bacterianas na magnitude e duração observadas com o bochecho com clorexidina. A maioria das pastas reduziu significativamente as contagens entre 1 a 3 horas, sendo que três apresentaram efeitos após 5 horas (0,2% de clorexidina; 0,5% clorexidina/betaína; 0,5% clorexidina/Tween 20).

Em estudo realizado pelos mesmos autores, em 1991, foi avaliado um creme dental com 1% de clorexidina/1000ppm de fluoreto formulado para garantir proporcionalmente alta biodisponibilidade do anti-séptico. Utilizando o modelo de

gingivite experimental, o dentifício teste produziu uma redução na placa dental e na gengivite e clinicamente significativa após 21 dias, comparado com o controle (dentifício contendo 1000ppm de fluoreto). Entretanto, a alteração de cor dos dentes foi marcadamente aumentada durante o uso da fórmula.

Em vista desses resultados animadores pareceu pertinente avaliar o dentifício no uso normal (doméstico). Assim, Yates et al. (1993) realizaram um estudo com 297 voluntários que iniciaram a pesquisa com um mínimo aceitável de gengivite. Foram coletados dados referentes aos índices de placa e gengival, sangramento, alteração de cor e cálculo. Foram manipulados 3 tipos de dentifícios, sendo : (1) 1% de clorexidina/1000ppm de fluoreto , (2) clorexidina a 1% e (3) base da fórmula, sem agentes ativos (controle). Os voluntários usaram o produto 2X ao dia, durante 6 meses, sendo que não receberam qualquer instrução de higiene oral adicional. Os índices de placa, gengival e o sangramento à sondagem melhoraram nos 3 grupos. Entretanto, a alteração de cor e o índice de cálculo aumentaram significativamente nos grupos testes em relação ao controle. Os autores sugeriram, então, que se esses efeitos colaterais forem aceitáveis, os cremes dentais com clorexidina deveriam ser recomendados com a mesma indicação clínica dos outros produtos que contêm clorexidina. A compatibilidade aparente do fluoreto com a clorexidina pode ser importante na prevenção de cárie.

Jenkins et al. (1993) avaliaram a eficácia de um dentifício contendo clorexidina a 1%, formulada para garantir alta disponibilidade desse anti-séptico. O estudo foi realizado em 19 dias, com 14 voluntários. Partindo de zero placa em todos os participantes, foi empregada a escovação duas vezes ao dia com o creme dental, sendo posteriormente avaliados os índices de placa e gengival, além da presença de manchas dentárias. O desenvolvimento de biofilme dental e gengivite foram

estatística e clinicamente significantes entre o grupo controle e teste. Por outro lado, a descoloração dentária estava significativamente aumentada no grupo teste.

Sanz et al. (1994) conduziram um estudo de 6 meses para avaliar o efeito de um creme dental com clorexidina 0,4%/lactato de zinco ($0,34\%Zn^{2+}$)/1450ppm de flúor, em comparação a dentifício controle com carbonato de cálcio/1100ppm de flúor, disponível comercialmente; e com bochecho com clorexidina 0,12% duas vezes ao dia. Os 208 participantes receberam profilaxia inicial e não receberam instrução de higiene oral. Foram orientados a escovar os dentes 2X ao dia. Ao final do estudo foi observada alteração de cor dos dentes no dentifício teste, porém em menor intensidade que o bochecho. Porém, houve significativa redução de placa e gengivite (índice gengival e número de sítios sangrantes) em relação ao creme dental controle.

Claydon et al. (1995) empregaram uma metodologia de curto prazo para avaliar o efeito de dentifícios contendo clorexidina a 1% e fluoreto com placebo e água. Foi observada uma redução na formação do biofilme dental em ambos dentifícios, quando comparados com o controle.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Seleção dos indivíduos

O experimento clínico foi realizado na Clínica de Periodontia da Faculdade de Odontologia, no Centro Biomédico, *Campus de Maruípe*, da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), sob a responsabilidade do Prof. Alfredo Feitosa. Todos os protocolos clínicos e laboratoriais foram aprovados pelos Comitês de Ética em Pesquisa da Universidade de Santo Amaro protocolado CEP / UNISA nº 12/2003 e do Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Biomédico da Universidade Federal do Espírito Santo aprovado e registrado em Ata no dia 10/03/2004.

4.1.1 Critérios de inclusão:

- A. Apresentar boa saúde sistêmica, constatada, por meio de anamnese e exames laboratoriais,
- B. Possuir 02 pré-molares e 01 molar em um dos quadrante inferior; sem bolsa periodontal;
- C. Ter recebido previamente terapia periodontal cirúrgica ou não cirúrgica em qualquer uma das arcadas, nos programas de terapêutica periodontal do Curso de Odontologia ou nos programas de pós-graduação de Periodontia da UFES;
- D. Ter idade na faixa etária de 18 a 55 anos;

4.1.2 Critérios de exclusão:

- A. indivíduos que receberam antibioticoterapia ou utilizaram anti-sépticos bucais nos três meses antecedentes ao estudo;
- B. pacientes gestantes, com uso de contraceptivos ou com história de reação alérgica aos componentes da fórmula do dentifrício;
- C. pacientes na menopausa;
- D. fumantes;
- E. diabéticos;
- F. cardiopatas;
- G. pacientes com qualquer alteração sistêmica de ordem sanguínea.

4.1.3 Metodologia da seleção dos indivíduos:

Assim, de acordo com os critérios supracitados, foram selecionados 18 indivíduos que apresentavam boa saúde sistêmica e com histórico de periodontite tratada da população que participava dos serviços de Periodontia da UFES. O n (18 indivíduos) adotado baseou-se na população estimada tratada neste serviço de Periodontia do Centro Biomédico, utilizando-se uma tabela estatística para cálculo (SIQUEIRA e SOARES, 2001) Os indivíduos recrutados foram agendados para seleção baseados nos critérios de inclusão. Após o exame clínico bucal realizado pelos especialistas, os indivíduos que atenderam aos critérios de inclusão foram alocados de forma aleatória, através de sorteio, em dois grupos, controle ($n=9$) e teste ($n=9$), sendo que nenhum dos voluntários recrutados fez uso de outro tipo de anti-séptico bucal ou antibiótico nos 3 meses antecedentes ao estudo.

Os indivíduos, então selecionados, receberam códigos de identificação e seus respectivos nomes na pasta dental sem mencionar as características específicas, ou seja, placebo ou teste, adotadas pela responsável do sorteio. Então, todos os

candidatos selecionados foram divididos em duas partes iguais onde foram escolhidos aleatoriamente por sorteio, e parte deles recebeu o dentifrício placebo e o restante, o dentifrício teste (com o princípio ativo teste). Todos os indivíduos selecionados não tinham acesso às informações quanto à característica da pasta dental, nem os examinadores participantes do experimento, caracterizando um ensaio clínico duplo-cego, aleatório e controlado.

Todos os indivíduos receberam uma carta de informação e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido para participação voluntária no estudo, além de uma explanação verbal sobre a pesquisa, detalhando as fases do experimento, bem como os riscos e benefícios a que estavam sendo submetidos. Todos se apresentavam no momento do exame clínico e da coleta do material sem nenhum sinal ou sintoma de alterações sistêmicas. Os participantes foram assegurados de que o tratamento odontológico proposto seria realizado, mesmo que por qualquer motivo o voluntário desistisse de participar do estudo.

Os indivíduos receberam explicações de um dos pesquisadores participantes quanto à orientação da higiene bucal. Assim, modelos de estudo foram confeccionados com gesso pedra comum, tipo III (Herodent, São Paulo, SP, Brasil) de cada um dos voluntários. Uma moldeira (matriz individual) de silicone (Blue Equipamentos, Ribeirão Preto, SP, Brasil) macia e semi-rígida de espessura de 0,3 mm, preparada no plastificador a vácuo (Bio-Art, Ribeirão Preto, SP, Brasil) foi recortada e aliviada para criar um espaço que propiciasse o acúmulo do biofilme dental na porção cervical vestibular dos dentes controle ou teste. Quando os indivíduos apresentaram ao exame clínico bucal todos os dentes pré-molares e primeiros molares inferiores homolaterais, a seleção dos dentes controle ou teste foi feita por sorteio pelo pesquisador examinador.

Aos indivíduos foi informado que a higiene bucal deveria ser realizada somente na arcada superior com escova e água por um período de 21 dias. A moldeira deveria ser usada todo o dia sendo removida e limpa com água corrente e imersa em um copo de água no período noturno até a primeira hora da refeição. A moldeira era retirada durante os intervalos de refeições, lavada e recolocada com a pasta dental (Anexo2)

O experimento clínico foi dividido em 04 (quatro) fases, denominadas de Fase 0, Fase 7, Fase 14 e Fase 21, as quais representavam os diferentes tempos (dias) de exposição do biofilme placa dental ao dentífrico placebo ou teste. Os pesquisadores selecionadores não tinham acesso aos pesquisadores examinador e registrador. Outro pesquisador registrava todos os momentos com fotografias (Mavica FD 92, Sony, São Paulo, SP, Brasil) da coleta de placa dental dos dentes de cada indivíduo em cada fase do experimento. Deste modo, em cada fase experimental realizavam-se os parâmetros clínicos periodontais e a coleta dos espécimes clínicos, placa dental para análise microbiológica molecular.

4.2 Coleta dos espécimes clínicos

Esta investigação foi do tipo ensaio clínico duplo-cego controlado e aleatorizado e seguiu de acordo com o desenho experimental proposto (Quadro 1).

A coleta de placa dental supragengival (Anexo 2) foi realizada com 03 cones de papéis esterilizados (Tanari nº 40, São Paulo, SP, Brasil) inseridos no sulco gengival com isolamento relativo do campo (roletes de algodão Cremer, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), mantidos e cronometrados por 30 segundos. Após este tempo, os cones foram transferidos para um tubo criogênico Eppendorf de 1,5 ml (TPP, U.S.A.) contendo 0,5 ml de água Milli-Q esterilizada. Os tubos receberam os seus respectivos códigos de identificação previamente. Logo após, estes foram mantidos

em gelo seco e conservados sob refrigeração à 4° C., transportados e preservados em nitrogênio líquido à - 70° C para o Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular e Celular do Núcleo de Doenças Infecciosas (NDI) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) sob a responsabilidade do Prof. Dr. Rodrigo Ribeiro Rodrigues.

Imediatamente após a coleta dos espécimes clínicos, iniciou-se o registro dos parâmetros periodontais constituídos pelos Índices de Placa - IP (SILNESS e LOE, 1964), Gengival - IG (LOE e SILNESS, 1967), Profundidade Clínica de Sondagem do Sulco - PCS, Nível de Inserção Clínica - NIC e Sangramento Gengival - SG (AINAMO e BAY, 1975).

Os dois grupos receberam instruções de higiene bucal minuciosa no momento da Fase 0 (Baseline) (Anexo2). Logo após, procedeu-se a intervenção clínica de profilaxia com pasta abrasiva e taça de borracha montada em motor de baixa rotação sobre as superfícies vestibulares dos dentes testes ou controle. Este procedimento foi realizado pelo pesquisador registrador visando eliminar toda a placa dental supragengival destas superfícies dentárias. Cada indivíduo recebeu aleatoriamente o kit de higiene bucal contendo: escova dental, moldeira e o dentífrico para o uso durante o tempo do estudo (21 dias).

O exame clínico foi realizado por um especialista previamente calibrado (nível de concordância intra-examinador $\kappa = 0.90$), utilizando-se uma sonda periodontal calibrada (PCP 15 UNC, modelo Hu-Friedy-USA), onde examinou todos os indivíduos nas Fases 0 (Baseline), 7, 14 e 21 do estudo, conforme Quadro 1.

Quadro 1 . Tempos das coletas dos espécimes clínicos e variáveis periodontais.

Fase 1	Fase 2	Fase 3	Fase 4
0 Dia	7 Dias	14 Dias	21 Dias
IP	IP	IP	IP
IG	IG	IG	IG
SG	SG	SG	SG
NIC	NIC	NIC	NIC
PCS	PCS	PCS	PCS

Para cada fase foram utilizados procedimentos de acordo com os esquemas abaixo:

Fase 1 :

- Coleta dos espécimes clínicos / CEC.
- Mensuração das variáveis periodontais /IP IG/ SG /NIC/ PCS.
- Instrução de higiene bucal.
- Profilaxia.
- Kit de higiene bucal.
- Início do uso da matriz.

Fases 2 e 3:

- Coleta dos espécimes clínicos / CEC.
- Mensuração das variáveis periodontais /IP /IG /SG NIC /PCS
- Verificação da matriz.

Fase 4:

- Coleta dos espécimes clínicos / CEC.
- Mensuração das variáveis periodontais /IP /IG/ SG/ NIC/ PCS
- Devolução do kit de higiene bucal e matriz.
- Término do uso da matriz.
- Profilaxia.

Os parâmetros clínicos periodontais foram avaliados nas faces vestibulares dos elementos dentários 44, 45, 46 em todas as fases do estudo.

4.3 Procedimentos laboratoriais

Utilizou-se a Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) para identificação de *P. gingivalis*, diretamente das amostras clínicas. Os protocolos da técnica de PCR foram realizados no laboratório de Anaeróbios do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas II (ICB-II) da Universidade de São Paulo / USP sob a responsabilidade do Prof.Dr.Mario Julio-Avila Campos e a participação da Prof^a .Dr^a. Viviane Nakano.

4.3.1 Extração dos DNA bacterianos

Cada amostra coletada foi diluída até 10^{-10} e os DNA bacterianos foram extraídos pelo método de fervura a 100° C durante 15 minutos (AVILA - CAMPOS; VELÁSQUEZ – MELÉNDES, 2002) e centrifugados a 14000 rpm, por 10 minutos, e o sobrenadante (DNA) foi usado imediatamente ou estocado a -20° C, até o momento de seu uso.

4.3.2 PCR – Amplificação

A amplificação do DNA bacteriano foi realizado em volume final de 25 μ l contendo 2,5 μ l de tampão (10X). PCR, 1,0 μ l de $MgCl_2$ (50 mM), 1,0 μ l da mistura de dNTP (0,2 uM) , 1,0 μ l de cada iniciador específico (0.4 uM), 0,25 μ l de platinum *Taq* DNA polimerase, 8,25 μ l de H_2O Milli-Q esterilizada e 10 μ l de DNA. Os pares de iniciadores específicos utilizados foram sintetizados segundo Avila-Campos et al. (1999). A reação de amplificação foi realizada em aparelho de PCR termociclador Perkin Elmer Gene Amp. PCR System 9700 (Applied Biosystems, CT, USA), programado para um ciclo de 94° C por 5 minutos; 30 ciclos de 94° C por 30

segundos, 55° C por 30 segundos, um ciclo de 72°C por 30 segundos e um ciclo a 72°C por 5 minutos, para extensão final do DNA.

4.3.3 Iniciadores (Primers)

Os produtos da amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1%, em fonte de corrente (BioRad) a 70 V por duas horas e 30 minutos. Após o tempo da corrida, o gel foi corado com brometo de etídio (0,5 µg/ml), observado e fotografado sobre transiluminador ultravioleta utilizando-se o sistema Kodak Digital Science System-DC 120. Como controle de peso molecular foi usado 1 kb DNA ladder (Fig. 19).

Em todas as reações foi usada Água Milli-Q ultra-esterilizada como controle negativo e o DNA de *P. gingivalis* ATCC 33277 como controle positivo.

Os Iniciadores utilizados foram: 5'-AGG CAG CTT GCC ATA CTG CG-3'; e 5'-ACT GTT AGC AAC TAC CGA TGT -3'.

4.4 Análise estatística

Inicialmente foi apresentada uma caracterização da amostra através das técnicas de estatística descritivas e testes de hipóteses para verificar a comparabilidade dos grupos. Foram selecionados 18 indivíduos, 216 amostras de placa dental, e utilizados: IP (SILNESS e LÖE, 1964), IG (LÖE e SILNESS, 1967), SG (AIMANO e BAY, 1975), PCS e NIC.

O efeito dos dentifrícios teste e placebo foram comparados em cada parâmetro clínico e após a distribuição e tabulação dos dados, foram comparados os grupos em relação à Idade através do teste T. no nível de 5% de significância. Não se pôde rejeitar a hipótese de que as médias dos grupos foram iguais, isto é, os grupos estavam pareados em relação à Idade.

