



UNIVERSIDADE LUTERANA DO BRASIL
CURSO DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
NÍVEL: MESTRADO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: PERIODONTIA

**AVALIAÇÃO CLÍNICA DA CLOREXIDINA SOBRE O BIOFILME
SUPRAGENGIVAL FORMADO EM UM MODELO DE GENGIVITE
EXPERIMENTAL EM HUMANOS**

FABRICIO BATISTIN ZANATTA

CANOAS - RS
2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

FABRICIO BATISTIN ZANATTA

**AVALIAÇÃO CLÍNICA DA CLOREXIDINA SOBRE O BIOFILME
SUPRAGENGIVAL FORMADO EM UM MODELO DE GENGIVITE
EXPERIMENTAL EM HUMANOS**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Odontologia do curso
de Odontologia da Universidade Luterana do
Brasil como requisito final para obtenção
do título de mestre em Odontologia, área
de concentração Periodontia

Linha de pesquisa: Epidemiologia e Etiopatogenia das
Doenças e Disfunções do Sistema Estomatognático

Orientador: Prof. Dr. Cassiano Kuchenbecker Rösing

Canoas – RS
2007

Z27a

Zanatta, Fabricio Batistin

Avaliação clínica da clorexidina sobre o biofilme supragengival formado em um modelo de gengivite experimental em humanos / Fabricio Batistin Zanatta; orientador Cassiano Kuchenbecker Rösing. – Canoas: O Autor, 2007.

102 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Luterana do Brasil, 2007

1. Odontologia 2. Periodontia 3. Clorexidina 4. Placa dentária I. Rösing, Cassiano Kuchenbecker, orientador II. Título

CDU 616.314

Ficha catalográfica elaborada por Cristiane Silva Teixeira CRB – 10/1501

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Guido e Tereza que sempre me deram todo o suporte necessário, me orientando, estimulando e sendo exemplos de esforço, dedicação e responsabilidade. Sem vocês eu nunca teria chegado até aqui.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

A DEUS, pela vida, pela saúde e por todas as oportunidades que colocou em minha
vida.

AGRADECIMENTOS

À minha família, meus pais e meus manos Luciana e Gustavo, por terem acreditado em mim. Não tenho palavras para agradecer a compreensão, o amor e a ajuda em todas as horas da minha vida. Obrigado por tudo!

Ao meu cunhado e amigo Jamal, por todo o estímulo, apoio, experiência e orientação vivenciadas. Seu profissionalismo sempre me serviu de exemplo e incentivo, despertando a paixão pela periodontia, sem os quais não teria chegado até aqui.

A minha namorada Raquel, por todo o amor, paciência e compreensão que teve nestes últimos anos em que estive afastado na busca de aperfeiçoamento profissional, bem como por toda a contribuição que deste para a realização desta pesquisa.

Ao meu professor orientador, Prof. Dr. Cassiano K. Rösing, pela fundamental orientação, a qual tornou possível a realização deste trabalho, desde o surgimento da idéia até sua conclusão. Obrigado também por todo o conhecimento compartilhado ao longo deste curso de mestrado e pelo exemplo de seriedade e dedicação que norteia sua conduta como professor e pesquisador.

A prof. Dra. Sabrina Gomes, pelo conhecimento compartilhado nas clínicas e seminários, bem como por toda a compreensão nos momentos que mais precisei.

Aos antigos professores do Mestrado, Dr. Geraldo A. Chiappinoto e Dr. Rui V. Oppermann, pelos conhecimentos transmitidos e exemplos de profissionalismo.

Aos demais professores deste programa de pós-graduação que contribuíram de uma forma ou de outra com a minha formação.

Aos professores da especialização de periodontia da ULBRA, em especial a Profª. Maria Teresa Fasolo e Prof. Dr. Flavio Pillon, por toda a amizade e pelos vários momentos de descontração.

Aos meus colegas e amigos de mestrado, Carol, Gili e Fernanda, pela amizade, ajuda e pelos momentos de convivência que tivemos juntos. Em especial a Carol, pelas muitas caronas que me deu.

Ao amigo Tiago Fiorini, pela amizade, incentivo e acolhimento ao longo deste curso, sem os quais teria sido muito mais difícil ter chegado até aqui.

Ao primo Raphael e tios José e Maria da Graça Ortigara, por todo o acolhimento durante o tempo que estive em Porto Alegre me proporcionando amor e carinho de família.

Ao amigo Prof. Carlos Heitor, pela amizade, incentivo e ajuda que me proporcionou.

Aos voluntários que participaram da pesquisa, muito obrigado pela disposição, compreensão e seriedade com que aderiram na pesquisa. Vocês tornaram possível a realização deste trabalho.

Ao prof. Dr. Cristiano Susin, pela análise estatística deste trabalho e esclarecimentos proporcionados.

Ao laboratório Daudt, divisão Odontis, por ter cedido toda a clorexidina que foi utilizada nesta pesquisa.

À disciplina de Periodontia da UFRGS, pelo empréstimo do Periotron para que parte desta pesquisa fosse realizada. Agradeço também ao curso de Odontologia

desta instituição por ter cedido espaço para avaliação de alguns voluntários da pesquisa.

À Policlínica Militar de Porto Alegre, por ter cedido espaço para que pudesse ter avaliado alguns voluntários nas dependências da mesma.

Ao Centro Universitário Franciscano e Universidade Federal de Santa Maria, particularmente aos respectivos coordenadores dos cursos de Odontologia, meus agradecimentos pelo apoio e por terem facilitado a conjugação dos horários do Mestrado com a docência.

EPÍGRAFE

*A adversidade desperta em nós
capacidades que, em circunstâncias
favoráveis, teriam ficado adormecidas.*

(Horácio)

RESUMO

Definição do problema: A clorexidina tem sido considerada o agente anti-palca e anti-gengivite, utilizado na forma de colutório, padrão-ouro na odontologia. Recentemente, estudos *in vitro* mostraram uma limitada ação antibacteriana sobre biofilmes. Entretanto, evidências *in vivo* em superfícies com biofilme formado são escassas. O objetivo deste estudo foi comparar a ação anti-placa, anti-gengivite e efeitos adversos da clorexidina em superfícies dentárias com presença e ausência prévia de biofilme.

Materiais e métodos: Participaram 20 voluntários desse ensaio clínico randomizado, cego, com delineamento de boca dividida. Os voluntários abandonaram todas as medidas de higiene bucal por 96 horas. Após, 2 quadrantes foram randomicamente selecionados para a remoção mecânica do biofilme e os outros 2 não foi realizada intervenção. Após, começou-se o período bochechos com clorexidina 0,12% (NOPLAK®) por 21 dias, permanecendo na ausência de controle mecânico. Foram avaliados índice de placa de Quigey & Hein, índice gengival, fluido gengival, índice de manchamento e a presença de cálculo.

Resultados: Comparações intergrupos mostraram quantidades estatisticamente maiores de placa nas superfícies com placa presente quando comparadas com as superfícies sem placa. A variação da resposta inflamatória entre os diferentes tempos experimentais revelou que as superfícies com placa presente mostraram variações do índice gengival maiores que as superfícies sem placa (0.21 ± 0.02 para 0.93 ± 0.03 versus 0.18 ± 0.01 para 0.52 ± 0.03) bem como o volume de fluido gengival (48.09 para $94.28 \mu\text{l}$ versus 46.94 para $64.99 \mu\text{l}$). As comparações de intergrupos também mostraram médias estatisticamente maiores de severidade e extensão de manchamento bem como de presença de cálculo nas superfícies com placa presente comparadas às superfícies sem placa.

Conclusão: Conclui-se que a clorexidina 0.12% apresenta menor efeito anti-placa e anti-gengivite em superfícies com biofilme presente. Ainda, os efeitos adversos de formação de cálculo e manchamento são maiores em superfícies com placa. Estes resultados evidenciam a necessidade de remoção do biofilme supragengival antes do uso da clorexidina 0.12%.

ABSTRACT

Palavras chave: Clorexidina; gengivite; anti-placa; placa dentária; efeitos adversos.

Statement of the problem: Chlorhexidine has proven antiplaque and antigingivitis effect superior to other available agents. Recently, *in vitro* studies showed a limited antibacterial effect on biofilms. However *in vivo* evidences of this effect on biofilm-covered surfaces are scarce. The aim of this study was to compare the antiplaque, antigingivitis and adverse effects of chlorhexidine in previously plaque-covered and plaque free surfaces.

Materials and methods: 20 volunteers participated in this randomized, blind, split-mouth clinical trial. Subjects abandoned all oral hygiene methods for 96 hours. Following, 2 quadrants were randomly assigned to plaque removal and in the other 2 no intervention took place. After, a period of 0.12% chlorhexidine rinsing (NOPLAK®) took place during 21 days, without any mechanical plaque control. Quigley & Hein Plaque Index, Gingival Index, gingival fluid, staining and presence of calculus were evaluated.

Results: Intergroup comparisons showed statistically higher amounts of plaque in previously plaque-covered surfaces as compared to plaque-free surfaces. Variation in inflammatory response at different experimental periods revealed that previously plaque-covered surfaces presented higher variations in Gingival Index than plaque-free surfaces (0.21 ± 0.02 to 0.93 ± 0.03 versus 0.18 ± 0.01 to 0.52 ± 0.03) as well as in gingival fluid volume (48.09 to 94.28 μ l versus 46.94 to 64.99 μ l). Intergroup comparisons also demonstrated statistically higher means of severity and extension of staining, as well as calculus presence in previously plaque-covered surfaces as compared to plaque-free surfaces.

Conclusion: It is concluded that 0.12% chlorhexidine has lower antiplaque and antigingivitis effect in previously plaque-covered surfaces. Hence, the adverse effects of calculus formation and staining are greater in previously plaque-covered surfaces. These results suggest the necessity of supragingival biofilm removal prior to the use of 0.12% chlorhexidine.

KEY WORDS: Clorhexidine; gingivitis; antiplaque; dental plaque; adverse effects.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	4
AGRADECIMENTO ESPECIAL.....	5
AGRADECIMENTOS.....	6
EPÍGRAFE.....	9
RESUMO.....	10
ABSTRAT.....	11
LISTA DE FIGURAS.....	12
LISTA DE TABELAS.....	13
1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
2.1 BIOFILME SUPRAGENGIVAL: UM ORGANISMO MULTICELULAR.....	18
2.2 DESEQUILÍBRIO DO PROCESSO SAÚDE-DOENÇA PERIODONTAL.....	22
2.3 A CLOREXIDINA.....	23
2.4 AÇÃO DA CLOREXIDINA NO BIOFILME.....	27
2.5 EFEITOS ADVERSOS PRODUZIDOS PELA CLOREXIDINA.....	30
3. PROPOSIÇÃO.....	33
4. ARTIGO 1.....	35
5. ARTIGO 2.....	61
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	83
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85
8. APÊNDICES.....	94
8.1 FICHA DE RANDOMIZAÇÃO.....	95
8.2 FICHA DO EXAME DO ÍNDICE DE PLACA, ÍNDICE GENGIVAL, CÁLCULO E FLUIDO.....	96
8.3 FICHA DO ÍNDICE DE MANCHAMENTO.....	97
8.4 QUESTIONÁRIO DA SAÚDE.....	98
8.5 REAÇÕES ADVERSAS AO PRODUTO.....	99
8.6 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	100
8.7 APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA.....	101

LISTA DE FIGURAS

IDENTIFICAÇÃO DA FIGURA	PÁGINA
Figura 1 – Desenho experimental dos dados referentes aos índices de placa, gengival e fluido.	43
Figura 2 – Média do índice gengival das superfícies desplacadas e não-desplacadas nos dias 0 e 25.	47
Figura 3 – Freqüência (percentagem) de sítios com índice gengival escore=2 nas superfícies desplacadas e não-desplacadas nos dias 0 e 25.	48
Figura 4 – Média do volume de fluido gengival nas superfícies desplacadas e não-desplacadas nos dias 0 e 25.	49
Figura 5 – Desenho dos escores do índice de manchamento de Lobene modificado por Macpherson	68
Figura 6 – Desenho experimental dos dados referentes a cálculo e manchamento	69
Figura 7 – Média da intensidade de manchamento nas superfícies desplacadas e não-desplacadas ao longo do período experimental	72
Figura 8 – Freqüência (percentagem) dos escores da extensão de manchamento nas superfícies desplacadas e não-desplacadas no dia 25.	73
Figura 9 –Frequência (percentagem) dos sítios com presença de cálculo nas superfícies desplacadas e não-desplacadas ao longo do período experimental.	74

LISTA DE TABELAS

IDENTIFICAÇÃO DA TABELA	PÁGINA
Tabela 1 – Média do índice de placa de Quigley & Hein, Turesky das superfícies deslocadas e não-deslocadas ao longo do período experimental.	46
Tabela 2 – Média do índice de cálculo das superfícies deslocadas e não-deslocadas ao longo do período experimental	73

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O equilíbrio do processo saúde-doença periodontal é atingido com um adequado controle do biofilme supra e subgengival. Dentre os fatores que podem influenciar neste equilíbrio destacam-se a exposição a fatores de risco e hábitos de controle de placa (ALBANDAR, 2002). Dentre eles, especialmente o controle diário do biofilme assume um papel de destaque na prevenção de estabelecimento ou recorrência de doença periodontal (SCHATZLE et al., 2003; 2004; ALXELSSON, LINDHE e LANG, 2004). Ainda, fatores relacionados ao paciente como habilidade, motivação e seleção de adequados instrumentos para o controle do biofilme irão nortear a qualidade da higienização. (RODRIGUES e SERPA, 2001; RAPP, GARCIA e CARDOSO, 2001).

Em algumas situações temporárias e/ou permanentes o controle mecânico do biofilme pode estar comprometido. Nestes casos, pode-se lançar mão de meios de controle químico do biofilme supragengival, que poderão ser coadjuvantes ou substitutos ao controle mecânico (RÖSING, MALTZ e OPPERMANN, 2005). Na indicação de um agente químico que substitua o controle mecânico, há necessidade de emprego de uma substância que apresente propriedades que a coloque em papel de destaque frente aos demais agentes químicos (PILLON, 2001). Neste sentido, a clorexidina apresenta propriedades que a coloca em papel de destaque de efetividade anti-placa e anti-gengivite frente aos demais agentes químicos, podendo ser utilizada, com segurança, em diversas situações clínicas (JONES, 1997). Por este motivo, pesquisas na temática da clorexidina são interessantes pois apresentam uma variada extração e relevância clínica.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. BIOFILME SUPRAGENGIVAL: UM ORGANISMO MULTICELULAR

O ser humano tem em sua estrutura inúmeras bactérias que estão, na maior parte do tempo, em equilíbrio com o seu hospedeiro. Esta relação benéfica é simbiótica para ambas as partes, sendo claramente observada no desenvolvimento da fisiologia, nutrição e defesa do indivíduo (RÖSING et al, 2005).