As variáveis respostas possuíam duas naturezas distintas: Quantitativa (PCS e NIC) e Qualitativa (IP, IG e SG). Para as variáveis quantitativas foram utilizados Gráficos de Médias e Análise de Variância para Medidas Repetidas, e para as qualitativas, utilizou-se o Teste Exato de Fisher.

Adotando-se um nível de 5% de significância para o Teste Qui-Quadrado e o Teste Exato de Fisher, verificou se havia ou não associação entre o creme dental e as variáveis sexo, etnia e estado civil (p -valor < 0,050).

Com a finalidade de estabelecer a influência do creme dental (Placebo ou Cariax) e do Tempo nas variáveis PCS e NIC, utilizou-se uma Análise de Variância (ANOVA) para medidas repetidas, adotando-se um nível de significância de 5%, ou seja, toda vez que o p -valor fosse menor que 0,050, dir-se-ia que o fator exercia influência na variável resposta.

Utilizou-se o Teste Exato De Fisher para saber se havia associação entre o creme dental (Placebo e Cariax) e as variáveis IP, IG e SG (Índice de sangramento gengival após sondagem) para cada Dente (44,45 e 46) e Tempo (0 Dias, 7 Dias, 14 dias e 21 dias). Não foi feito o Teste Qui-Quadrado, pois para todos os Dentes e Tempos havia caselas com valor esperado menor 5. Para o Teste Exato Fisher foram adotados 5% de significância.

Dando seqüência, comparou-se o Creme Dental Cariax com um Creme Dental Placebo em relação à Positividade do periodontopatógeno *P.gingivalis*.

Foi apresentado na forma de Tabelas de Freqüência e Gráficos de Barras para a variável Positividade do periodontopatógeno *P.gingivalis* para cada Dente ao longo do Tempo.

Os indivíduos foram separados por Positividade para o periodontopatógeno *P gingivalis* e fez-se uma comparação quanto às variáveis PCS e NIC para cada Dente e Tempo. Notou-se que o número de indivíduos nos grupos variou de acordo com o Dente e Tempo em análise. Para comparar os grupos foi utilizado-se o Teste Não Paramétrico de Mann-Whitney adotando 5% de significância, ou seja, se o p-valor fosse menor que 0,050, dir-se-ia que o grupo com indivíduos com Positividade "Positiva" do periodontopatógeno *P gingivalis* era diferente do grupo com Positividade "Negativa" do periodontopatógeno *P gingivalis* para o Dente, Tempo e Variável (PCS ou NIC).

Para avaliar a associação entre o Creme Dental e a Positividade do periodontopatógeno *P gingivalis* para cada Dente e Tempo, foi utilizado o Teste Exato de Fisher. Não foi feito o Teste Qui-Quadrado, pois para todos os Dentes e Tempos havia caselas esperadas menores 5. No Teste Exato Fisher foram adotados 5% de significância, ou seja, se o p-valor fosse menor que 0,050 dir-se-ia que existe associação entre o Creme Dental e a Positividade do *P gingivalis*.

Foram considerados significativos os valores de $p < 0,05$. Os procedimentos estatísticos realizaram-se com os seguintes recursos computacionais: Programas R 1.8.0 (Copyright © 2003, The R Development Core Team), Statistica versão 6.0, SPSS 11.5 (Statistical Package for the Social Sciences, SPSS Inc., Chicago, IL, USA), Word Xp e Excel Xp.

5. RESULTADOS

Preliminarmente, determinou-se uma caracterização da amostra através das técnicas de estatística descritiva e testes de hipóteses para verificar a comparabilidade dos grupos (Tabela 1).

Tabela 1: Associação do creme dental e variáveis de caracterização da amostra.

		Creme Dental		Total	χ^2	p-valor	
		Placebo	Cariax				
Sexo	Masculino	n	3	3	-	1,000	
		%	33,30%	33,30%			33,30%
	Feminino	n	6	6			12
		%	66,70%	66,70%			66,70%
Total		n	9	9	18		
		%	100,00%	100,00%	100,00%		
Etnia / Raça	Branca	n	4	6	-	0,637	
		%	44,44%	66,70%			55,60%
	Negra	n	5	3			8
		%	55,60%	33,30%			44,40%
Total		n	9	9	18		
		%	100,00%	100,00%	100,00%		
Estado Civil	Solteiro	n	6	5	1,424	0,491	
		%	66,70%	55,60%			61,10%
	Casado	n	1	3			4
		%	11,10%	33,30%			22,20%
	Separado	n	2	1			3
		%	22,20%	11,10%			16,70%
Total		n	9	9	18		
		%	100,00%	100,00%	100,00%		

*Utilizou-se o Teste Exato de Fisher

Na Tabela 2 pôde-se observar que a um nível de 5% de significância:

- houve a associação entre o Creme Dental e o SG no Dente 45 aos 21 dias, ou seja, quem usou o Cariax teve maior chance de ter o SG (Índice Sangramento Gengival de AINAMO e BAY);

Tabela 2. Associação entre o creme dental Cariax e a variável sangramento gengival /SG.

Dente	Tempo	SG	Placebo	Cariax	p-valor
44	0 dias	Sim	5	2	0,335
		Não	4	7	
		Total	9	9	
	7 dias	Sim	3	6	0,347
		Não	6	3	
		Total	9	9	
	14 Dias	Sim	4	5	1,000
		Não	5	4	
		Total	9	9	
	21 dias	Sim	3	3	1,000
		Não	6	6	
		Total	9	9	
45	0 dias	Sim	3	5	0,637
		Não	6	4	
		Total	9	9	
	7 dias	Sim	4	6	0,637
		Não	5	3	
		Total	9	9	
	14 Dias	Sim	5	3	0,637
		Não	4	6	
		Total	9	9	
	21 dias	Sim	1	7	0,015*
		Não	8	2	
		Total	9	9	
46	0 dias	Sim	3	2	1,000
		Não	6	7	
		Total	9	9	
	7 dias	Sim	6	5	1,000
		Não	3	4	
		Total	9	9	
	14 Dias	Sim	6	3	0,347
		Não	3	6	
		Total	9	9	
	21 dias	Sim	3	1	0,576
		Não	6	8	
		Total	9	9	

*Associação significativa a um nível de 5%. Teste Exato de Fisher.

As tabelas 3, 4 e 5 demonstraram a frequência de positividade do periodontopatógeno *P.gingivalis* para cada dente.

Tabela 3. Frequência de positividade para o periodontopatógeno *P. gingivalis* / Dente 44

Tempo	Negativos	Positivos	Total
0 Dias	11	7	18
7 Dias	11	6	17
14 Dias	12	6	18
21 Dias	10	8	18

Tabela 4. Frequência de positividade para o periodontopatógeno *P. gingivalis* / Dente 45

Tempo	Negativos	Positivos	Total
0 Dias	10	7	17
7 Dias	9	8	17
14 Dias	9	9	18
21 Dias	11	7	18

Tabela 5. Frequência de positividade para o periodontopatógeno *P.gingivalis* / Dente 46

Tempo	Negativos	Positivos	Total
0 Dias	11	7	18
7 Dias	9	9	18
14 Dias	8	8	16
21 Dias	11	7	18

Na tabela 6 verificou-se que apenas para o Dente 45 e no Tempo 7 dias encontrou-se diferença estatisticamente significativa ($p\text{-valor} < 0,050$), isto é, houve diferença entre os grupos em relação à positividade do periodontopatógeno *P.gingivalis* com a variável NIC para este Dente e Tempo. Já para as demais

combinações de Dentes e Tempos, não ocorreu diferença estatisticamente significativa.

Tabela 6. Associação entre a variável NIC versus *P.gingivalis*.

Dente	Tempo	Positividade	n	Média	Desvio Padrão	Mann-Whitney	p-valor
44	0 Dias	Negativo	11	2,00	1,18	29,50	0,374
		Positivo	7	1,43	0,53		
	7 Dias	Negativo	11	1,82	0,98	32,00	0,913
		Positivo	6	1,83	1,17		
	14 Dias	Negativo	12	1,83	0,94	29,00	0,474
		Positivo	6	1,67	1,21		
21 Dias	Negativo	10	1,60	0,97	30,00	0,332	
	Positivo	8	2,00	1,07			
45	0 Dias	Negativo	10	2,10	1,37	34,50	0,959
		Positivo	7	2,00	1,15		
	7 Dias	Negativo	9	1,56	1,01	15,50	0,036*
		Positivo	8	2,63	1,30		
	14 Dias	Negativo	9	1,89	0,93	38,50	0,850
		Positivo	9	2,11	1,54		
21 Dias	Negativo	11	1,73	1,19	21,50	0,100	
	Positivo	7	2,43	1,27			
46	0 Dias	Negativo	11	2,55	2,30	33,50	0,629
		Positivo	7	3,86	5,40		
	7 Dias	Negativo	9	2,78	2,54	38,00	0,814
		Positivo	9	3,33	4,77		
	14 Dias	Negativo	8	4,13	5,06	21,50	0,244
		Positivo	8	2,25	2,38		
21 Dias	Negativo	11	4,00	4,54	22,00	0,111	
	Positivo	7	1,57	0,79			

* Diferença significativa a um nível de 5% de significância. Teste de Mann-Whitney

Dando seqüência foram utilizadas tabelas cruzadas e o Teste Exato de Fisher para estudar a associação entre a Positividade de *P.gingivalis* e as variáveis IP, IG e SG. Para este teste foram adotadas 5% de significância, ou seja, se o p-valor fosse menor a 0,050 dir-se-ia que existe associação entre a Positividade de *P.gingivalis* e a variável em análise.

Na tabela 7 observamos que:

- O Dente 44 aos 7 Dias apresentou p-valor igual a **0,0498**, um valor praticamente igual ao nível de significância adotado ($p\text{-valor}=0,050$), desta forma, foi necessário cuidado para interferir sobre a associação entre as variáveis. Porém, como a significância do teste foi de 5%, pôde-se dizer que houve evidências para afirmar que existiu associação entre as variáveis.

Tabela 7. Associação entre a positividade de *P.gingivalis* e o índice de sangramento gengival / SG.

Dente	Tempo	SG	Positividade		p-valor
			Negativo	Positivo	
44	0 Dias	Não	6	1	0,151
		Sim	5	6	
		Total	11	7	
	7 Dias	Não	8	1	0,0498*
		Sim	3	5	
		Total	11	6	
	14 Dias	Não	6	3	1,000
		Sim	6	3	
		Total	12	6	
	21 Dias	Não	2	4	0,321
		Sim	8	4	
		Total	10	8	
45	0 Dias	Não	6	2	0,335
		Sim	4	5	
		Total	10	7	
	7 Dias	Não	3	6	0,153
		Sim	6	2	
		Total	9	8	
	14 Dias	Não	4	4	1,000
		Sim	5	5	
		Total	9	9	
	21 Dias	Não	4	4	0,630
		Sim	7	3	
		Total	11	7	
46	0 Dias	Não	4	1	0,596
		Sim	7	6	
		Total	11	7	
	7 Dias	Não	5	6	1,000
		Sim	4	3	
		Total	9	9	
	14 Dias	Não	3	5	0,619
		Sim	5	3	
		Total	8	8	
	21 Dias	Não	2	2	1,000
		Sim	9	5	
		Total	11	7	

* Associação significativa a um nível de 5% de significância

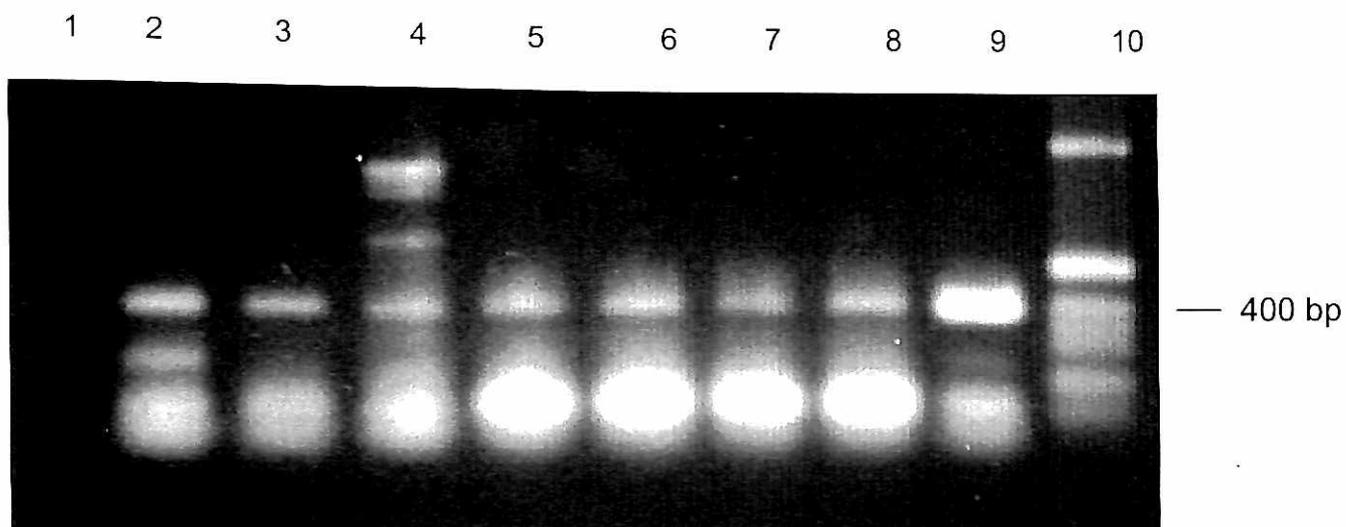


Fig. 6 Amplificação por PCR do DNA de *P. gingivalis* detectado em amostras clínicas. Gel de eletroforese (1%) de amostras positivas para *P. gingivalis*. Coluna 1: controle negativo (marcador de peso molecular 1-kb plus DNA ladder); colunas 2 a 8: amostras clínicas positivas; coluna 9: *P. gingivalis* ATCC 33277.

6 DISCUSSÃO

A higiene bucal é o melhor meio mecânico de prevenção da doença periodontal devendo, portanto, merecer um grande destaque no planejamento do tratamento, na prática diária de todos os profissionais, bem como nos programas de educação para a saúde. A higiene bucal tem como objetivos: remover o biofilme dental e indutos que se acumulam sobre o complexo periodontal, reduzir a microbiota estagnada e prevenir a formação do cálculo salivar. Tais objetivos visam finalidades maiores como: preservar e restabelecer a saúde periodontal e manutenção dos dentes (SILVA et al., 1997).

De todos os métodos de remoção de placa, a escovação é o método universalmente mais usado. A escovação dental, ao empregar uma variedade de técnicas e escovas, reduz altamente a placa nas superfícies bucal e lingual e, em alguns casos, sobre a superfície interproximal dos dentes. (SILVA et al., 1997).

Não há dúvidas do benefício dos dentífrícios na saúde dental através dos efeitos do fluoreto nas cáries e outros ingredientes na remoção de manchas. Entretanto, estudos sugerem que o progresso tem sido lento no desenvolvimento de formulações que beneficiam a saúde gengival através do efeito inibitório químico na placa.

A clorexidina apresenta ação antibacteriana e antiplaca, dependente da concentração e da dosagem (JONES, 1997), enquanto o efeito antiplaca decorre basicamente de sua propriedade de substantividade (ADDY, 1986).

Deste modo, este estudo avaliou o efeito clínico do uso doméstico, por 21 dias, de um dentífrício contendo clorexidina 0,12%/1000ppm de flúor disponível comercialmente (Cariax®). Demonstrou-se que clinicamente não houve melhora nos

índices de placa e gengival, bem como nos parâmetros clínicos de profundidade de sondagem, sangramento gengival e nível clínico de inserção ao se comparar com dentifício placebo contendo 1500ppm de flúor. A análise estatística aplicada às médias desses índices nos tempos experimentais, comparando cada grupo, não deixa dúvidas de que os dois dentifícios apresentados tiveram desempenho semelhantes.

Estes resultados não confirmam os achados do estudo de JENKINS et al. (1991), YATES et al. (1993) e JENKINS et al. (1993) que mostraram atividade de dentifícios com clorexidina em 1%/1000ppm de fluoreto de sódio.