O fato de não haver renovação na superfície dental cria condições para o estabelecimento de um biofilme bacteriano (FERJESKOV e THYLSTRUP, 1994). Assim, a dinâmica do ecossistema bucal revela que grupos de bactérias se aderem naturalmente às superfícies dos dentes e se medidas mecânicas e/ou químicas forem empregadas corretamente, impedindo o acúmulo e organização destas bactérias na superfície dental, o controle desta placa será atingido. No entanto, falhas nestas medidas podem levar a formação de um biofilme bacteriano patogênico podendo acarretar um desequilíbrio no processo saúde-doença nos tecidos moles e duros (CURY, 1999; OPPERMANN e RÖSING, 1999).

As duas doenças periodontais mais prevalentes e extensivamente investigadas são a gengivite induzida por placa, uma condição reversível, e a periodontite crônica, uma condição com danos irreversíveis que pode levar à perda dentária. Ambas são condições inflamatórias crônicas de natureza infeciosa (KINANE e ATTSTRÖM, 2005; ARMITAGE et al, 1999). De fato, o conhecimento sobre o papel dos microrganismos no desenvolvimento da gengivite e periodontite aumentou drasticamente após o reconhecimento da placa bacteriana como o fator etiológico primário destas condições (LÖE, THEILADE e JENSEN, 1965; LINDHE, HAMP e LÖE, 1973).

O conceito de biofilme foi dado a comunidades bacterianas que se estabelecem em ambientes úmidos como rochas existentes em mares e rios, cascos de barcos, interior de tubulações, dentre outros (COSTERTON et al, 1995). Assim, a placa bacteriana entendida como um biofilme traz o conceito de que as bactérias orais não se comportam como uma entidade bacteriana isolada e sim como uma ou mais comunidades de microrganismos agrupadas em uma matriz extracelular de polímeros de origem bacteriana e do hospedeiro (MARSH, 2004; 2005). Esta organização é espacialmente estruturada a partir de interações físicas, metabólicas e moleculares entre as bactérias, sendo esta integração essencial para a adesão, crescimento e sobrevivência das células bacterianas. Assim, organizando-se num biofilme, se torna possível a colonização e o crescimento bacteriano em inúmeras estruturas duras como dentes, restaurações, próteses e implantes (SOCRANKY e HAFFAJEE, 2002).

Imediatamente após a limpeza de uma superfície dura na cavidade oral, macromoléculas hidrofóbicas são adsorvidas pelas superfícies, formando um filme condicionante denominado película adquirida (LEACH e SAXTON, 1966). Esta é rica em proteínas e glicoproteínas salivares e sua formação altera a carga e a energia livre de superfície do esmalte, aumentando assim a eficiência da adesão bacteriana. A colonização primária da superfície dos dentes parece ser governada por bactérias que possuem adesinas em suas superfícies, possibilitando uma interação direta com receptores na película. Análises microbiológicas revelam que esta colonização primária se dá predominantemente por cocos e bastonetes gram-positivos, envolvendo bactérias do complexo amarelo, verde e roxo de Socranky e Haffajee, com predominância das espécies de *Actinomyces* e *Streptococcus*. Receptores de superfície nos cocos e bastonetes gram-positivos permitem a aderência subsequente de microrganismos gram-negativos que possuem pouca capacidade de adesão diretamente à película. Assim, com o passar das horas observa-se a co-agregação de cocos e bastonetes gram-negativos, fusobactérias, filamentos e finalmente espiroquetas. Com o envelhecimento e aumento da massa bacteriana ao longo do tempo, há um aumento da heterogeneidade da mesma com um aumento

proporcional de bactérias do complexo vermelho e laranja (MARSH, 2005; BERNIMOULIN, 2003; SOCRANSKY e HAFFAJEE, 2005). O fato de não ocorrer renovação na superfície dental cria condições para o estabelecimento de um biofilme bacteriano que demonstra claramente desenvolver uma dinâmica biomolecular que vai se complexificando com o tempo (FERJESKOV e THYLSTRUP, 1994).

Técnicas recentes da análise do biofilme, como a microscopia a laser confocal, que permite a observação do biofilme *in situ* sem sua ruptura, impactaram a comunidade científica no entendimento do biofilme. Assim, observa-se uma complexa organização espacial e funcional destas bactérias, permeadas por canais de circulação que ligam a superfície do biofilme ao esmalte dental e possibilitam a difusão de nutrientes, oxigênio, remoção de células mortas, revelando um verdadeiro sistema de circulação primitiva (TOLKER-NIELSEN e MOLIN, 2000).

Investigações genéticas têm mostrado que as bactérias assim que se estruturam num biofilme realizam diversas modificações genéticas como, por exemplo, o caso da bactéria *Staphylococcus aureus* que uma vez no interior do biofilme passa a codificar os genes phosphoglycerato mutase, triosephosphato isomerase e álcool desidrogenase, permitindo então que ela realize os processos de glicólise e fermentação, possibilitando uma melhor adaptação no biofilme com provável carência de oxigênio. A transferência gênica também pode ser observada como, por exemplo, quando o plasmídeo de uma bactéria é transmitido para uma outra bactéria que não o contenha, recombinando-se com o material genético da bactéria receptora e, desta forma, tornando-a mais resistente. No biofilme, pode também ser observada uma notável comunicação interbacteriana que acontece tanto de maneira vertical como horizontal. Essa comunicação, denominada *Quorum Sensing*, acontece através de sinais que passam de célula para célula e desempenha um importante papel no agrupamento e desagrupamento de novas espécies. Assim, o biofilme seleciona novas bactérias para adesão, conforme sua necessidade, bem como expulsa ou não permite a fixação de espécies que não

ofereçam vantagem ao biofilme (XIE et al, 2000; GHIGO, 2001; DONLAN, 2002; MARCH, 2005).

As razões pelas quais as bactérias se estruturam num biofilme são óbvias, pois no biofilme elas adquirem inúmeras vantagens como maior proteção contra defesas do hospedeiro, substâncias tóxicas, antimicrobianos, maior capacidade de troca de nutrientes, possibilidade de viver em ambientes com diferentes potências de oxiredução bem como o desenvolvimento de uma maior diversidade de expressões genotípicas e fenotípicas modificando muitas propriedades de suas células como a adesão, motilidade, requisição nutricional, secreção de produtos e enzimas, dentre outros. Todas estas características permitem às células bacterianas se organizarem em uma comunidade e uma vez estruturadas como um biofilme potencializarem seus fatores de virulência bem como lidarem com condições estressantes adversas mais facilmente do que se vivessem em formas planctônicas (MARCH; 2004; 2005; SOCRANSKY e HAFFAJEE, 2002; 2005;).

Entendendo desta forma a organização microbiana, percebe-se a limitação da ação dos antimicrobianos tópicos e sistêmicos, utilizados como monoterapia no tratamento periodontal. Desta forma, seria necessária uma concentração antimicrobiana de 1000-1500 vezes maior da droga para atingir a concentração inibitória mínima do biofilme comparada a dosagem necessária para atingir as bactérias em suas formas planctônicas. Os possíveis mecanismos envolvidos na resistência do biofilme aos antimicrobianos podem ser atribuídos à mutações celulares, presença de canais de refluxo que expelem os antimicrobianos que venham a penetrar no biofilme, produção de enzimas que irão neutralizar o antimicrobiano, bem como pela própria dificuldade física do antimicrobiano se difundir na matriz de exopolímeros do biofilme, apresentando dificuldade de atingir as camadas celulares mais profundas (MARCH, 2005; 2004; SOCRANKY e HAFFAJEE, 2002; FUX et al, 2003; DONLAN, 2000).

2.2. DESEQUILÍBRIO DO PROCESSO SAÚDE-DOENÇA PERIODONTAL

O primeiro sinal clínico de desequilíbrio do processo saúde-doença periodontal é representado pelo desenvolvimento da gengivite clinicamente detectável. Esta é desencadeada pelo acúmulo do biofilme supragengival num período que varia de 10-21 dias, de acordo com variações interindividuais inerentes, e que o controle deste biofilme supragengival, independente de diferenças na suscetibilidade a desenvolver a gengivite, reequilibra o processo saúde-doença promovendo o restabelecimento da saúde gengival. Esta diferença interindividual pode ser atribuída a fatores sistêmicos ou locais, modulando de forma diferente a expressão da gengivite (LÖE, THEILADE e JENSEN, 1965; TATAKIS e TROMBELL, 2004; TROMBELL et al, 2004; TROMBELL et al, 2005). Ela está confinada aos tecidos de proteção do dente e apesar de não causar danos irreversíveis, deve ser tratada por estar associada a problemas estéticos e halitose (LEAO e SHEIHAM, 1995). Apesar da gengivite apresentar um valor preditivo baixo para o estabelecimento e/ou progressão da periodontite (LISTGARTEN, SCHIFTER e LASTER, 1985; BROWN e LÖE, 1993; SHEIHAM, 1997;), convém salientar que sua presença é um pré-requisito básico para o estabelecimento de um biofilme subgengival que é o componente desencadeador de uma periodontite (GOODSON, et al, 1982; OPPERMANN e RÖSING, 1999), fazendo-se necessário o seu tratamento.

Estudos que acompanharam a formação do biofilme supragengival, seja em dentes extraídos ou através de observações clínicas, sugerem existir uma zona livre de placa (ZLP), localizada entre o bordo mais apical do depósito de placa supragengival e o início do periodonto marginal, e que se caracteriza por não ser corada pelo uso de reveladores. Weidlich, Lopes de Souza e Oppermann (2001) utilizando análise microscópica de varredura observaram que a ZLP passou a ser invadida por placa apenas após 96 horas de acúmulo de placa, apesar de haver um crescimento da placa em extensão e espessura na direção incisal precocemente à colonização na ZLP. A colonização da ZLP foi acompanhada por uma resposta inflamatória gengival representada clinicamente por maior secreção de fluido

gengival e edema. Considerando que o biofilme subgengival é uma extensão do biofilme supragengival, parece que o edema gengival encobre o biofilme supragengival transformando-o em subgengival ao invés do biofilme supragengival proliferar em direção à zona livre de placa e invadir o ambiente subgengival.

Assim, o controle deste biofilme supragengival é essencial para a prevenção e o tratamento da gengivite (LÖE, THEILADE e JENSEN, 1965; THEILADE et al, 1966). Este controle pode ser realizado de forma mecânica, química ou pela combinação de ambos. Normalmente, este objetivo é alcançado através da remoção mecânica do biofilme realizada pelo paciente, por meio de escovação e limpeza interdental (LÖVDAL et al, 1961; AXELSSON e LINDHE, 1981; HALLA Jr. , 1999; CACHAPUZ, 2001; GOMES et al., 2006). Contudo, a manutenção da saúde periodontal está intimamente ligada à capacidade que o indivíduo tem de realizar os procedimentos de higiene bucal (AXELSSON e LINDHE, 1981), o que invariavelmente dependerá de fatores relacionados ao indivíduo como interesse, motivação, destreza e habilidade (RODRIGUES e SERPA, 2001). Em muitos casos, tais medidas são de difícil implementação e podem acabar por comprometer a manutenção da saúde periodontal, se outra abordagem não for estabelecida.

Portanto, o uso de agentes químicos para controle do biofilme é uma medida alternativa em alguns casos. Diversas substâncias já foram estudadas, dentre elas antibióticos, enzimas, íons metálicos e antissépticos de diferentes naturezas (FINE, 1995). Dentro eles, vem recebendo destaque o digluconato de clorexidina (ADDY, 1986).

2.3. A CLOREXIDINA

A clorexidina foi sintetizada nos anos 40 e introduzida no mercado em 1954 como um antisséptico para ferimentos na pele (DAVIES et al, 1954). Ela se caracteriza por ser um detergente catiônico, da classe das bisbiguanidas, disponível nas formas de acetato, hidrocloreto e digluconato, sendo este último, o sal mais comumente empregado em fórmulas e produtos. Ela possui um amplo-espectro de

ação, agindo sobre bactérias gram positivas, gram negativas, fungos, leveduras e vírus lipofílicos (TORTORA, FUNKE e CASE, 2000). Desta forma, ela foi testada primeiramente por Löe e Rindom Schiott (1970) no qual demonstraram que bochechos de uma solução de gluconato de clorexidina 0,2%, realizados duas vezes por dia, se mostraram eficazes em diminuir o crescimento do biofilme bacteriano e o desenvolvimento de gengivite clinicamente detectáveis por um período de 21 dias. Neste experimento foram recrutados 22 estudantes de odontologia que tiveram seus dentes deplacados e polidos e não apresentavam sinais clínicos de gengivite. No início do período experimental todas as medidas de higiene bucal foram abandonadas e, randomicamente, os participantes foram distribuídos em quatro grupos. Quatro estudantes bochecharam duas vezes por dia uma solução de gluconato de clorexidina 0,2% por 22 dias, oito sujeitos apenas uma vez por dia com a mesma solução por 40 dias, seis sujeitos utilizaram uma solução placebo por 22 dias, e seis receberam uma aplicação diária de uma solução de clorexidina a 2% por 15 dias. Os resultados expressos por índice de placa (IP) e índice gengival (IG) mostraram que a solução de clorexidina 0,2% preveniu a formação de placa (média de IP 0,05) e o desenvolvimento de gengivite (média de IG 0,05). Já a solução a 2% preveniu completamente a formação de placa enquanto que a solução 0,2% realizada uma vez ao dia não foi eficaz em reduzir a placa e a gengivite em todas as áreas da dentição. A solução placebo resultou nos maiores escores de IP e IG sendo a média do grupo de 1,73 e 0,62 respectivamente. Vale lembrar que o examinador não estava nem cego, nem calibrado, o que nos dias atuais diminuiria o poder de evidência deste estudo.