O manchamento dos dentes é um efeito colateral dos produtos contendo clorexidina (LOE e SCHIOTT, 1970; FLOTRA et al., 1971; FLOTRA, 1973; GJERMO, 1974; RUSSEL e BAY, 1978) e sua ocorrência tem sido observada tanto *in vitro* como *in vivo*, como medida de atividade desse agente. Assim, embora YATES et al. (1993) tenham observado melhora nos parâmetros clínicos durante 6 meses de uso de um dentifício contendo clorexidina 1%/1000ppm, muitos participantes necessitaram de uma ou mais sessões de polimento coronário durante o estudo para remoção de manchas. Os autores justificaram a alta concentração desse agente na tentativa de garantir a sua alta disponibilidade durante o uso. Isso sugere, pelo menos em parte, que a grande redução observada na placa e gengivite no grupo teste pode estar relacionada à alta concentração da clorexidina (1%). Além disso, observou-se que houve aumento na formação de cálculo, o que levou-os a sugerir o emprego desse dentifício por tempo limitado, com aplicações similares para outras formulações contendo este agente. Diante desses efeitos também observados por JENKINS et al. (1993) em período de avaliação menor (21 dias) foi sugerido que o

uso doméstico de creme dental contendo clorexidina deva ser empregado em concentração menor.

Deste modo, justifica-se o emprego da clorexidina em concentração menor (0,12%) na tentativa de minimizar ou excluir a manifestação desse efeito para viabilizar o seu emprego por tempo prolongado. Assim, no presente estudo foi observado que nenhum dos participantes queixou-se da presença de manchas e não houve necessidade de polimento coronário, embora o período de avaliação tenha sido mais curto (21 dias). No entanto, a baixa concentração desse agente no dentifício testado pode explicar a sua baixa eficácia clínica, com conseqüente deficiência em comprovar a sua eficácia nos parâmetros clínicos analisados em relação ao dentifício teste.

Por outro lado não foi encontrada alteração significativa na profundidade de sondagem e nível clínico de inserção (Anexo 15). Este fato, também foi observado no estudo de RUSSEL E BAY (1978), onde os autores sugerem que isso se deve ao fato da clorexidina não penetrar em sulcos maiores que 4,0mm de profundidade, além de ser inativada na presença de sangue e supuração, considerando o tempo reduzido de estudo (2 meses) para se observar alterações. Mesmo assim, houve redução no índice de placa em 60% em crianças com retardo mental e pobre coordenação motora.

LORRI et al(1990) indicaram a prescrição de uma solução de clorexidina a pacientes com um controle inadequado de biofilme dental bacteriano. Recomendaram concentrações menores, uma vez que a colaboração do paciente pode diminuir em virtude do gosto desagradável, do aparecimento de manchas e do custo elevado da clorexidina.

Com relação ao sangramento gengival (SG) (Tabela 2), observou-se que existe a associação entre o creme dental Cariax® e o SG no dente 45 aos 21 dias ($p < 0,015$). Como esta alteração só foi verificada no tempo final do estudo e em um único dente, não é possível fazer grandes inferências sobre este fato. Até mesmo, porque o índice gengival, que caracteriza o estado visível de inflamação gengival não apresentou associação com o creme dental testado. O ideal é que o tempo de estudo fosse maior para verificar se essa associação persistiria e se estenderia aos outros sítios, lembrando que essa variável pode sofrer influência da força empregada na sondagem dos sítios analisados. Por último, ainda, tem que se considerar que apenas 30% dos sítios que apresentam sangramento à sondagem podem apresentar real atividade de doença periodontal. (CLADYON, 1995).

Estudos de curta duração têm demonstrado que bochechos diários com digluconato de clorexidina, na ausência de higiene oral mecânica, resultaram na inibição do desenvolvimento da placa bacteriana e aparente resolução da gengivite. No entanto, a atividade antimicrobiana do dentifrício com clorexidina é difícil de se igualar quando o agente é empregado na forma de bochecho 0,12% (ADDY et al., 1989; JEKINS et al., 1990) ou até mesmo na forma de gel a 1% (ETEMADZADEH, 1985). É sugerido que detergentes e abrasivos podem reduzir a disponibilidade da clorexidina nos dentifrícios e assim explicar as propriedades inibitórias reduzidas.

O creme dental testado não possui o lauril sulfato de sódio, que é um detergente presente na maioria dos dentifrícios, sendo conhecido por provocar a precipitação da clorexidina inativando-a, sendo a principal razão da sua não biodisponibilidade quando incorporada ao dentifrício convencional (JOHANSEN et al., 1975; VAN DER OUDERAA e CUMMINS, 1989). Mesmo assim, a eficácia clínica, segundo os parâmetros analisados nesse estudo, não foi superior ao

dentifrício controle com fluoreto de sódio, o que sugere que a concentração da clorexidina possa ser um fator contribuinte para este resultado.

Na verdade, embora não tenha sido o objetivo desse estudo, a contagem salivar bacteriana poderia indicar se o dentifrício testado realmente possui boa persistência de atividade, pois se acredita que para os dentifrícios possuírem efeito clínico na placa ou saúde gengival, é importante que haja persistência de atividade antimicrobiana em torno de 8 horas (JENKINS et al., 1990). Dessa forma, poderíamos avaliar se a concentração da clorexidina no Cariax® (dentifrício teste) estaria em concentração muito baixa para garantir sua atividade.

JOHANSEN et al. (1975) observaram, após um período de 2 anos de acompanhamento, que o dentifrício com clorexidina a 1% e a 0,4% com e sem abrasivo não apresentou efeito em relação aos índices de placa e gengivite. Porém, os autores sugerem que esse resultado pode ter sido mascarado pelo excelente controle mecânico dos estudantes que participaram do estudo. Esse viés foi evitado no presente estudo ao solicitar aos participantes para não escovarem os dentes do arco sob análise e usar a moldeira, pois também acreditamos que o controle mecânico tenha efeito fundamental no controle do biofilme dental.

Mas SJÖBLOM et al. (1976) também não encontraram benefícios clínicos no emprego do creme dental teste (Elgydium®) que contém clorexidina em concentração não fornecida pelos fabricantes. A metodologia desse estudo foi com tempo reduzido (4 dias) com a utilização de moldeiras para excluir o efeito da escovação mecânica, semelhante ao presente estudo. Assim, eles sugerem que a clorexidina possa estar em concentração insuficiente para garantir sua atividade ou sendo inativada por outros ingredientes da pasta.

Como esta investigação foi realizada em pacientes já tratados periodontalmente e desta forma, considera-se que possuíam um controle de placa melhor, pois já receberam previamente instrução de higiene oral. Talvez fosse interessante e eticamente aceitável realizar esse estudo em grupos com pobres condições gengivais, conforme sugerido por JOHANSEN et al. (1975).

Neste trabalho, o dentifício empregado contém clorexidina a 0,12%, uma concentração menor do que os anteriormente testados. Além disso, o emprego foi limitado ao prazo de 21 dias, e isso pode explicar a ausência de efeitos colaterais clínicos e relatados pelos participantes. O benefício clínico não foi comprovado em relação aos parâmetros clínicos analisados. No entanto, é importante ressaltar que o creme dental teste foi colocado no mercado nacional há pouco tempo, com ausência de estudos clínicos e microbiológicos que analisem a sua eficácia como agente no controle da placa e desenvolvimento de doenças periodontais.

A intenção de se utilizar o creme dental, ao invés de uma solução de clorexidina na forma de colutório, foi de aumentar o tempo de permanência do agente antimicrobiano em contato com o sulco gengival, uma vez que o dentifício tem uma viscosidade e textura, demorando mais para se solubilizar na saliva e possivelmente aumentando a substantividade da clorexidina.

Estudos de curta duração têm demonstrado que bochechos diários com digluconato de clorexidina, na ausência de higiene oral mecânica, resultaram na inibição do desenvolvimento da placa bacteriana e aparente resolução da gengivite. Depósitos pré-existentes de placa desapareceram gradualmente enquanto a gravidade da gengivite foi reduzida e a formação de cálculo supragengival foi inibida pelas aplicações regulares de clorexidina. Pode ser que esses resultados sejam atribuídos à redução do número de bactérias salivares, pois uma vez que o

tratamento foi interrompido, o número de bactérias salivares rapidamente aumentou e a placa se restabeleceu (LÖE , 1973). Conforme demonstrado, o uso intermitente e regular de clorexidina pode ser necessário para manter o estado livre de placa. Entretanto, a resposta do tecido oral ao uso prolongado e regular de digluconato de clorexidina e os possíveis efeitos colaterais podem contra-indicar seu uso por período prolongado (LÖE et al., 1976).

Segundo SEKINO et al. (2003) uma formação de placa mais abundante e rápida pode ocorrer em indivíduos com alta contagem salivar de bactérias. Assim, o emprego de anti-sépticos que reduzem o número de bactérias pode retardar a taxa de formação de placa. O efeito significativo da clorexidina 0,2% 2 vezes ao dia foi capaz de reduzir o número de bactérias na saliva em 95%, no curso de poucos dias (SCHIOTT et al., 1970).

Atualmente acredita-se que a eficácia da clorexidina em combater a placa é primariamente atribuída à retenção deste composto à cavidade oral e sua liberação lenta. O aumento da dose, bem como de sua frequência de enxágüe pode aumentar a retenção do composto na cavidade oral e seu efeito anti-placa. Entretanto, há suspeita de que os efeitos colaterais locais são dependentes de sua concentração, conforme ALBANDAR et al., 1994.

A determinação do efeito antimicrobiano desses dentifícios indicou que exerceram ação antimicrobiana contra uma série de microrganismos (FLOTRA, 1973). Devido à sua significativa substantividade, a clorexidina pode ser retida na boca e exercer uma ação prolongada, podendo ser observada redução na contagem bacteriana salivar por períodos de mais de 12 horas em adição à presença de atividade antimicrobiana nas amostras salivares de 3-5 horas (ROLLA et al., 1971), quando empregada na forma de bochechos.

O método de PCR se baseia na amplificação logarítmica de um fragmento de DNA, iniciada por dois desencadeadores (iniciadores). Os primers são pequenas seqüências de oligonucleotídeos sintetizados de acordo com a região a ser amplificada ao se hibridizarem com as fitas opostas da seqüência-alvo de DNA, desencadeiam a síntese de DNA complementar por ação de uma enzima DNA-polimerase derivada de bactérias termófila (*Thermophilus aquaticus*). A amplificação de um segmento do gene que codifica a fração para o 16s rDNA que é conservado dentro de cada espécie bacteriana permite a identificação de uma determinada espécie com alto grau de especificidade.

Durante as últimas décadas, algumas espécies bacterianas têm sido relacionadas à presença de sinais e sintomas das patologias periodontais. Entretanto, a utilização de métodos de biologia molecular pode ocasionar um impacto importante nos conceitos vigentes, tendo em vista o fato de que possibilita o estudo de espécies bacterianas de maneira antes jamais permitida pelas técnicas de cultura disponíveis.

O teste de PCR fornece apenas uma informação qualitativa (prevalência), sendo empregado mais em estudos epidemiológicos que objetivam analisar a prevalência de microrganismos alvos em diferentes populações, por exemplo. A alta sensibilidade deste teste (capaz de detectar microrganismos presentes em quantidades mínimas, como 10 cópias) explica a alta heterogeneidade dos resultados. Assim, a detecção em níveis muito baixos de um determinado patógeno geralmente não é suficiente para estar associado à doença, não tendo importância clínica (SANZ et al., 2004). Em nossa investigação verificamos que não existiu associação entre o creme dental teste e a positividade do periodontopatógeno *Porphyromonas gingivalis* em nenhum dos dentes e tempos (Tabelas 6).

No presente estudo o PCR demonstrou ser uma técnica apropriada para o estudo da microbiota periodontal, permitindo a rápida identificação do *P. gingivalis* em dezoito indivíduos com histórico de periodontite tratada (Fig.6). Sabendo-se que a infecção periodontal é geralmente de natureza polimicrobiana, tal eficiência foi exclusivamente dependente da especificidade e sensibilidade do método utilizado. Esta afirmativa está de acordo com outros autores(MULLIS; FALOONA,1987), os quais relataram que o PCR é sensível o bastante para detectar até uma única molécula de DNA numa amostra (VAN WINKELHOF,2003).

O isolamento do microrganismo *P. gingivalis* em doença periodontal humana aponta um importante papel desempenhado por esta espécie bacteriana nesta doença de acordo com SAKAI, et al ,2001 ,EZZO e CLUTER 2003.

Na literatura abordada vários estudos dão suporte na identificação de bactérias periodontopatogênicas em indivíduos periodontalmente tratados, especialmente a *P. gingivalis* por se tratar de um microrganismo com potencial patogênico bem definido, sendo na atualidade reconhecido com verdadeiro patógeno periodontal. Neste estudo o propósito de verificação da presença do patógeno *P. gingivalis* forneceu informações complementares às características clínicas estabelecendo-se a condição e / ou atividade de doença periodontal (Fig. 7).

7 CONCLUSÕES

Á Análise dos resultados apresentados nesta investigação nos permite as seguintes conclusões:

7.1 o creme dental teste (que contém clorexidina) aplicado durante o tempo do estudo não demonstrou ser mais eficiente que o creme dental placebo, não determinando diferenças significativas nas respostas clínicas: IP, IG, NIC, PCS, SG;

7.2 existe associação entre o creme dental e o índice de sangramento gengival (SG) no dente 45 aos 21 dias de observação (p -valor $<0,015$), revelando que existe mais chance de ter sangramento com creme dental teste;

7.3 foram comprovadas a eficiência e sensibilidade do PCR na detecção do microrganismo *P.gingivalis*.

7.4 foi demonstrada associação estatisticamente significativa entre a positividade de *P.gingivalis* e o sangramento gengival;

7.5 foi demonstrada associação estatisticamente significativa entre o Nível de Inserção Clínica e o periodontopatógeno *P.gingivalis*.

8 REFERÊNCIAS *

ADDY, M. Hibitane in the treatment of aphthous ulceration. **Journal of Clinical Periodontology**, v.4, p.108-116, 1977.

ADDY, M. Chlorhexidine compared with other locally delivered antimicrobials. A short review. **Journal of Clinical Periodontology**, v.13, p.957-964, 1986.

ADDY, M. The use of antiseptics in periodontal therapy. In LINDHE, J. **Clinical Periodontology and Implant Dentistry**, 4ed. Copenhagen: Munksgaard, 2003: p. 464-493.

ADDY, M.; JENKINS, S.; NEWCOMBE, R. Studies on the effect of toothpaste rinses on plaque regrowth. **Journal of Clinical Periodontology**, v.16, p.380-384, 1989.

ADDY, M.; AL-ARRAYED, F.; MORAN, J. The use of an oxidising mouthwash to reduce staining associated with chlorhexidine. Studies *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Clinical Periodontology**, v.18, p.267-271, 1991.

AINAMO, J., BAY, I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. **International Dental Journal**, v. 25, n.4, p.229-235, 1975.

AINAMO, J.; ETEMADZADEH, H. Prevention of plaque growth with chewing gum containing chlorhexidine acetate. **Journal of Clinical Periodontology**, v.14, p.524-527, 1987.

ALBANDAR, J. M.; GJERMO, P.; PREUS, H. R. Chlorhexidine use after two decades of over-the-counter availability. **Journal of Periodontology**, v. 65, p. 109-112, 1994.

*De acordo com ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

ALBANDAR, J. M.; BRUNELLE. J. A.; KINGMAN, A. Destructive periodontal disease in adults 30 years of age and older in the united states, 1988-1994. **Journal of Periodontology**, v.70, n.1, p.13-29, 1999.

ARAÚJO, M, W., B., CORTELLI, S., C. Metodologia de pesquisa aplicada à periodontia médica . In Brunetti, M., C., **Periodontia. Médica - Uma Abordagem Intergrada**, São Paulo: SENAC São Paulo, 1ª ed., p. 91-112, 2004.

ARMITAGE, G. C. et al. Relationship between the percentaeg of subgingival spirochetes and the severity of periodontal disease. **Journal of Periodontology**, v.53, p.550-556, 1982.