Após um bochecho com solução de clorexidina, aproximadamente 30% da droga fica retida na boca. Devido a sua natureza catiônica, ela adsorve-se a compostos aniónicos como glicoproteínas salivares, radicais fosfatados e carboxílicos presentes no biofilme dental como bactérias e polissacarídeos extracelulares, película dental e macromoléculas presentes na mucosa oral (RÖLLA e MELSEN, 1975; GJERMO, BONESVOLL e RÖLLA, 1974; BONESVOLL et al, 1974; BONESVOLL, LOKKEN e ROLLA, 1974). O seu mecanismo de ação antibacteriana é explicado pelo fato de a molécula catiônica da clorexidina ser rapidamente atraída

pela carga negativa da superfície bacteriana, sendo adsorvida à membrana celular por interações eletrostáticas, provavelmente por ligações hidrofóbicas ou por pontes de hidrogênio, sendo esta adsorção concentração-dependente. Assim em dosagens elevadas ela causa precipitação e coagulação das proteínas citoplasmáticas e morte bacteriana e em doses mais baixas a integridade da membrana celular é alterada, resultando num extravasamento dos componentes bacterianos de baixo peso molecular (HJELJORD, RÖLLA, BONESVOLL, 1977; HUGO e LONGWORTH, 1964; RÖLLA e MELSEN, 1975). Além do mais, a clorexidina utilizada nas concentrações 0,12% e 0,2% é estável, não é tóxica aos tecidos, a absorção pela mucosa e pele é mínima, é bem tolerada quando administrada em animais via parenteral e intravenosa, parece não atravessar a barreira placentária e não provoca efeitos tóxicos colaterais sistêmicos com o uso prolongado bem como alterações na microbiota oral (DAVIES e HULL, 1973; CASE, 1977; RUSHTON, 1977; WINROW, 1973; LÖE et al, 1976).

A clorexidina apresenta uma substantividade, isto é, tempo de permanência ativa na cavidade bucal, de aproximadamente 12 horas, o que é explicada pela sua natureza dicatiónica. Assim, uma extremidade catiônica da molécula se prende à película, que apresenta carga negativa, e a outra extremidade catiônica fica livre para interagir com bactérias que buscam colonizar o dente. Desta forma, ela exercerá uma ação bactericida inicial imediatamente depois do bochecho combinada com uma ação bacteriostática prolongada. Esta hipótese foi testada por Bonesvoll e Gjermo (1978) que compararam a capacidade de retenção da clorexidina e de compostos quaternários de amônia, os quais compartilham a mesma carga positiva em sua molécula. A quantidade de composto quaternário de amônia retido na cavidade bucal inicialmente foi de 65% contra 32% de clorexidina, mostrando que num primeiro momento, a concentração salivar desses compostos foi maior do que a concentração de clorexidina. Por outro lado, esta concentração declinou mais rapidamente, uma vez que, após 4 horas da utilização das substâncias, a concentração de clorexidina era significativamente maior. A natureza monocatiónica desses compostos e dicatiónica da clorexidina foi então sugerida como plausibilidade biológica que

explicava a retenção mais prolongada dessa última apesar de apresentar menores quantidades retidas inicialmente.

Primeiramente acreditava-se que a ação da clorexidina se dava pela sua lenta desadsorção uma vez que estivesse ligada a grupos carboxílicos presentes na mucosa oral, sendo esta uma espécie de reservatório de clorexidina que serviria como fonte adicional da droga para a película e a placa dental (BONESVOLL et al, 1974, RÖLLA e MELSEN, 1975; HULL, 1980). No entanto, estudos posteriores mostraram que a sua ação parece ser condicionada apenas pela sua adsorção inicial à película dental, exercendo localmente sua ação bactericida e bacteriostática (JENKINS, ADDY e WADE, 1988; ADDY e MORAN, 1983). Cabe salientar que algumas substâncias químicas como o cálcio, detergentes aniónicos e flúor podem influenciar as ligações da clorexidina, reduzindo sua retenção e sua atividade antibacteriana (RÖLLA e MELSEN, 1975; BONESVOLL, 1977; BARKVOLL, RÖLLA e SVENDSEN, 1989). O pH bucal parece também exercer uma importante influência sobre a retenção da droga, sendo alcançado o melhor efeito quando o pH apresenta uma variação entre 6.4 a 9.0 (GJERMO, BONESVOLL e RÖLLA, 1974).

Portanto, já está bem sedimentada a vantagem clínica da clorexidina sobre os demais agentes antiplaca, o que a coloca como padrão ouro para controle químico de placa em odontologia (GJERMO, BAASTAD e RÖLLA, 1970; BRECX, 1997; NOIRI et al, 2003; HULL, 1980; JONES, 1997).

Há várias formas de utilização da clorexidina no ambiente supragengival como bochechos, dentifrícios, géis, sprays e palitos (FLÖTRA, 1973; PILLON, 1997). No entanto, a forma mais universalmente utilizada era através de bochechos de solução de 0,2% de clorexidina (CUMMING e LÖE, 1973). Estudos posteriores mostraram que diminuindo a concentração do produto e aumentando o volume bochechado da solução a quantidade de droga usada era praticamente a mesma e a efetividade antiplaca manteve-se significativamente semelhante com reduções do manchamento

dos dentes. Assim, a concentração a 0,12% com bochechos de 15 mls passou a ser empregada em larga escala. (SEGRETO et al, 1986, SMITH et al, 1995). O tempo de duração do bochecho recomendado é de 1 minuto nestas concentrações. Entretanto, observações recentes de Van Der Weijden et al, 2005 sugerem não haver diferenças estatisticamente significantes quanto à formação de placa bacteriana quando bochechados uma solução de clorexidina 0,2% por 15, 30 ou 60 segundos.

2.4. AÇÃO DA CLOREXIDINA NO BIOFILME

Existem várias maneiras de avaliar o efeito dos antimicrobianos na vitalidade bacteriana da placa dental como cultura, técnicas de fluorescência e hibridização *in situ*, microscopia a laser confocal, dentre outras. Esta última, por tornar possível a visualização do biofilme sem a sua ruptura estrutural natural permite observarmos de forma mais precisa o comportamento do biofilme após a exposição a antimicrobianos e estudarmos variações nos genomas microbianos, atividade gênica, dentre outros (PALMER e STERNBERG, 1999; MARSH, 2004).

Zaura-Arite, Van Marle e Ten Cate (2001) verificaram pela primeira vez o comportamento do biofilme oral após exposição a uma solução de clorexidina 0,2% utilizando a microscopia a laser confocal. Foram avaliados 6 indivíduos, saudáveis, divididos em leves formadores de placa e pesados formadores de placa que usaram discos de dentina bovina em um dispositivo *in situ* onde houve crescimento do biofilme sem que houvesse sua ruptura. Foram expostos a uma solução de clorexidina 0,2% os biofilmes que se formaram em 6, 24 e 48 horas. A análise estrutural do biofilme mostrou que à medida que decorriam as horas de exposição, maior foi a complexidade estrutural do biofilme. Assim, os biofilmes mostraram uma espessura média de 10, 27 e 34 µm para 6, 24 e 48 horas respectivamente. Apesar dos biofilmes terem sido expostos à apenas uma aplicação de clorexidina, e esta ter sido aplicada fora da boca (*ex vivo*), os autores concluíram que o biofilme de 6 horas em leves formadores de placa apresentou a mais baixa vitalidade bacteriana e, com o aumento das horas, as diferenças entre a vitalidade bacteriana desapareceram

entre os formadores de placa leves e pesados. A análise em camadas mostrou que a camada mais externa do biofilme apresentou estatisticamente menor vitalidade bacteriana que a camada mais interna tanto em 24 quanto em 48 horas, deixando clara a ineficácia da clorexidina nas camadas mais internas de biofilme com mais de 24 horas de formação.