ASIKAINEN, S. et al. Plaque-inhibiting effect of two flavored chlorhexidine mouth rinses. **Journal of Clinical Periodontology**, v.8, p.139-143, 1981.

AVILA-CAMPOS, M.J.; VELÁSQUEZ-MELÉNDEZ, G. Prevalence of putative periodontopathogens from periodontal patients and healthy subjects in São Paulo, SP, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, São Paulo, v. 44, p. 1-5, 2002.

AXELSSON, P.; LINDHE, J. Effect of controlled oral procedures on caries and periodontal disease in adults. **Journal of Clinical Periodontology**, v.5, p.133-151, 1978.

BANTING, D.; BOSMA, M.; BOLLMER, B. Cllinical effects of a 0,12% chlorhexidine mouthrinse over two years. **Journal of Dental Research**, v.68 (Spec. Iss.), p.1716-1718, 1989.

BARKVOLL, P.; ROLLA, G.; SVENDSEN, A. K. Chlorhexidine interactions with sodium lauryl sulfate *in vivo*. **Journal of Dental Research**, v.68 (Spec. Iss.), p.1722-1723, 1989.

BARRET, M. T. The protozoa of the mouth in relation to pyorrhea alveolaris. **Dental Cosmos**, v.56, p.948-953, 1914.

BECK, J. et al. Periodontal disease and cardiovascular disease. **Journal of Periodontology**, n.67 (Suppl), p.1123-1137, 1996.

BINNEY, A. et al. The effect of a commercially available Triclosan-containing toothpaste compared to a sodium-fluoride-containing toothpaste and a chlorhexidine rinse on 4-day plaque regrowth. **Journal of Clinical Periodontology**, v.22, n.11, p.830-834, 1995.

BONESVOLL, P.; GJERMO, P. A comparison between chlorhexidine and some quaternary ammonium compounds with regard to retention, salivary concentration and plaque inhibiting effect in the human mouth after mouth rinses. **Archives of Oral Biology**, v.23, p.189-294, 1978.

BRIGGS, H. F. Local vaccine treatment of pyorrhea alveolaris. **Dental Cosmos**, v.66, p.697, 1924.

BROGHTMAN, L. J.; TEREZHALMY, G. T. The effects of a 0,12% chlorhexidine gluconate mouthrinse on orthodontic patients aged 11 through 17 with established gingivitis. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, v.100, p.324-329, 1991.

BRUNETTI, M., C. **Periodontia. Médica - Uma Abordagem Intergrada**, São Paulo: SENAC São Paulo, 1^a ed., 2004.

BUNTING, R. W. Is pyorrhea a local or constitutional disease? **Dental Cosmos**, v.64, p.731-737, 1922.

CHAVEZ, E. S. et al. Persistent bacterial colonization of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in periodontitis and

its associations with alveolar bone loss after 6 months of therapy. **Journal of Clinical Periodontology**, v.27, p.897-903, 2000.

CHRISTERSSON, L. A. et al. Specific subgingival bacteria and diagnosis of gingivitis and periodontitis. **Journal of Dental Research**, v.68 (Spec. Iss.), p.1633-1639, 1989.

CLAYDON, N.; ADDY, M. The use of plaque area and plaque index to measure the effect of fluoride and chlorhexidine toothpastes on 24-h plaque regrowth. **Journal of Clinical Periodontology**, v.22, p.540-542, 1995.

CUMMINS, D.; CREETH, J. E. Delivery of antiplaque agents from dentifrices. Gels, and mouthwashes. **Journal of Dental Research**, v.71, n.7, p.1439-1449, 1992.

DAHLÉN, G. et al. The effect of supragingival plaque control on the subgingival microbiota in subjects with periodontal disease. **Journal of Clinical Periodontology**, v.19, p.802-809, 1992.

DAVIES, A. The mode of action of chlorhexidine. **Journal of Periodontal Research**, v.8 (Suppl.12), p.68-75, 1973.

DAVIES, A. Use of hibitane following periodontal surgery. **Journal of Clinical Periodontology**, v.4, p.129-135, 1977.

ELWORTHY, A. et al. The substantivity of a number of oral hygiene products determined by duration of effects on salivary bacteria. **Journal of Periodontology**, v.67, n.6, p.572-576, 1996.

EMILSON, C. G.; FORNELL, J. Effect of toothbrushing with chlorhexidine gel on salivary microflora, oral hygiene, and caries. **Scandinavian Journal of Dental Research**, v.84, p.308-319, 1976.

ESCHEVERRÍA, J. J.; SANZ, M. Mechanical supragingival plaque control. In LINDHE, J. *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*, 4ed. Copenhagen: Munksgaard, 2003: p.449-463.

ETEMADZADEH, H.; AINAMO, J.; MURTOMAA, H. Plaque growth-inhibiting effects of an abrasive fluoride-chlorhexidine toothpaste and a fluoride toothpaste containing oxidative enzymes. *Journal of Clinical Periodontology*, v.12, p.607-616, 1985.

EZZO, P. J.; CUTLER, C. W. Microorganisms as risk indicators for periodontal disease. *Periodontology 2000*, v. 32, p.24-35, 2003.

FERES, M.; GONÇALVES, C. O impacto do diagnóstico microbiológico na terapêutica periodonta. In: OPPERMANN, R.V.; RÖSING, C.K. *Periodontia. Ciência e Clínica*, 1 ed São Paulo: Artes Médicas, 2001, p.39-56.

FISHER, J. H. Pyorrhea alveolaris: the role of certain microorganisms found in the lesions. *Dental Cosmos*, v.69, p.851, 1927.

FLOTRA, L. Different modes of chlorhexidine application and related local side effects. *Journal of Periodontal Research*, v.8 (Suppl. 12), p.41-44, 1973.

FOULKES, D. M. Some toxicological observations on chlorhexidine. *Journal of Periodontal Research*, v.8 (Suppl.12), p.55-57, 1973.

GENCO, C. A. et al. A novel mouse model to study the virulence of and host response to *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis*. *Infection and Immunity*, v.63, p.1255, 1991.

GENCO, R. J.; SLOTS, J. Host responses in periodontal diseases. *Journal of Dental Research*, v.63, p.441-451, 1984.

- GJERMO, P. Chlorhexidine in dental practice. **Journal of Clinical Periodontology**, v.1, p.143-152, 1974.
- GJERMO, P., BAASTAD, K. L.; ROLLA, G. The plaque-inhibiting capacity of 11 antibacterial compounds. **Journal of Periodontal Research**, v.5, p.102-109, 1970.
- GJERMO, P. Chlorhexidine and related compounds. **Journal of Dental Research**, v.68 (Spec. Iss.), p.1602-1608, 1989.
- GOODSON, J. M. Pharmacokinetic principles controlling efficacy of oral therapy. **Journal of Dental Research**, v.68 (Spec. Iss.), p.1625-1632, 1989.
- GOTTLIEB, B. The formation of the periodontal pocket: diffuse atrophy of the alveolar bone. **Journal of American Dental Association**, v.15, p.462-474, 1928.
- HENNESSEY, T. D. Some antibacterial properties of chlorhexidine. **Journal of Periodontal Research**, v.8 (Suppl. 12), p.61-67, 1973.
- HJELJORD, L. G.; ROLLA, G.; BONESVOLL, P. Chlorhexidine-protein interactions. **Journal of Periodontal Research**, v.8 (Suppl. 12), p.11-16, 1973.
- HUGOSON, A. et al. Distribution of periodontal disease in a Swedish adult population 1973, 1983, 1993. **Journal of Clinical Periodontology**, v.25, p.807-812, 1998.
- HULL, P. Chemical inhibition of plaque. **Journal of Clinical Periodontology**, v.7, 431-442, 1980.
- JENKINS, S.; ADDY, M.; NEWCOMBE, R. The effects of 0,5% chlorhexidine and 0,2% triclosan containing toothpastes on salivary bacterial counts. **Journal of Clinical Periodontology**, v.17, p.85-89, 1990.

JENKINS, S.; ADDY, M.; NEWCOMBE, R. The effects of a chlorhexidine toothpaste on the development of plaque, gingivitis and tooth staining. **Journal of Clinical Periodontology**, v.20, p.59-62, 1993.

JOHANSEN , J. R.; GJERMO, P.; ERIKSEN, H. M. A longitudinal study of the effect of chlorhexidine containing dentifrices. **Journal of Periodontal Research**, v.7 (Suppl. 10), p.36-37, 1972.

JOHANSEN , J. R.; GJERMO, P.; ERIKSEN, H. M. Effect of 2-years use of chlorhexidine-containing dentifrices on plaque, gingivitis and caries. **Scandinavian Journal of Dental Research**, v.83, p.288-292, 1975.

KALDAHL, W. W.; KALKWARF, K. L.; PATIL, K. D. A review of longitudinal studies that compared periodontal therapies. **Journal of Periodontology**, v. 64, p. 243-253, 1993.

KEYES, P. H.; JORDAN, H. V. Periodontal lesions in the syrian hamsters. III. Findings related to an infectious and transmissible component. **Archives of Oral Biology**, v.9, p.377-400, 1964.

KILLOY, W. J. The use of locally-derived chlorhexidine in the treatment of periodontitis. Clinical results. **Journal of Clinical Periodontology**, v.25, p.953-958, 1998.

KOLEMBRANDER, P. E.; LONDON, J. Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. **Journal of Bacteriology**, v.175, n.11, p.3247-3252, 1993.

KOLLE, W. Spirochätenbefunde und salvarsan bei alveolar-pyorrhoe. **Med. Klin.**, v.3, p.59-60, 1917.

KORNMAN, K. S. The role of subgingival plaque in the prevention and treatment of periodontal diseases. **Journal of Periodontal Research**, v.21 (Suppl.16), p.5-22, 1986.

LAMSTER, et al. Serum IgG responses to *Actinobacillus Actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*: Implications for Periodontal Diagnosis, em **Journal of Clinical Periodontology**, n° 25, p. 510-16, 1998.

LANGSLET, A.; OLSEN, I.; LOKKEN, P. Effects of chlorhexidine on oral candidiasis in seriously diseased children. **Journal of Dental Research**, v.53, p.1107 (abstract).

LE CLEAR, T. Method of identification of endamoebae in dry smears. **Dental Cosmos**, v.57, p.1313, 1915.

LENNON, M. A.; DAVIES, R. M. A short-term evaluation of a chlorhexidine gel on plaque deposits and gingival status. **Pharmacology and Therapeutics in Dentistry**, v.2, p.13-19, 1975.

LINDHE, J.; NYMAN, S. The effect of plaque control and surgical pocket elimination on the establishment and maintenance of periodontal health. A longitudinal study of periodontal therapy in cases of advanced disease. **Journal of Clinical Periodontology**, v.2, p.67-79, 1975.

LINDHE, J. et al. Longitudinal changes in periodontal disease in untreated subjects. **Journal of Clinical Periodontology**, v.16, p. 662-670, 1989.

LINDHE, J. **Clinical Periodontology and Implant Dentistry**, 4ed. Copenhagen: Munksgaard, 2003: p. 106-145.

LISTGARTEN, M. A. Electron microscopic observations of the bacterial flora of acute necrotizing ulcerative gingivitis. **Journal of Periodontology**, v.36, p.328-339, 1965.

- LISTGARTEN, M. A. Pathogenesis of periodontitis. **Journal of Clinical Periodontology**, v.13, p.418-425, 1986.
- LISTGARTEN, M. A; HELLDEN, L. Relative distribution of bacteria at clinically healthy and periodontally disease sites in humans. **Journal of Clinical Periodontology**, v.5, p.115-132, 1978.
- LÖE, H.; SCHIOTT, C. R. The effect of mouthrinse and topical applications of chlorhexidine on the development of plaque and gingivitis in man. **Journal of Periodontal Research**, v.5, p.79-83, 1970.
- LÖE, H. Does chlorhexidine have a place in the profilaxis of dental diseases? **Journal of Periodontal Research**, v.8 (Suppl.12), p.93-99, 1973.
- LÖE, H. Two years oral use of chlorhexidine in man. I. General design and clinical effects. **Journal of Periodontal Research**, v.11, p.135-144, 1976.
- LÖE, H.; THEILADE, E.; JENSEN, B. Experimental gingivitis in man. **Journal of Periodontology**, v.36, p.177-187, 1986.
- LOOS, B; CLAFFEY, N; CRIGGER, M. Effects of oral hygiene measures on clinical and microbiology of parameters of periodontal disease. **Journal of Clinical Periodontology**, v.15, p.211-216, 1988.
- LORRI, J.; BERGLUND, R. D. H.; CONNIE, L.; SMALL, R. D. H. Effect oral hygiene for orthodontic patients. **J. Clin. Orthod.** , v. 24, n. 5, p. 315-320, 1990
- MACKENZIE, I. C. et al. Two years oral use of chlorhexidine in man. V. effects on stratum corneum of oral mucosa. **Journal of Periodontal Research**, v.11, p.165-171, 1976.

- MANDELL, R. L.; SOCRANSKY, S. S. A selective medium for *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in localized juvenile periodontitis. **Journal of Periodontology**, v. 52, p.593-598, 1981.
- MARSH, P. D. Dentifrices containing new agents for the control of plaque and gingivitis: microbiological aspects. **Journal of Clinical Periodontology**, v.18, p.462-467, 1991.
- MARSH, P. D.; BRADSHAW, D. J. Dental plaque as a biofilm. **Journal of Industrial Microbiology**, v.15, p.169-175, 1995.
- MEURER, D, B., et al. Infecção experimental com *Porphyromonas gingivalis* em camundongos Balb/C e imunossuprimidos: avaliação da resposta inflamatória. **revista periodontia**, v.5,n°3,p.273-76, 1996.
- MOORE, L. V. H. et al. Bacteriology of human gingivitis. **Journal of Dental Research**, v.66, p.989-995, 1987.
- MORAN, J.; ADDY, M.; NEWCOMBE, R. The antibacterial effect of toothpastes on the salivary flora. **Journal of Clinical Periodontology**, v.15, p.193-199, 1988.
- MULLIS, K.B.; FALAOONA, F.A. Specifics Synthesis of DNA in Vitro via a Polimerase-Catalysed Chain Reaction. **Methods Enzymol**, v.155, p.335-50, 1987.
- NASH, E. S.; ADDY, M. The use of chlorhexidine gluconate mouthrinses in patients with intermaxillary fixation. **British Journal of Oral Surgery**, v.17, p.251-255, 1979.
- NUKI, K.; et al. Two year oral use of chlorhexidine in man. VI. Effect on oxidative enzymes in oral epithelia. **Journal of Periodontal Research**, v.11, p.172-175, 1976.
- OFFENBACHER, S. et al. Periodontal infection as a possible risk factor for preterm low birth weight. **Journal of Periodontology**, v.67 (Suppl), p.1103-1113, 1996.

OPPERMANN, R.V.; RÖSING, C.K. **Periodontia. Ciência e Clínica**. São Paulo: Artes Médicas, 1 ed., 2001.

OWENS, J. et al. A short-term clinical study design to investigate the chemical plaque inhibitory properties of mouthrinses when used as adjuncts to toothpastes: applied to chlorhexidine. **Journal of Clinical Periodontology**, v.24, p.732-737, 1997.

PAGE, R. C. et al. Advances in the patogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. **Periodontology 2000**, v.14, p.216-248, 1997.

PANNUTI, C. M. et al. Efficacy of a 0,5% chlorhexidine gel on the control of gingivitis in brazilian mentally handicapped patients. **Journal of Clinical Periodontology**, v.30, p.573-576, 2003.

PATTERSON, J. D. Comments upon the vaccine treatment. **Journal of American Dental Association**, v.2, p.234-246, 1915.

PRINTZ, H. The etiology of pyorrhea alveolaris. **Dental Cosmos**, v. 68, p.1-9, 1926.

RENTON-HARPER, P. et al. A comparision of chlorhexidine, cetipyridium chloride, triclosan and C31G mouthrinse products ofr plaque inhibition. **Journal of Periodontology**, v. 67, n.5, p. 486-489, 1996.

RÕÇAS, I.N. et al. Detecção de *Bacteroides forsythus* em dez casos de infecção endodontica pelo método da Reação da Cadeia da Polimerase. **Revista Brasileira de Odontologia – ABO/RJ** .Disponível em <http://www.aborj.com.br/revista>, 2003.

RODRIGUES, A., M.; NEWMAN, M., G. Microbiologia e Imunologia Periodontal. In Cardoso, R., J., A.,: Gonçalves, E., A., N. **Periodontia/ Cirurgia/ Cirurgia para Implantes**, São Paulo: Artes Médicas, V. 5, p. 22-50, 2002.

ROLLA, G. H. et al. The affinity of chlorhexidine for hydroxyapatite and salivary mucins. **Journal of Periodontal Research**, v.5, p.90-95, 1970.

ROLLA, G. H. et al. Retention of chlorhexidine in the human oral cavity. **Archives of Oral Biology**, v.16, p.1109-1116, 1971.

RUSSELL, B. G.; BAY, L. M. Oral use of chlorhexidine gluconate toothpaste in epileptic children. **Scandinavian Journal of Dental Research**, v.86, p.52-57, 1978.

SAKAI, Y. et al. *Porphyromonas gingivalis* Specific IgG Subclass Antibody Levels as Immunological Risk Indicators of Periodontal Bone Loss, em **Journal of Clinical Periodontology**, n° 28, p. 853-59, 2001.

SANTOS, A. Evidence-based control of plaque and gingivitis. **Journal of Clinical Periodontology**, v.30, Suppl.5, p;13-16, 2003.

SANZ, M. et al. The effect of a dentifrice containing chlorhexidine and zinc on plaque, gingivitis, calculus and tooth staining. **Journal of Clinical Periodontology**, v.21, p. 431-437, 1994.

SANZ, M. Methods of detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in periodontal microbiology, with special emphasis on advanced molecular techniques: a review. **Journal of Clinical Periodontology**, v.31, p.1034-1047, 2004.

SAVITT, E. D. et al. Comparision of cultural methods and DNA probe analysis for the detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides intermedius* in subgingival plaque samples. **Journal of Periodontology**, v.59, p.431-438, 1988.

SAXER, U. A.; LINDEN, A. M. The antiplaque effects of a nonflavored and a flavored chlorhexidine gluconate rinsing solutions. **Helvetica Odontologica Acta**, v.21, p.797-800, 1977.

SCHIOTT, C. R. et al. The effect of chlorhexidine mouthrinses on the human flora. **Journal of Periodontal Research**, v.5, p.84-89, 1970.

SCHIOTT, C. R.; BRINER, W. W.; LÖE, H. Two year oral use of chlorhexidine in man. II. The effect on the salivary bacterial flora. **Journal of Periodontal Research**, v.11, p.145-152, 1976.

SCHIOTT, C. R. et al. Two year oral use of chlorhexidine in man. III.Changes in sensivity of the salivary flora. **Journal of Periodontal Research**, v.11, p.153-157, 1976.

SCHIOTT, C. R.; LÖE, H.; BRINER, W. W. Two year oral use of chlorhexidine in man. IV. Effect on various medical parameters. **Journal of Periodontal Research**, v.11, p.158-164, 1976.

SIEGRIST, B. E. et al. Efficacy of supervised rinsing with chlorhexidine digluconate in comparision to phenolic and plant alkaloid compounds. **Journal of Periodontal Research**, v.21 (suppl.16), p.60-73, 1986.

SILVA, S. C.; LINS, A. H. S. A; TOSCANO, D. A. Prevenção Periodontal: controle mecânico da placa. **Revista Periodontia**, v.6, p. 43-47, 1997.

SIQUEIRA, A.L.; SOARES, J.F., *Estatística Médica* , Editora Artemed, Belo Horizonte, 1ª ed., , 2001.

SJÖBLOM, M; AINAMO, A.; AINAMO, J. Antimicrobial effect of four different toothpastes. **Scandinavian Journal of Dental Research**, v.84, p.377-380, 1976.

SLOTS, J.; GENCO, R. J. Black-pigmented Bacteroides Species, Capnocytophaga species, and Actinobacillus actinomycetemcomitans in human periodontal disease: virulence factors in colonization, survival, and tissue destruction. **Journal of Dental Research**, v.63, p.412-421, 1984.

SMITH, T. S. The emitin hydrochloride question in the treatment of pyorrhea alveolaris. **Dental Cosmos**, v.57, p. 1313, 1915.

SMITH, R. G. et al. Comparative staining in vitro and plaque inhibitory properties in vivo of 0,12% and 0,2% chlorhexidine mouthrinses. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 22, n.8, p.613-617, 1995.

SOCRANSKY S. S.; HAFFAJEE, A. D. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. **Journal of Periodontology**, v.63, n.4, p.322-331, 1992.

SOCRANSKY S. S.; HAFFAJEE, A. D. Effect of therapy on periodontal infection. **Journal of Periodontology**, v.64, n.8 (suppl.), p.754-759, 1993.

SOCRANSKY, S. S. et al. Microbiological complexes in subgingival plaque. **Journal of Clinical Periodontology**, v.25, p.134-144, 1998.

SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D. Dental biofilms:difficult therapeutic targets. **Periodontology 2000**, v.28, p.15-55, 2002.

SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. Microbiology of periodontal disease. In LINDHE, J. **Clinical Periodontology and Implant Dentistry**, 4ed. Conpenhagen: Munksgaard, 2003: p.106-145.

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

- SUSIN, C. et al. Periodontal attachment loss in a urban population of Brazilina adults: effects of demographic, behavioral and environmental risk indicators. **Journal of Periodontology**, v.75, n.7, p.1033-1041, 2004.
- TANNER, A. et al. Microbiota of health, gingivitis, and initial periodontitis. **Journal of Clinical Periodontology**, v.25, p.85-98, 1998.
- VAN DER OUDERAA, F. J. G. Anti-plaque agents. Rationale and prospects for prevention of gingivitis and priodontal disease. **Journal of Clinical Periodontology**, v.18, p.447-454, 1991.
- VAN DER OUDERAA, F. J. G., CUMMINS, D. Delivery systems for agents in supra- and sub-gingival plaque control. **Journal of Dental Research**, v.68 (Spec. Iss.), p.1617-1624, 1989.
- VAN WINKELHOFF, A. J. Microbiologyin diagnosis and treatment planning in periodontics. **International Journal of Dental Hygiene**, v.1, p.131-137, 2003.
- WHITE, P. G. Deep muscular infections of succinimid of mercury in pyorrhea alveolaris. **Dental Cosmos**, v.57, p.405-408, 1915.
- WILSON, T. G. Compliance, a review of the literature with possible application to periodontics. **Journal of Periodontology**, v.58, 706-714, 1987.
- WOLFF, L. F., DAHLEN, G.; AEPPLI, D. Bacteria as risk markers for periodontitis. **Journal of Periodontology**, v.64, p.498-510, 1994.
- WU-YUAN, C. D.; GREEN, L.; BIRCH, W. X. In vitro of chinese medicinal toothpastes: their effects on growth and plaque formation of Mutans Streptococci. **Caries Research**, v.24, p.198-202, 1990.

YATES, R. et al. A 6-month home usage trial of a 1% chlorhexidine toothpaste. **Journal of Clinical Periodontology**, v.20, p.130-138, 1993.

ZICHERT, I.; EMILSON, C. G.; KRASSE, B. Correlation of level and duration of *Streptococcus mutans*. **Infection and Immunity**, v.39, p.982-985, 1984.

ANEXOS

ANEXO 1: Materiais permanentes e de consumo

Equipamento utilizado para PCR:

Termocicladores Perkin Elmer Gen Ampl PCR System 9700 (Applied Biosystems, CT, USA) / sistema Kodak Digital Science System-DC 120, fonte de corrente (BioRad, CT, USA).

Equipamento utilizado para exame clínico:

Sonda periodontal calibrada (PCP 15 UNC, modelo Hu-Friedy, USA), Espelho Clínico nº 5 (Duflex, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), Pinça Clínica (Duflex, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), Micromotor (Dabi-Atlante, Ribeirão Preto, SP, Brasil), Pasta Profilática (Vigodent, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), Taça de borracha (Komet, São Paulo, SP, Brasil), Pote Dappen (John, São Paulo, SP, Brasil).

Equipamento utilizado para confecção de matriz individual:

Plastificador a vácuo (Bioart, Ribeirão Preto, SP, Brasil).

Material para procedimento clínico

- Gaze estéril (Cremer, Rio de Janeiro, RJ, Brasil),
- Máscara Tripla (Descarpak, São Paulo, SP, Brasil),
- Luvas para Procedimento Clínico (Satari, São Paulo, SP, Brasil),
- Protetor Ocular (Uvex, CT, USA),
- Touca/Gorro (Descarpak, São Paulo, SP, Brasil),
- Álcool 70% (ZULU, São Paulo, SP, Brasil)

Material para coleta dos espécimes clínicos:

- Cones de papel estéreis nº 40 (Tanari, São Paulo, SP, Brasil).
- Tubo criogênico Eppendorf de 1,5 ml (TPP, USA) com 0,5 ml de água ultra pura de Milli-Q estéril.

Material para execução da PCR:

- H. Primers (Invitrogen, Life Technologies Laboratories, USA):reagente e o kit de identificação(Figs 8,9,10 e11).
- I. Gel de Agarose (1%) (Gibco/BRL), brometo de etídio (0,5ug/ml), *Taq* polimerase (Gibco BRL, Nova Iorque, USA), ddUTP (Gibco-BRL, Nova Iorque, USA), 1Kb DNA ladder (Gibco BRL, Nova Iorque, USA).
- J. 01 equipamento de fotodocumentação (EagleEye II, Stratagene, USA)
- K. *Taq* polimerase (Invitrogen Ltda. Brasil, São Paulo, SP).

Material de consumo para confecção da matriz individual:

-Gesso pedra comum tipo III (Herodent, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), alginato (Jeltrate Chromatic, Dentisplay, Rio de Janeiro,RJ, Brasil), espátula para alginato, espátula de gesso, grau de borracha, medidor de água e alginato (Dentisplay, Rio de Janeiro,RJ, Brasil), placas de silicone semi-rígida de espessura 0,3mm (Blue Equipaments, Ribeirão Preto , SP, Brasil), moldeiras tipo verner (Tenax, São Paulo, SP, Brasil) para pacientes dentados.

Material de consumo para controle de placa:

- Escova dental extra macia (Close Up Júnior, São Bernardo do Campo, SP, Brasil), tubo de creme dental (Cariax, Pharma Kin, São Paulo-SP) com 50 mg (Fig. 10) para o grupo teste e tubo de creme dental do grupo placebo com 50 mg (Pharmacia Camomila, Vila Velha,ES, Brasil).

ANEXO 2: Fotos clínicas durante a dinâmica do experimento



Coleta dos espécimes clínicos



Matriz individual, preenchida com dentífrício sobre os dentes testes ou controle do indivíduo.



Fase Zero Baseline:moderada quantidade de biofilme dental.



Fase 21 dias Gengivite marginal estabelecida.

ANEXO 3: Carta de recomendação aos pacientes

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

CENTRO BIOMÉDICO

INSTITUTO DE ODONTOLOGIA

NÚCLEO DE PERIODONTIA PESQUISA, EXTENSÃO E TREINAMENTO – NUPET

RECOMENDAÇÕES AOS PACIENTES

1. UTILIZAÇÃO DA PASTA:

USAR A MOLDEIRA COM A PASTA DURANTE TODO O DIA, ATÉ A NOITE, DURANTE 21 DIAS.

OBS: RETIRAR A MOLDEIRA PARA COMER. LAVAR COM ÁGUA E RECOLOCAR NA BOCA COM A PASTA.

2. HIGIENE BUCAL:

LIMPAR A BOCA 3 (TRÊS) VEZES AO DIA COM ESCOVA E ÁGUA. LAVAR A MOLDEIRA E RECOLOCÁ-LA NA BOCA COM A PASTA. NÃO ESCOVAR OS DENTES 44,45 e 46 (1º MOLAR e PRÉ-MOLARES INFERIORES) CONFORME ENSINADO.

ANEXO 4: Prontuário periodontal

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

CENTRO BIOMÉDICO

INSTITUTO DE ODONTOLOGIA

NÚCLEO DE PERIODONTIA PESQUISA, EXTENSÃO E TREINAMENTO – NUPET

PRONTUÁRIO PERIODONTAL

PACIENTE /
 NOME: _____

IDADE: ___ / ___ / ___ LOCAL _____ DE
 NASCIMENTO: _____

SEXO: _M_ _F_ ETNIA / RAÇA: _____ ESTADO
 CIVIL _____

ENDEREÇO _____ RESIDENCIAL:

TELEFONE: _____

ENDEREÇO
 PROFISSIONAL: _____ TELEFONE: _____

PROFISSÃO: _____ ESCOLARIDADE: _____

ANEXO 5: Ficha clínica periodontal

Ficha Clínica Periodontal

Nome: _____ Prontuário número: _____

Data do Exame: ___/___/___.

FACE VESTIBULAR**TEMPO 0 DIAS**

44

45

46

IP			
IG			
PCS			
NIC			
SG			

TEMPO 7 DIAS

44

45

46

IP			
IG			
PCS			
NIC			
SG			

TEMPO 14 DIAS

44

45

46

IP			
IG			
PCS			
NIC			
SG			

TEMPO 21 DIAS

44

45

46

IP			
IG			
PCS			
NIC			
SG			

Legenda: IP= Índice de placa, IG= Índice Gengival, PCS= Profundidade Clínica de Sondagem, NIC =Nível de Inserção Clínica e SG = Índice de Sangramento Gengival.

ANEXO 6 :Carta de apresentação e consentimento esclarecido do participante da pesquisa .

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA

INFORMAÇÕES SOBRE O PESQUISADOR RESPONSÁVEL

O Pesquisador responsável responde pelo nome de Alfredo Feitosa. Telefone de contato: 0XX27 3335-7273 / 3335-7276/3299-5662/ 9969-4086.

Este documento indica que _____ foi convidado a participar de uma pesquisa sob a responsabilidade de Alfredo Feitosa, em ação conjunta com outros pesquisadores participantes.

1. **Objetivo da Pesquisa:** realizar exames intrabucais com finalidade de diagnóstico de inflamação gengival e coleta de placa dental supragengival para fins de análise microbiológica molecular.
2. **Duração e local da pesquisa:** a participação dos indivíduos ocorrerá nas fases 0 (baseline), 7, 14 e 21 dias , tempo estes do experimento observado a serem realizados com exame intrabucal e coleta de espécimes clínicos de placa supragengival, junto ao programa de periodontia básica oferecido no ambulatório II na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Espírito Santo –UFES.
3. **Riscos e Desconfortos:** Não há nenhum risco pois os exames a serem realizados são de rotina na prática de odontologia e de saúde periodontal.
4. **Garantia de sigilo de identidade:** Nenhum resultado será reportado com identificação pessoal do participante. Todos os cuidados serão tomados para manutenção do sigilo de sua identidade. Ao conceder o direito de retenção e uso de quaisquer documentos para fins de ensino e divulgação (dentro das normas vigentes) em jornais e revistas científicas do país e estrangeiras, será mantida a devida preservação do segredo profissional. A identidade permanecerá confidencial, a menos que a quebra de sigilo seja uma exigência judicial.
5. **Ressarcimento Financeiro:** Nenhuma ajuda financeira será concedida aos participantes, pela instituição ou pela equipe de pesquisadores, relativa a participação na pesquisa.
6. **Direito em recusa em participar da pesquisa :**A participação na pesquisa não é obrigatória e caso alguns dos participantes selecionados se recuse em participar, isso não resultará em nenhum tipo de penalidade para os mesmos.
7. **Esclarecimento de Dúvidas:** Em caso de dúvidas ou se existir a necessidade de reportar injúria ou dano, os participantes devem contatar o pesquisador responsável.