Trabalho de metodologia semelhante foi desenvolvido por Auschill et al (2005) que verificaram em um dispositivo *in situ* a aplicação de uma solução de clorexidina 0,2%. Foram recrutados 7 voluntários que bochecharam soluções de fluoreto amino-estanoso (250 ppm), clorexidina 0,2% e água. Os bochechos foram iniciados após a colocação do dispositivo na boca e tiveram duração de 48 horas. Após este período, esperava-se 14 dias (wash-out) para começar o uso do outro produto, permitindo desta forma que todos os participantes usassem as três soluções. Os resultados analisados por microscopia a laser confocal mostraram que a vitalidade bacteriana foi reduzida em 64% quando comparados as soluções com à água, sem haver diferença estatisticamente significante entre a clorexidina e o fluoreto amino-estanhoso. No entanto, devido a metodologia usada neste trabalho, não se pode inferir a ação destas soluções sobre o biofilme já formado, devido as soluções terem sido usadas concomitantemente ao uso do dispositivo *in situ*.

Pratten, Barnett e Wilson (1998) em um trabalho e *in vitro*, avaliaram a eficácia da clorexidina sobre a vitalidade de bactérias agrupadas em biofilmes. Após a confecção de biofilmes compostos por bactérias coletadas na placa bacteriana dental, os autores expuseram estes biofilmes formados a soluções de 0,2% de clorexidina por 1 minuto, 5 minutos e 60 minutos. Os resultados mostraram que os biofilmes expostos a 1 e 5 minutos do antimicrobiano não apresentaram efeito significante na vitalidade bacteriana. No entanto, houve uma redução estatisticamente significante na contagem de células bacterianas vitais após 60 minutos de exposição ao produto. Desta forma, fica claro que a ação da clorexidina sobre o biofilme oral depende do tempo de exposição ao antimicrobiano e que o tempo usado rotineiramente na odontologia, isto é 1 minuto, se mostrou ineficaz.

Corbet et al. (1997) avaliaram o efeito da administração supervisionada de clorexidina sobre gengivite não tratada por um período de três meses em uma amostra de conveniência de uma indústria localizada na China. Foram recrutados 60 indivíduos e divididos em dois grupos: teste (clorexidina) e placebo. Apesar de não ser dada nenhuma instrução de higiene bucal, os indivíduos mantiveram seus hábitos de higiene e realizavam bochechos supervisionados das soluções. Os resultados mostraram que o grupo teste apresentou reduções estatisticamente significantes quanto ao índice gengival e sangramento à sondagem, sem, contudo, apresentar diferenças estatísticas no índice de placa quando foram comparados os dois grupos. Infelizmente através desta metodologia não se pode comparar a ação da clorexidina em superfícies com e sem placa dentro do mesmo indivíduo, já que os grupos utilizados eram em paralelo.

Brownstein et al. (1990) através de um modelo de boca dividida, analisaram a efetividade da clorexidina 0,12% utilizada sob a forma de bochechos em pacientes com gengivite presente. Foram utilizadas solução placebo para comparações. Ainda, todos os participantes receberam uma profilaxia prévia em apenas metade da boca antes do início do estudo. Entre os resultados encontrados pelos autores após dois meses de uso das soluções está o de que a clorexidina 0,12% reduziu significativamente a média do índice gengival, percentagem de sangramento gengival (Escore 2 do índice), bem como o sangramento à sondagem apenas nas superfícies deplacadas no início do estudo, mostrando a dificuldade de ação em superfícies com biofilme presente. É importante ressaltar que os sítios onde a deplacagem inicial não foi realizada não foram submetidos a nenhum acúmulo de placa prévio ao início do controle químico o que dificulta saber precisamente se havia biofilme formado em todas as superfícies que foram avaliadas.

Está bem sedimentada a ação da clorexidina na redução de formação do biofilme supragengival, prevenindo desta forma, o estabelecimento da gengivite. Neste prisma, inúmeros trabalhos já foram realizados e comprovaram tal efetividade,

demonstrando uma redução que varia, respectivamente, de aproximadamente 50-55% e 45% para biofilme supragengival e gengivite quando comparada a soluções controle (LÖE e RINDOM SCHIOTT, 1970; ADDY e MORAN, 1983; LÖE et al, 1976; SEGRETO et al, 1986). Da mesma forma, parece claro que a clorexidina não apresenta a mesma eficácia quando testada sobre um biofilme, face a todas as limitações dos antimicrobianos sobre bactérias estruturadas em biofilme. Entretanto, todos os trabalhos que avaliam clinicamente a ação da clorexidina em prevenir o desenvolvimento de gengivite utilizam na metodologia uma deplacagem inicial previamente ao início do período de uso da clorexidina. Tal metodologia, não identifica claramente a efetividade da clorexidina sobre um biofilme previamente formado, bem como se ela será capaz de impedir o desenvolvimento de gengivite, o que justifica a realização de pesquisa sobre essa temática. Desta forma, os resultados desta pesquisa contribuirão para uma melhor compreensão do efeito da clorexidina, na presença de placa bacteriana, sendo que estes resultados poderão ser extrapolados para situações clínicas comumente presentes no dia a dia dos dentistas.

2.5. EFEITOS ADVERSOS PRODUZIDOS PELA CLOREXIDINA

Infelizmente, o uso da clorexidina é limitado pelos efeitos adversos relacionados, como manchamento de dentes, restaurações, próteses e língua, alterações do paladar, principalmente para o sal, formação de cálculo supragengival e, raramente, tumefação reversível nos lábios ou glândulas parótidas, descamações na mucosa oral, urticária, dispinéia e choque anafilático (FLÖTRA et al, 1971; ADDY, 1979, 1982; MASAKI et al, 1989, CIANCIO, 1995). Dentre estes efeitos, o manchamento dental destaca-se como a principal queixa por parte dos pacientes (GJERMO, ALBANDAR e PREUS, 1994) sendo o principal fator limitante do uso da clorexidina por períodos prolongados.

O manchamento dental acomete entre 30-50% dos usuários de clorexidina (FLÖTRA, 1973; LÖE et al., 1976), sendo que sua maior ocorrência se dá no terço cervical da coroa dentária e nas áreas proximais (TANNIR e GOODMAN, 1994). Dentre os fatores que interferem na prevalência e severidade do manchamento, estão a concentração e o volume da clorexidina que está sendo usada. Assim, concentrações menores, em volumes maiores, a despeito de apresentarem eficácia e efetividade semelhantes (SEGRETO et al., 1986), mostraram causar menor manchamento dentário (CUMMING e LÖE, 1973).