ANEXO 7: Carta de autorização para fins de diagnóstico periodontal**Pesquisador Responsável****AUTORIZAÇÃO PARA FINS DE DIAGNÓSTICO PERIODONTAL**

NOME LEGÍVEL: _____ Idade: ___anos ___meses

Por este instrumento de autorização por mim assinado, dou pleno consentimento à equipe de pesquisadores composta por Professores do Curso de Odontologia da UFES, cirurgiões dentistas, estagiários e alunos, para fazerem exames em minha pessoa, para fins de diagnóstico periodontal. Autorizo também, que os resultados provenientes de todos os exames clínicos e quaisquer outras informações concernentes ao diagnóstico, constituam propriedade exclusiva da equipe de pesquisadores, aos quais dou plenos direitos de retenção e uso para quaisquer fins de ensino e ou de divulgação em eventos odontológicos, em jornais, revistas científicas e livros nacionais e internacionais.

Declaro que recebi uma cópia e informações sobre todos os termos do documento anexo, que trataram dos direitos do participante da pesquisa, da qual aceito participar voluntariamente e que tenho completo conhecimento de todos os procedimentos a que serei submetido.

Vitória –ES, ____/_____/2004.

Assinatura do Paciente ou Responsável

ANEXO 8: Carta de responsabilidade

Responsabilidade do Pesquisador

Prestar atendimento de diagnóstico periodontal e colheita de espécimes clínicos do biofilme supragengival, conforme descrito, respeitando os princípios éticos de uma pesquisa que envolve seres humanos.

Responsabilidade da instituição

Fornecer condições necessárias para execução da pesquisa, através do curso de Odontologia da Universidade Federal do Espírito Santo-UFES.

Declaração do Pesquisador Responsável

Venho por meio desta, declarar para os devidos fins que eu, Alfredo Feitosa, Pesquisador responsável pela pesquisa científica intitulada: Avaliação da pasta de clorexidina no controle do biofilme dental e da inflamação gengival de pacientes com histórico de periodontite. Estudo clínico e microbiológico, randomizado e duplo-cego em humanos, tornarei público os resultados desta pesquisa, sejam eles favoráveis ou não.

Declaro também, que os dados coletados serão usados e destinados exclusivamente para fins científicos, de acordo com a proposta deste trabalho e dentro dos padrões éticos, científicos internacionais e nacionais, mantendo sigilo sobre os participantes e em hipótese alguma poderão ser utilizados para fins comerciais ou lucrativos.

Prof. Alfredo Feitosa

ANEXO 9 : Índices de Ainamo e Bay, Løe e Silness, Silness e Løe e Coleta de dados

SG – Índice de Sangramento Gengival de AINAMO e BAY (1975)

0- ausência de sangramento de 0 a 10 segundos após sondagem com a sonda padrão da Organização Mundial de Saúde (O.M.S.)

1- sangramento de 0 a 10 segundos após sondagem

IG –Índice Gengival de LOE e SILNESS (1967)

0- ausência de inflamação

1- inflamação leve – ligeira mudança na cor e textura gengival, ausência de sangramento à sondagem;

2- inflamação moderada – vermelhidão, edema / hipertrofia, presença de sangramento à sondagem;

3- inflamação severa – tendência à sangramento espontâneo e ulceração

IP- Índice de Placa de SILNESS e LÖE (1964)

0- ausência de biofilme dental visível ou detectado com sonda

1- biofilme dental aderido ao dente, próximo à margem gengival livre, visualizado através do uso da sonda periodontal passada na superfície do dente ou através de corantes

2- acúmulo moderado de biofilme dental no dente, que pode ser detectado a olho nu, próximo à margem gengival e sem ultrapassar 1/3 do dente

3- grande acúmulo de biofilme dental na superfície dental, ultrapassando 2/3 da face analisada.

COLETA DE DADOS

DIA 0 = Levantamento inicial dos IP, IG, PCS, NIC, SG e COLETA DOS ESPÉCIMES CLÍNICOS

DIA 7 = Levantamento dos IP, IG, PCS, NIC, SG E COLETA DOS ESPÉCIMES CLÍNICOS

DIA 14 = Levantamento dos IP, IG, PCS, NIC, SG E COLETA DOS ESPÉCIMES CLÍNICOS

DIA 21 = Levantamento final dos IP, IG, PCS, NIC, SG E COLETA DOS ESPÉCIMES CLÍNICOS

ANEXO 10: Registro CEP UNISA Nº 12/2003



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP



UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO
Comitê de Ética em Pesquisas
Registro CONEP n.º 306
Aprovado em 16/05/2000

PARECER N.º 106/2003

REGISTRO CEP UNISA N.º 12/2003 – Apresentado em 25/10//2003

Projeto de Pesquisa: “ Avaliação da pasta de clorexidina no controle do biofilme dental e da inflamação gengival de pacientes com histórico de periodontite. Estudo clínico e microbiológico, randomizado e duplo-cego em humanos.”

Pesquisador Responsável : Prof. Dr. Wilson Roberto Sendyk
Ac. Fábio Matos Quiarceli

Área Temática Especial: Odontologia

Prezado Pesquisador,

Ao se proceder à análise do processo em questão, cabe a seguinte consideração:

As informações apresentadas atendem aos aspectos fundamentais das Resoluções CNS 196/96, 251/97 e 292/99, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Involvidendo Seres Humanos.

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisas da UNISA, de acordo com as atribuições da Resolução 196/96, manifesta-se pela aprovação da pesquisa acima referenciada, a ser desenvolvido na Disciplina de Periodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade de Santo Amaro - SP.

Situação: Aprovado em 03/11/2003

São Paulo, 04 de Novembro de 2003
PROF. DR. LIBERATO JOHN ALPHONSE DI DIO
 Presidente do Comitê de Ética em Pesquisas
 UNISA - Universidade de Santo Amaro

ANEXO 11: Registro no Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Biomédico - UFES



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

Vitória-ES, 11 de março de 2004

Do: Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Biomédico
da Universidade Federal do Espírito Santo
Prof. Dr. Paulo Roberto Merçon de Vargas

Ao: Dr. Alfredo Carlos Rodrigues Feitosa
Pesquisador Responsável pelo Projeto Intitulado: "Avaliação da pasta de
Clorexidina no controle do biofilme dental e da inflamação gengival de
pacientes com histórico de periodontite. Estudo clínico e microbiológico,
randomizado e duplo-cego em humanos"

Senhor Pesquisador,

O Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Biomédico da Universidade Federal do Espírito Santo, após analisar o Protocolo de Pesquisa intitulado: "Avaliação da pasta de Clorexidina no controle do biofilme dental e da inflamação gengival de pacientes com histórico de periodontite. Estudo clínico e microbiológico, randomizado e duplo-cego em humanos", cumprindo os procedimentos internos desta Instituição, bem como as exigências das Resoluções 196 de 10.10.96, 251 de 07.08.97 e 292 de 08.07.99, APROVOU o referido projeto, bem como o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido** em Reunião Ordinária realizada em 10 de março de 2004.

Atenciosamente,


Prof. Dr. PAULO ROBERTO MERÇON DE VARGAS
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
Centro Biomédico / UFES

ANEXO 12: Registro da Ata de aprovação do Projeto de Pesquisa

235

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO BIOMÉDICO
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA ODONTOLÓGICA

Extrato de ata da reunião ordinária do Departamento de Clínica Odontológica do Centro Biomédico da Universidade Federal do Espírito Santo, realizada no dia quatro de dezembro de dois mil e três.....

Às oito horas do dia quatro de dezembro de dois mil e três, sob a Presidência da Prof^a Marly Almeida Saleme do Valle e com a presença dos Senhores Professores: Ivette Beccalli Andrade de Souza, Hudson Carneiro de Paula, Maria Christina Thomé Pacheco, Alfredo Carlos Rodrigues Feitosa, Teresa Cristina Rangel Pereira, Nevelton Heringer, Francisco Carlos Ribeiro, Elaine Cristina Vargas Dadalto, Ana Maria Martins Gomes, André Alberto Câmara Puppim, Maria Rosiani Dorietto de Menezes, Rosana de Souza Pereira, Ricardo Luiz Carvalho Gottardi, Maria Helena Monteiro de Barros Miotto, Roberto Carlos Bodart Brandão, Maria Rebeca Amaral Ganhoto e José Renato Costa. Havendo número legal, foram abertos os trabalhos.....

ORDEM DO DIA: 9º ÍTEM: Projeto de Pesquisa intitulado: "AVALIAÇÃO DA PASTA DE CLOREXIDINA NO CONTROLE DO BIOFILME DENTAL E DA INFLAMAÇÃO GENGIVAL DE PACIENTES COM HISTÓRICO DE PERIODONTITE. ESTUDO CLÍNICO E MICROBIOLÓGICO, RANDOMIZADO E DUPLO-CEGO EM HUMANOS" - Coordenador/Responsável: Prof. Alfredo Carlos R. Feitosa - Relatora: Prof^a Teresa Cristina R. Pereira. Em discussão e votação, aprovado à unanimidade.....

Nada mais havendo a tratar a Senhora presidente deu por encerrada a sessão, eu Luciani Saad Gonçalves secretária "ad hoc" lavei a presente ata que após lida e aprovada vai devidamente assinada pelos Senhores Professores. Vitória, quatro de dezembro de dois mil e três.....

Confere com Original
Em. 04 : 32103

Teresa Cristina R. Pereira

ANEXO 13: Registro do Extrato da Ata de aprovação do Projeto de Pesquisa



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

EXTRATO DA ATA DA 1ª REUNIÃO ORDINÁRIA DO ANO DE 2004 DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO CENTRO BIOMÉDICO REALIZADA NO DIA 10 DE MARÇO ÀS 17:00 hs.

Aos dez dias do mês de março do ano de dois mil e quatro as dezessete horas, na sala de reuniões do Núcleo de Doenças Infecciosas, realizou-se a 1ª. Reunião Ordinária do ano de dois mil e quatro do Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Biomédico, com a presença dos seguintes membros: Professores Doutores Paulo Roberto Merçon de Vargas (Coordenador), Elda Coelho Azevedo Bussinguer, Maria Rosiani Dorietto de Menezes, Reynaldo Dietze, Roberto de Sá Cunha, e Fátima Aparecida Pereira (Secretária). Deliberações: g) Tendo como relatora a Profa. Dra. Maria Rosiani Dorietto de Menezes, o Projeto de Pesquisa intitulado: "Avaliação da pasta de Clorexidina no controle do biofilme dental e da inflamação gengival de pacientes com histórico de periodontite. Estudo clínico e microbiológico, randomizado e duplo-cego em humanos", sendo o Pesquisador Responsável Prof. Dr. Alfredo Carlos Rodrigues Feitoça, por unanimidade, teve parecer favorável; Nada mais havendo a tratar, foi encerrada a reunião, tendo eu Fátima Aparecida Pereira (Secretária), lavrado a presente ata que assino juntamente com os demais membros presentes do Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Biomédico. Vitória-ES, dez de março do ano de dois mil e quatro.

Fátima Aparecida Pereira (Secretária)

ANEXO 14: Registro do Projeto de pesquisa no CONEP



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Conselho Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

39
6

FOLHA DE ROSTO PARA PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

1. Projeto de Pesquisa:

AVALIAÇÃO DA PASTA DE CLOREXIDINA NO CONTROLE DO BIOFILME DENTAL E DA INFLAMAÇÃO GENGIVAL DE PACIENTES COM HISTÓRICO DE PERIODONTITE. ESTUDO CLÍNICO E MICROBIOLÓGICO, RANDOMIZADO E DUPLO-DEGO EM HUMANOS.

2. Área de Conhecimento: CIÊNCIAS DA SAÚDE	3. Código 4.02	4. Nível (Para Área 4) TERAPÊUTICO
5. Área Temática MEDICAMENTOS	6 Código 3	7. Fase (Para Área 3)
8. Unitermos: (3) PASTA DENTAL, CLOREXIDINA, BIOFILME, INFLAMAÇÃO GENGIVAL, MICROBIOLÓGICO, PCR, DUPLO-CEGO		

PESQUISADOR RESPONSÁVEL

9. Nome:

ALFREDO CARLOS RODRIGUES FEITOSA

10. Identidade:
27595011. CPF
450734737-87

17. Endereço

Rua Luiz Fernandes Reis, 417 Ap.602 Ed. Beach Sun

12. Nacionalidade
BRASILEIRO13. Profissão
PROFESSOR
UNIVERSITÁRIO18. CEP
29101-12019. Cidade
VILA VELHA20. UF
ES14. Maior Titulação:
MESTRE15. Cargo:
PROF. ASSISTENTE
DE PERIODONTIA21. Fone
3335-
7273/7228/3299-
5662/9969-4086

16. Instituição a que pertence

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

Termo de Compromisso:

Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Res.196/96, Sua complementares e aceito as responsabilidades pela condução Científica do projeto acima.

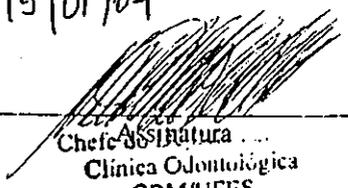
Data: 19/10/04

Assinatura
Dr. Alfredo Feitosa, M.Sc.
PROFESSOR DE PERIODONTIA
MT.58919 - CBIMUFES
CR.022.236

INSTITUIÇÃO ONDE SERÁ REALIZADO

24. Nome: UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPIRITO SANTO - UFES	28. Endereço Av. Marechal Campos, 1468 Maruípe		
25. Unidade/Orgão: Departamento de Clínica Odontológica	29. CEP 29040-090	30. Cidade VITÓRIA	31. UF ES
26. Projeto Multicêntrico: Sim () Não (X)	32. Fone (27) 3335-7228	33. Fax: (27) 3335- 7241/3289-1312	E-mail: felo.vix@terra.com.br nupc@npd.ufes.br
27. Outras Instituições participantes UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO - UNISA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP			

ANEXO 14.1: Continuação do Registro do Projeto de pesquisa no CONEP

<p>Termo de Compromisso: Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Res.196/96, Sua complementares e aceito as responsabilidades pela condução Científica do projeto acima.</p>	<p>Data: 19/01/04</p> <p> Assinatura Chefe de Clínica Odontológica CBM/UFES</p>
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

PATROCINADOR

34. Nome:		37. Endereço	
35. Patrocinador:		38. CEP	39. Cidade
36. Cargo/Função	41. Fone:	42. Fax	E-mail:

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP

43. Data de Entrada 19/01/04	44. Protocolo	45. Conclusão: Aprovado: <input checked="" type="checkbox"/> Data:	46. Conclusão: Reprovado () Data:
---------------------------------	---------------	--------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------

47. Relatório(s) do pesquisador responsável previsto(a) para:

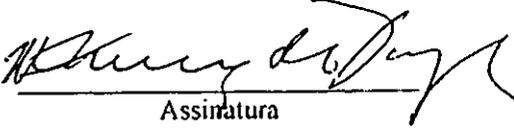
Encaminhado à CONEP:

48. Os dados acima para registro:

49. Os dados acima para apreciação:

50. Data:

51. Coordenador/Nome


Assinatura

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA - CONEP

52. Protocolo:	54. Registro do Banco de Dados
53. Data recebimento:	55. Observações

ANEXO 15: Tabelas e Gráficos

Relação entre creme dental e idade

Creme Dental	n	Média	Desvio Padrão	p-valor
Placebo	9	31,33	12,23	0,772
Cariax	9	32,78	8,03	

Relação entre os dentifícios e tempo de coleta com a variável periodontal,

Profundidade clínica de sondagem nos dentes 44, 45, e 46

Variável / Dente	Creme Dental	Tempo	n	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão
PCS 44	Placebo	0 dias	9	0	0	,00	,00
		7 Dias	9	0	1	,22	,44
		14 Dias	9	0	1	,11	,33
		21 Dias	9	0	1	,11	,33
	Cariax	0 dias	9	0	1	,11	,33
		7 Dias	9	0	1	,11	,33
		14 Dias	9	0	0	,00	,00
		21 Dias	9	0	1	,11	,33
PCS 45	Placebo	0 dias	9	0	0	,00	,00
		7 Dias	9	0	1	,44	,53
		14 Dias	9	0	1	,33	,50
		21 Dias	9	0	1	,22	,44
	Cariax	0 dias	9	0	0	,00	,00
		7 Dias	9	0	1	,11	,33
		14 Dias	9	0	1	,11	,33
		21 Dias	9	0	1	,11	,33
PCS 46	Placebo	0 dias	9	0	2	,22	,67
		7 Dias	9	0	2	,44	,73
		14 Dias	9	0	3	,33	1,00
		21 Dias	9	0	2	,33	,71
	Cariax	0 dias	9	0	1	,22	,44
		7 Dias	9	0	1	,11	,33
		14 Dias	9	0	2	,33	,71
		21 Dias	9	0	1	,33	,50

Estatísticas descritivas – NIC 44, NIC 45, e NIC 46

Variável / Dente	Creme Dental	Tempo	n	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão
NIC 44	Placebo	0 dias	9	1	2	1,33	,50
		7 Dias	9	1	2	1,33	,50
		14 Dias	9	1	2	1,33	,50
		21 Dias	9	1	2	1,33	,50
	Cariax	0 dias	9	1	4	2,22	1,20
		7 Dias	9	1	4	2,22	1,20
		14 Dias	9	1	4	2,22	1,20
		21 Dias	9	1	4	2,22	1,20
NIC 45	Placebo	0 dias	9	1	4	1,67	1,12
		7 Dias	9	1	4	1,67	1,12
		14 Dias	9	1	4	1,67	1,12
		21 Dias	9	1	4	1,67	1,12
	Cariax	0 dias	9	1	5	2,33	1,32
		7 Dias	9	1	5	2,33	1,32
		14 Dias	9	1	5	2,33	1,32
		21 Dias	9	1	5	2,33	1,32
NIC 46	Placebo	0 dias	9	1	16	3,11	4,86
		7 Dias	9	1	16	3,11	4,86
		14 Dias	9	1	16	3,11	4,86

Estatísticas descritivas – NIC 44, NIC 45, e NIC 46

Variável / Dente	Creme Dental	Tempo	n	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão
NIC 44	Placebo	0 dias	9	1	2	1,33	,50
		7 Dias	9	1	2	1,33	,50
		14 Dias	9	1	2	1,33	,50
		21 Dias	9	1	2	1,33	,50
	Cariax	0 dias	9	1	4	2,22	1,20
		7 Dias	9	1	4	2,22	1,20
		14 Dias	9	1	4	2,22	1,20
		21 Dias	9	1	4	2,22	1,20
NIC 45	Placebo	0 dias	9	1	4	1,67	1,12
		7 Dias	9	1	4	1,67	1,12
		14 Dias	9	1	4	1,67	1,12
		21 Dias	9	1	4	1,67	1,12
	Cariax	0 dias	9	1	5	2,33	1,32
		7 Dias	9	1	5	2,33	1,32
		14 Dias	9	1	5	2,33	1,32
		21 Dias	9	1	5	2,33	1,32
NIC 46	Placebo	0 dias	9	1	16	3,11	4,86
		7 Dias	9	1	16	3,11	4,86
		14 Dias	9	1	16	3,11	4,86
		21 Dias	9	1	16	3,11	4,86
	Cariax	0 dias	9	1	8	3,00	2,40
		7 Dias	9	1	8	3,00	2,40
		14 Dias	9	1	8	3,00	2,40
		21 Dias	9	1	8	3,00	2,40

ANOVA para medidas repetidas

Variável / Dente	Fator	F	p-valor
PCS 44	Creme dental	1,33	0,265
	Tempo	-	-
	Creme Dental e Tempo	-	-
PCS 45	Creme dental	0,77	0,395
	Tempo	1,00	0,401
	Creme Dental e Tempo	1,00	0,401
PCS46	Creme dental	0,25	0,627
	Tempo	-8,00	1,000
	Creme Dental e Tempo	0,25	0,861
NIC 44	Creme dental	4,20	0,057
	Tempo	-	-
	Creme Dental e Tempo	-	-
NIC 45	Creme dental	1,33	0,265
	Tempo	-	-
	Creme Dental e Tempo	-	-
NIC 46	Creme dental	0,00	0,952
	Tempo	-	-
	Creme Dental e Tempo	-	-

Teste Exato De Fisher – variável IP

Dente	Tempo	IP	Placebo	Cariax	p-valor
44	0 dias	0 ou 1	9	8	1,000
		2 ou 3	0	1	
		Total	9	9	
	7 dias	0 ou 1	9	9	-*
		2 ou 3	0	0	
		Total	9	9	
	14 Dias	0 ou 1	9	9	-*
		2 ou 3	0	0	
		Total	9	9	
	21 dias	0 ou 1	9	9	-*
		2 ou 3	0	0	
		Total	9	9	
45	0 dias	0 ou 1	9	8	1,000
		2 ou 3	0	1	
		Total	9	9	
	7 dias	0 ou 1	9	9	-*
		2 ou 3	0	0	
		Total	9	9	
	14 Dias	0 ou 1	9	9	-*
		2 ou 3	0	0	
		Total	9	9	
	21 dias	0 ou 1	9	9	-*
		2 ou 3	0	0	
		Total	9	9	
46	0 dias	0 ou 1	8	7	1,000
		2 ou 3	1	2	
		Total	9	9	
	7 dias	0 ou 1	7	9	0,471
		2 ou 3	2	0	
		Total	9	9	
	14 Dias	0 ou 1	8	8	1,000
		2 ou 3	1	1	
		Total	9	9	
	21 dias	0 ou 1	8	8	1,000
		2 ou 3	1	1	
		Total	9	9	

*Não foi possível realizar o teste

Teste Exato De Fisher – variável IG

Dente	Tempo	IG	Placebo	Cariax	p-valor
44	0 dias	0 ou 1	9	9	-.*
		2 ou 3	0	0	
		Total	9	9	
	7 dias	0 ou 1	9	9	-.*
		2 ou 3	0	0	
		Total	9	9	
	14 Dias	0 ou 1	9	9	-.*
		2 ou 3	0	0	
		Total	9	9	
	21 dias	0 ou 1	9	9	-.*
		2 ou 3	0	0	
		Total	9	9	
45	0 dias	0 ou 1	9	9	-.*
		2 ou 3	0	0	
		Total	9	9	
	7 dias	0 ou 1	9	9	-.*
		2 ou 3	0	0	
		Total	9	9	
	14 Dias	0 ou 1	9	9	-.*
		2 ou 3	0	0	
		Total	9	9	
	21 dias	0 ou 1	9	9	-.*
		2 ou 3	0	0	
		Total	9	9	
46	0 dias	0 ou 1	8	9	1,000
		2 ou 3	1	0	
		Total	9	9	
	7 dias	0 ou 1	8	9	1,000
		2 ou 3	1	0	
		Total	9	9	
	14 Dias	0 ou 1	8	8	1,000
		2 ou 3	1	1	
		Total	9	9	
	21 dias	0 ou 1	8	9	1,000
		2 ou 3	1	0	
		Total	9	9	

*Não foi possível realizar o teste

Teste de Mann-Whitney – PCS versus *Pg*

Dente	Tempo	Positividade	n	Média	Desvio Padrão	Mann-Whitney	p-valor
44	0 Dias	Negativo	11	1,55	0,69	36,00	0,797
		Positivo	7	1,43	0,53		
	7 Dias	Negativo	11	1,64	0,67	25,00	0,364
		Positivo	6	1,33	0,52		
	14 Dias	Negativo	12	1,67	0,65	20,50	0,098
		Positivo	6	1,17	0,41		
	21 Dias	Negativo	10	1,40	0,52	34,00	0,544
		Positivo	8	1,63	0,74		
45	0 Dias	Negativo	10	1,40	0,52	31,00	0,638
		Positivo	7	1,29	0,49		
	7 Dias	Negativo	9	1,33	0,50	34,50	0,862
		Positivo	8	1,38	0,52		
	14 Dias	Negativo	9	1,44	0,53	31,50	0,331
		Positivo	9	1,22	0,44		
	21 Dias	Negativo	11	1,27	0,47	38,00	0,954
		Positivo	7	1,29	0,49		
46	0 Dias	Negativo	11	1,91	1,14	34,00	0,647
		Positivo	7	3,29	4,31		
	7 Dias	Negativo	9	1,89	1,27	32,00	0,399
		Positivo	9	3,00	3,77		
	14 Dias	Negativo	8	3,13	4,02	24,50	0,386
		Positivo	8	1,88	1,36		
	21 Dias	Negativo	11	3,09	3,45	20,50	0,067
		Positivo	7	1,43	0,53		

Teste Exato de Fisher – creme dental e positividade para o periodontopatógeno
Porphyromonas gingivalis (Pg)/ Dente 44

Tempo	Positividade	Creme Dental		p-valor
		Placebo	Cariax	
0 Dias	Negativo	6	5	1,000
	Positivo	3	4	
	Total	9	9	
7 Dias	Negativo	4	7	0,131
	Positivo	5	1	
	Total	9	8	
14 Dias	Negativo	5	7	0,620
	Positivo	4	2	
	Total	9	9	
21 Dias	Negativo	5	5	1,000
	Positivo	4	4	
	Total	9	9	

Teste Exato de Fisher – creme dental e positividade para o periodontopatógeno
Porphyromonas gingivalis (Pg)/Dente 45

Tempo	Positividade	Creme Dental		p-valor
		Placebo	Cariax	
0 Dias	Negativo	6	4	0,637
	Positivo	3	4	
	Total	9	8	
7 Dias	Negativo	5	4	0,637
	Positivo	3	5	
	Total	8	9	
14 Dias	Negativo	3	6	0,347
	Positivo	6	3	
	Total	9	9	
21 Dias	Negativo	7	4	0,335
	Positivo	2	5	
	Total	9	9	

Teste Exato de Fisher – creme dental e positividade para o periodontopatógeno
Porphyromonas gingivalis (Pg)/ Dente 46

Tempo	Positividade	Creme Dental		p-valor
		Placebo	Cariax	
0 Dias	Negativo	5	6	1,000
	Positivo	4	3	
	Total	9	9	
7 Dias	Negativo	3	6	0,347
	Positivo	6	3	
	Total	9	9	
14 Dias	Negativo	4	4	1,000
	Positivo	4	4	
	Total	8	8	
21 Dias	Negativo	5	6	1,000
	Positivo	4	3	
	Total	9	9	

Associação entre a positividade de *P.gingivalis* e o Índice de Placa / IP.

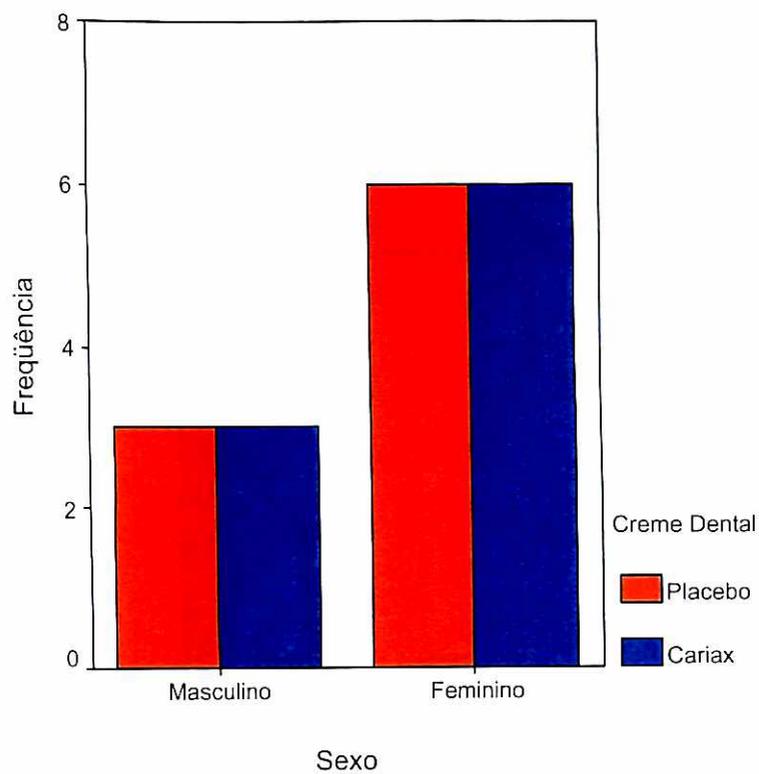
Dente	Tempo	IP	Positividade		p-valor
			Negativo	Positivo	
44	0 Dias	0 ou 1	11	6	0,389
		2 ou 3	0	1	
		Total	11	7	
	7 Dias	0 ou 1	11	6	-*
		2 ou 3	0	0	
		Total	11	6	
	14 Dias	0 ou 1	12	6	-*
		2 ou 3	0	0	
		Total	12	6	
	21 Dias	0 ou 1	10	8	-*
		2 ou 3	0	0	
		Total	10	8	
45	0 Dias	0 ou 1	10	6	0,412
		2 ou 3	0	1	
		Total	10	7	
	7 Dias	0 ou 1	9	8	-*
		2 ou 3	0	0	
		Total	9	8	
	14 Dias	0 ou 1	9	9	-*
		2 ou 3	0	0	
		Total	9	9	
	21 Dias	0 ou 1	11	7	-*
		2 ou 3	0	0	
		Total	11	7	
46	0 Dias	0 ou 1	9	6	1,000
		2 ou 3	2	1	
		Total	11	7	
	7 Dias	0 ou 1	8	8	1,000
		2 ou 3	1	1	
		Total	9	9	
	14 Dias	0 ou 1	6	8	0,467
		2 ou 3	2	0	
		Total	8	8	
	21 Dias	0 ou 1	10	6	1,000
		2 ou 3	1	1	
		Total	11	7	

* Não foi possível realizar o Teste

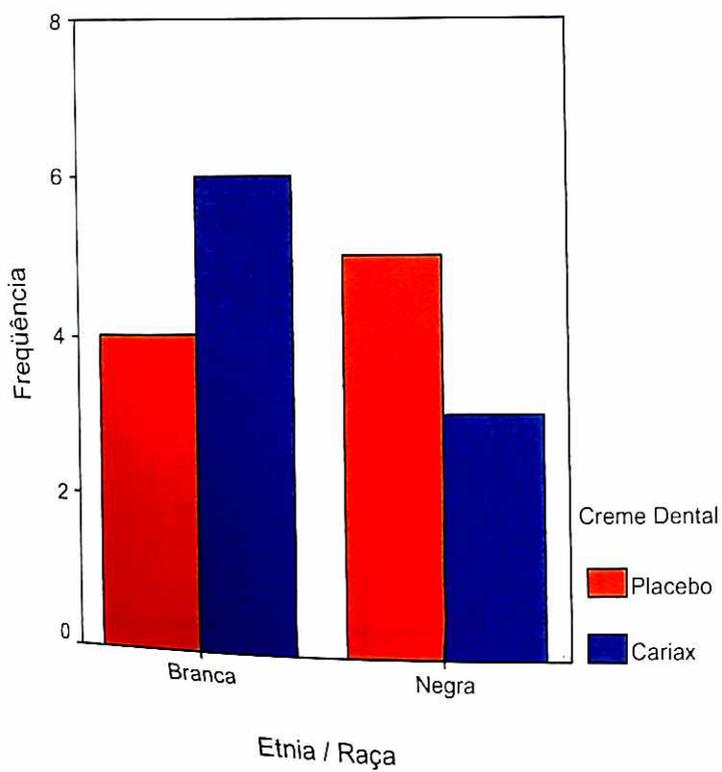
Associação entre a positividade de *P.gingivalis* e o Índice Gengival/IG.