Diversas hipóteses foram investigadas acerca dos mecanismos associados ao manchamento. Uma delas a clorexidina participaria como catalisadora das reações não-enzimáticas de acastanhamento (Reações de Maillard), na qual glicoproteínas presentes na película (80% proteínas e 20% de carbohidratos) participam como substratos para estas reações e sofrem uma série de reações de condensação e polimerização, levando a formação substâncias acastanhadas chamadas melanoidinas (SONJU 1975; ERIKSEN et al., 1985). A capacidade da clorexidina em promover desnaturação de proteínas e, na seqüência, estas promoverem o manchamento dental pela formação de sulfito férrico e estanhoso, compõem outra teoria do manchamento dentário decorrente da clorexidina (ERIKSEN et al. 1985). Corroborando com esta hipótese está a investigação de Ellingsen et al. 1982, que encontraram maiores concentrações de Ferro (F) e enxofre (S) na película adquirida dos dentes com manchas acastanhadas utilizando ratos como animais experimentais. Ainda, observações laboratoriais relataram que estas moléculas quando passaram para um estado mais oxidado (Sulfito para sulfato) eles geralmente tornaram-se brancos e mais solúveis, justificando assim a capacidade de descoloração de agentes oxidantes (NORDBO et al, 1982, 1983, 1984). Por fim, uma terceira hipótese, na qual a formação do manchamento dental se daria pela precipitação de cromógenos da dieta diretamente na superfície dental, tais como café, chá e vinho tinto, formando produtos coloridos (JENSEN, 1977; ADDY et al., 1979). Entretanto, estas duas últimas hipóteses levantadas apresentam, em parte,

mecanismos semelhantes na medida em que se encontra altas concentração de ferro (Fe) presente no vinho tinto. Assim, apesar do manchamento ainda permanecer um assunto ainda não completamente esgotado, a reação da clorexidina com produtos da dieta, especialmente cromógenos, parece ser a hipótese mais aceita e cientificamente comprovada tanto em trabalhos *in vitro* quanto *in vivo*.

É comprovado que a clorexidina apresenta um efeito anti-placa significativo. Partindo do pressuposto que o cálculo supragengival seja decorrente da placa supragengival que sofreu um processo de cristalização, uma maior formação de cálculo observada durante o uso da clorexidina não deixa de ser um efeito adverso intrigante. Alguns estudos de utilização prolongada de clorexidina encontraram maior formação de cálculo (LÖE et al. 1976, LANG et al. 1982, GROSSMAN et al. 1989), enquanto outros autores, em períodos mais curtos de observações, não observaram o mesmo efeito adverso. (LÖE et al. 1971, CANCRO et al. 1972). Dentre os locais mais prevalentes, destacam-se a face lingual dos incisivos inferiores e vestibular de dentes pôstero-superiores. Apesar do processo de mineralização não estar completamente entendido, parece que a maior formação de cálculo nestes locais se deve a localização dos ductos das glândulas parótidas e submandibular, ocorrendo nestes locais uma constante lavagem da saliva, resultando em baixas concentrações de sacarose e, facilitando assim, uma maior deposição de uréia proveniente da saliva que, na seqüência, promoverá a precipitação do fosfato de cálcio e a consequente cristalização da película adquirida dando início ao cálculo supragengival (DAWES e MACPHERSON 1993; DAVIES et al. 1997).

Apesar dos efeitos adversos em decorrência do uso da clorexidina terem sido fruto de repetidas investigações laboratoriais e clínicas, evidências avaliando o efeito da presença de placa prévia ao início do uso da clorexidina sobre manchamento e cálculo dental são escassas. Neste sentido, uma pesquisa clínica que busque responder esta questão parece ser pertinente.

3. PROPOSIÇÃO

3. PROPOSIÇÃO

O presente trabalho teve dois propósitos principais:

- 1- Comparar o efeito anti-placa e anti-gengivite da clorexidina agindo em superfícies dentárias com e sem presença de biofilme supragengival estabelecido.
- 2- Comparar o manchamento dentário e a formação de cálculo decorrente do uso da clorexidina em superfícies com e sem a presença de biofilme supragengival estabelecido.

4. ARTIGO 1

Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to ***Journal of Periodontology***.

Manuscript ID: JOP-07-0090

Title: GINGIVAL INFLAMMATORY RESPONSE TO THE USE
OF 0.12% CHLORHEXIDINE IN PREVIOUSLY PLAQUE-
FREE AND PLAQUE COVERED SURFACES. A
RANDOMIZED CONTROLLED CLINICAL TRIAL

Zanatta, Fabricio
Authors: Antoniazzi, Raquel
Rösing, Cassiano

Date Submitted: 09-Feb-2007

GINGIVAL INFLAMMATORY RESPONSE TO THE USE OF 0.12% CHLORHEXIDINE IN PREVIOUSLY PLAQUE-FREE AND PLAQUE COVERED SURFACES. A RANDOMIZED CONTROLLED CLINICAL TRIAL.

Fabricio B. Zanatta*#, Raquel P. Antoniazzi*, Cassiano K. Rösing*

Fabricio B. Zanatta, D.D.S.

Raquel P. Antoniazzi, M.S.D.

Cassiano K. Rösing, PhD

* Post-Graduate-Program in Dentistry

Lutheran University of Brazil

Rua Miguel Tostes, 101

94420-280 – Canoas-RS

School of Dentistry

Franciscan University Center

Rua dos Andradas, 1614

97010-032 – Santa Maria, RS

Brazil

CORRESPONDENCE AUTHOR:

Fabrício B. Zanatta

Rua Humberto de Campos, 250/302

97095-230 – Santa Maria - RS

Brazil

TEL: +55 55 32212225

FAX: +55 51 33468789

Email: fabriciobzanatta@yahoo.com.br

(E-mail and fax can be published)

THE MANUSCRIPT HAS 4 FIGURES AND 1 TABLE.

RUNNING TITLE: Chlorhexidine 0.12% in sites with and without supragingival plaque.

ABSTRACT

Background: Previous *in vitro* studies have shown little bactericidal effect on structured oral biofilm after exposure to chlorhexidine. *In vivo* evidence of chlorhexidine effect against structured biofilm is scarce. The purpose of this study was to compare 0.12% chlorhexidine efficacy on previously plaque-free and plaque-covered surfaces.

Methods: This study had a single-blind, randomized, split-mouth, 21 days-experimental gingivitis design, including 20 individuals who abandoned all mechanical plaque control methods during 25 days. After 4 days of plaque accumulation, the individuals had 2 randomized quadrants cleaned, remaining 2 quadrants with plaque-covered dental surfaces. On the fourth day mechanical plaque control cessation, the individuals started rinsing with 0.12% chlorhexidine (Noplak®) for 21 days. Quigley & Hein plaque index, gingival index and crevicular gingival fluid volume were assessed at baseline and day 25. At days 4, 11 and 18 Quigley & Hein plaque index was also assessed.

Results: Intergroup comparisons showed statistically higher plaque index throughout the study in plaque-covered as compared to plaque-free surfaces. The inflammatory response showed statistically higher GI index (from 0.18 ± 0.01 to 0.52 ± 0.03 vs. from 0.21 ± 0.02 to 0.93 ± 0.03) and CGF volumes (from 46.94 to 64.99 μl vs. from 48.09 to 94.28 μl) in plaque-free as compared to plaque-covered surfaces after 21-days of plaque accumulation, respectively.