Dente	Tempo	IG	Positividade		p-valor
			Negativo	Positivo	
44	0 Dias	0 ou 1	11	7	-*
		2 ou 3	0	0	
		Total	11	7	
	7 Dias	0 ou 1	11	6	-*
		2 ou 3	0	0	
		Total	11	6	
	14 Dias	0 ou 1	12	6	-*
		2 ou 3	0	0	
		Total	12	6	
	21 Dias	0 ou 1	10	8	-*
		2 ou 3	0	0	
		Total	10	8	
45	0 Dias	0 ou 1	10	7	-*
		2 ou 3	0	0	
		Total	10	7	
	7 Dias	0 ou 1	9	8	-*
		2 ou 3	0	0	
		Total	9	8	
	14 Dias	0 ou 1	9	9	-*
		2 ou 3	0	0	
		Total	9	9	
	21 Dias	0 ou 1	11	7	-*
		2 ou 3	0	0	
		Total	11	7	
46	0 Dias	0 ou 1	11	6	0,389
		2 ou 3	0	1	
		Total	11	7	
	7 Dias	0 ou 1	9	8	1,000
		2 ou 3	0	1	
		Total	9	9	
	14 Dias	0 ou 1	6	8	0,467
		2 ou 3	2	0	
		Total	8	8	
	21 Dias	0 ou 1	10	7	1,000
		2 ou 3	1	0	
		Total	11	7	

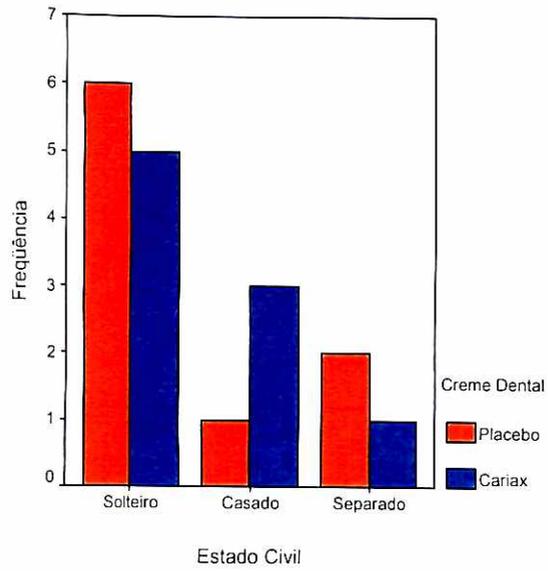
* Não foi possível realizar o Teste



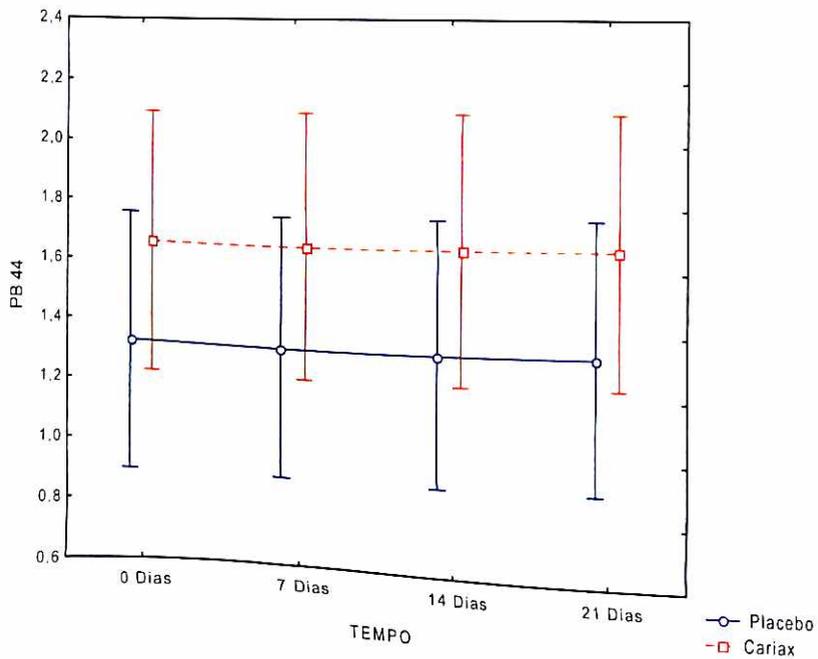
Frequência de indivíduos associados ao Sexo e Creme Dental



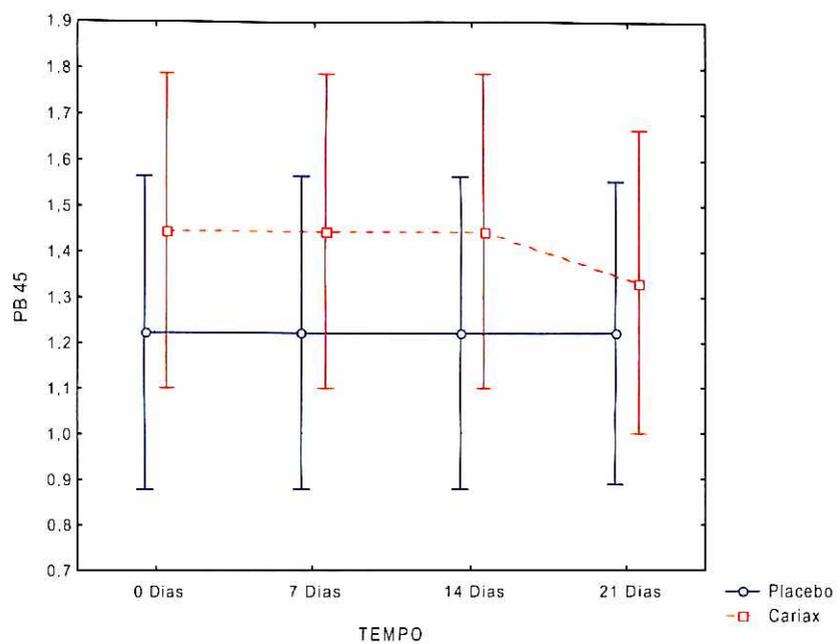
Frequência de indivíduos associados a Etnia / Raça e Creme Dental



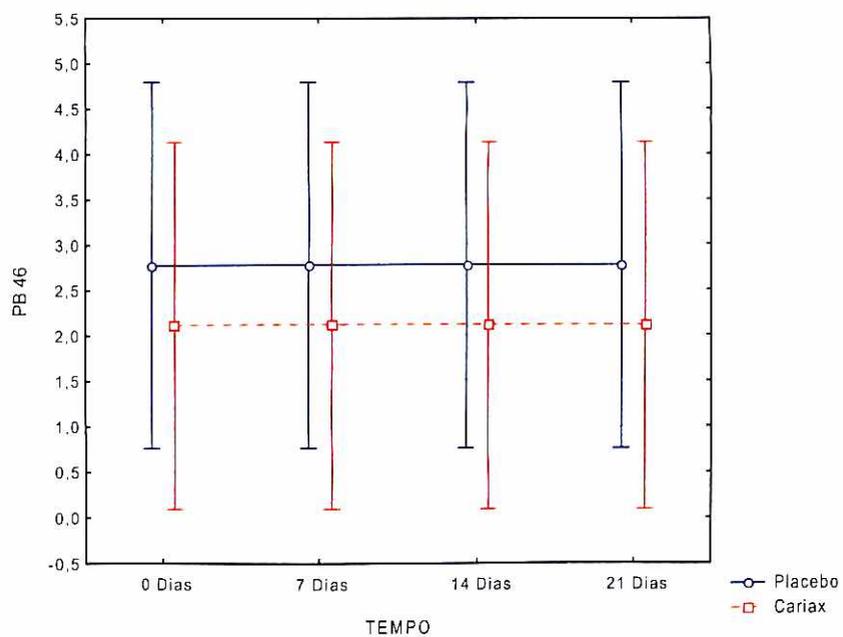
Freqüência de indivíduos associados ao Estado Civil e Creme Dental



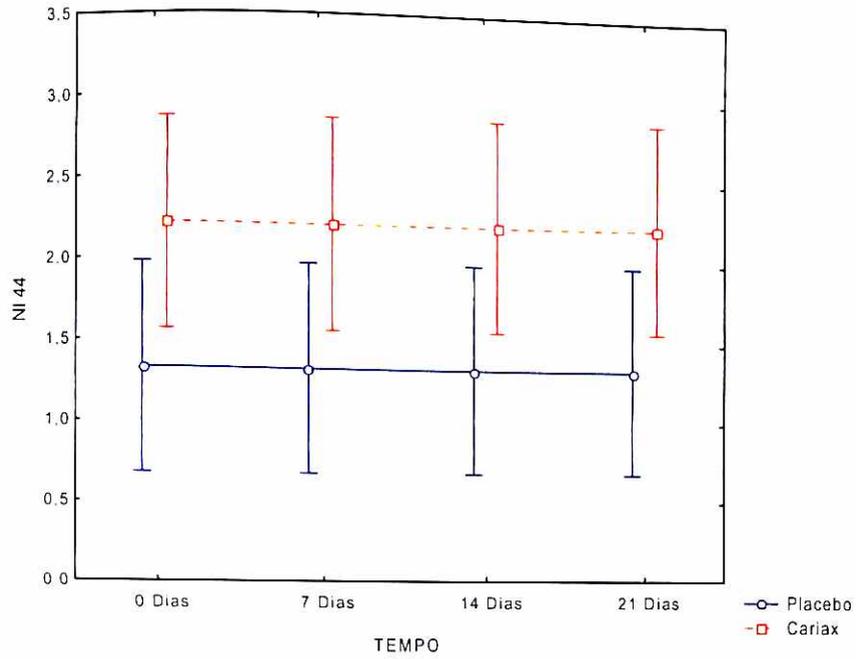
Média e Intervalo de 95% de Confiança – PCS 44



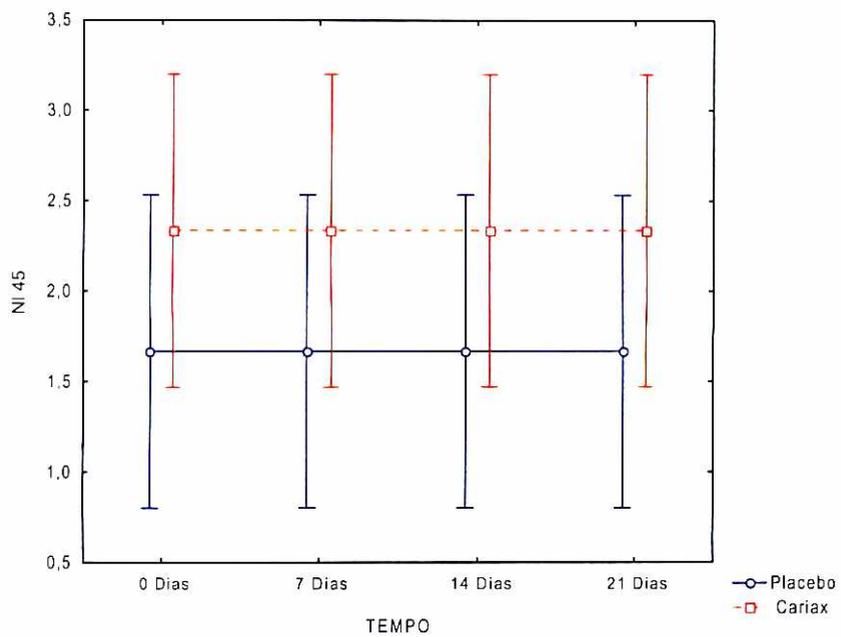
Média e Intervalo de 95% de Confiança – PCS 45



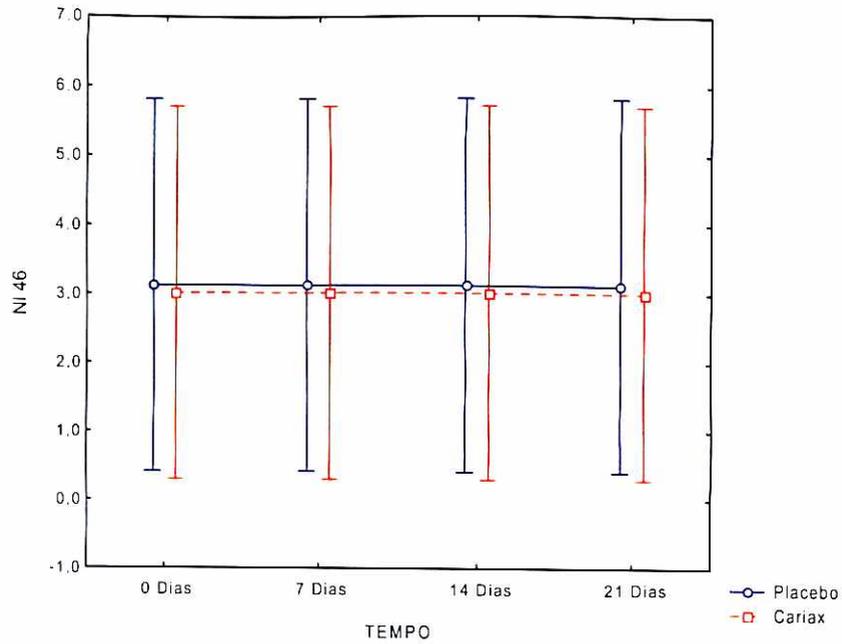
Média e Intervalo de 95% de Confiança – PCS 46



Média e Intervalo de 95% de Confiança –NIC 44



. Média e Intervalo de 95% de Confiança – NIC 45



. Média e Intervalo de 95% de Confiança – NIC 46

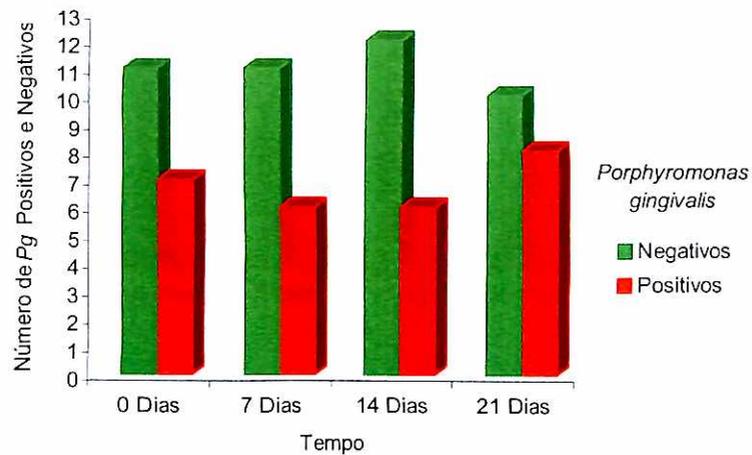


Gráfico de Barras para o Periodontopatógeno *Porphyromonas gingivalis* (Pg) –
Dente 44

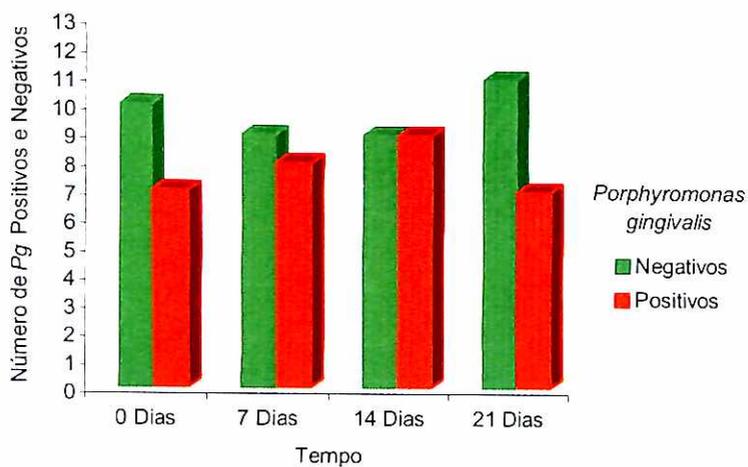


Gráfico de Barras para a Positividade de Periodontopatógeno *Porphyromonas gingivalis* (Pg) – Dente 45

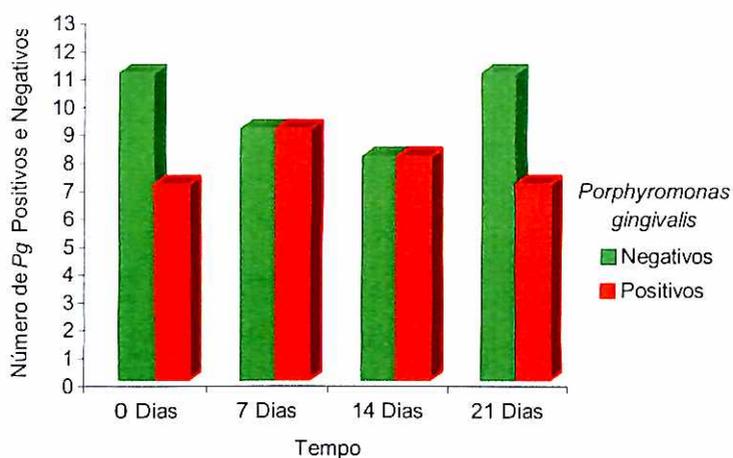


Gráfico de Barras para a Positividade de Periodontopatógeno *Porphyromonas gingivalis* (Pg) – Dente 46