Conclusion: 0.12% chlorhexidine mouthrinses showed little anti-plaque and anti-gingivitis effect in previously plaque-covered surfaces compared to plaque-free-surfaces. These results strengthen the diminished chlorhexidine effect on structured biofilm and reinforces the necessity of previous biofilm disruption before the beginning of chlorhexidine mouthrinses.

KEY WORDS: chlorhexidine; dental plaque; gingivitis; gingival crevicular fluid; biofilm.

INTRODUCTION

Dental plaque is a specific form of biofilm formed by interaction of salivary coating and microbial deposition in a matrix-embedded microbial populations structure, adherent to each other and/or to surfaces as a result of the dynamic balance between microbial attachment processes and mechanical forces of detachment in the oral cavity.¹⁻⁶ Epidemiologic surveys have shown that a definite relationship exists between dental biofilm and periodontal disease.⁷⁻⁹ The accumulation and maturation of bacterial biofilm at the gingival margin is widely recognized as the primary etiologic factor in the development of chronic gingivitis and that meticulous oral hygiene restores gingival health.¹⁰⁻¹⁴ Based upon this association, current treatment for gingivitis is directed at disruption of biofilm which usually includes professional and homecare mechanical methods for removal of the biofilm.¹⁵⁻¹⁷ However, to achieve an adequate level of plaque control is not an easy task. Efficient plaque control techniques are time-consuming and require motivation and motricity to be well performed.¹⁸

Several antimicrobial agents have been incorporated in mouthrinses to improve the outcome of mechanical oral hygiene procedures or even to replace mechanical plaque control. Chlorhexidine (CHX) was established as the most effective chemical plaque control compound.¹⁹⁻²² It is a broad spectrum antiseptic with pronounced antimicrobial effects both on Gram-positive and Gram-negative bacteria as well as on fungi and some viruses.²³ CHX is a positively charged bisbiguanide, which can adsorb to different negatively charged sites including mucous membranes, salivary pellicle on teeth and titanium surfaces as well as several components of the biofilm on the tooth surfaces such as bacteria, extracellular polysaccharides and glycoproteins.²⁴⁻²⁷

In vitro studies have shown that, in low concentrations, CXH causes damage to the cell membrane and low-molecular-weight molecules escape from the microorganisms. At higher concentrations, chlorhexidine causes precipitation and coagulation of the proteins in the cytoplasm of the exposed microbes.²⁸⁻³⁰ These properties interfere in biofilm formation preventing the growth processes in the biofilm.

Unfortunately, most laboratory studies of the potential effectiveness of such agents have applied methods which are appropriate for systemic infections (e.g. determination of the minimum inhibitory concentration - MIC) but not for diseases in which the causative organisms are presented as biofilms.⁴⁻⁶

Recent evidence has suggested that bacterial phenotypes may modify when the organisms change from a planktonic state to a sessile state (as part of a biofilm).^{4, 31-33} These changes can result in altered susceptibilities to antimicrobial agents.³⁴ Pratten et al.³⁵ demonstrated the inability of CXH 0.2% to kill formed biofilms *in vitro* after pulsing twice daily over a period of 4 days. Other *in vitro* studies demonstrated a small effect of CXH on formed biofilm viability.³⁵⁻³⁷

CXH has proven in many clinical trials to be effective in reducing the formation of dental plaque and preventing gingivitis.^{21, 38-47} However, these studies utilized a previous disruption of present biofilms in all dental surfaces. Considering the difficulty of chlorhexidine to kill microorganisms in an undisturbed biofilm, it's necessary to investigate whether chlorhexidine is able to prevent the establishment of gingivitis on tooth surfaces harboring dental plaque.

The aim of the present study was to compare the effects of 0.12% chlorhexidine gluconate in plaque and gingival inflammation in sites with and without supragingival biofilm formed in an experimental gingivitis model.

Material and Methods

The present study is a randomized split-mouth clinical trial using the experimental gingivitis model proposed by Löe et al.¹⁰ The study protocol was submitted to and approved by the Ethical Committee of the Lutheran University of Brazil, Canoas, Rio Grande do Sul.

Test panel

The test panel was recruited from the dental students of the Lutheran University of Brazil, Canoas, Rio Grande do Sul, Brazil. In order to assess the power of the present

study, using the plaque index as a primary outcome, and taking into consideration the paired design, a mean difference of 0.60 (with a standard deviation of 0.25) and accepting an α -error of .05, revealed a power 0.88. The mean age of the volunteers was 28.15 ± 3.15 yrs. At recruitment, subjects were asked about their medical and dental history. Written and oral explanations detailing the study purpose and design were given for each subject. Subjects that preliminarily met inclusion/exclusion criteria were selected for a dental screening appointment. If the subject met all the inclusion/exclusion criteria, an informed consent was handed out.

Inclusion criteria

- Age between 18-35 years;
- Male;
- No relevant medical conditions that could interfere on the periodontal health;
- Willingness to comply.

Exclusion criteria

- Probing pocket depth > 3mm and/or clinical attachment loss > 2mm at any site;
- Antibiotic and/or anti-inflammatory therapy within 3 months prior to baseline examination;
- Oral mucosal lesions;
- Smokers;
- Need for antibiotic premedication;
- History of hypersensitivity to chlorhexidine;
- Any device that could act as plaque retentive factor (carious lesions; inadequate restorations; dental implants; orthodontic appliances; fixed or removable prostheses).

Clinical Parameters

The following clinical parameters were obtained in the order listed below from all teeth, excepting the third molars:

- **Quigley & Hein plaque index⁴⁸ modified by Turesky⁴⁹ (QH)**, scored as: 0= No plaque; 1= Separate flecks of plaque at the cervical margin of the tooth; 2= A thin continuous band of plaque (up to one mm) at the cervical margin of the tooth; 3= A band of plaque wider than one mm but covering less than one-third of the crown of the tooth; 4= Plaque covering at least one-third but less than two thirds of the crown of the tooth; 5= Plaque covering two-thirds or more of the crown of the tooth.
Before scoring, an air/water spray was used to remove any food. Following, all quadrants were stained by use of topically applied .75% sodium fluoresceine solution with a swab, watching for not disrupting the supragingival plaque formed. The teeth were then dried using a chair-side air syringe and carefully isolated with cotton rolls. Plaque was then disclosed and measured using a blue light (Lang, Ostergaard e Löe, 1972).
- **Gingival crevicular fluid volume (GCF)** was collected according to the recommendations of Deinzer et al.⁵⁰ and measured with a Periotron® 8,000 (Harco Eletronics, New York). This was performed according to the manufacturer's instructions in two sites per quadrant (upper lateral incisor – labial site; upper first pre-molar – Mesio-buccal site). The area was carefully isolated with cotton rolls, to avoid salivary contamination and a paper strip (Periopaper® – Harco Eletronics, New York) was introduced into the crevice until mild resistance was achieved. Attention was taken to avoid any mechanical injury to marginal tissues. The strip was left in place for 3 minutes and immediately transferred to the calibrated Periotron® 8,000. To minimize possible impact of the room temperature and humidity on sample volume, the examinations were performed in a climatized room (about 20°C).
- **Gingival index (GI)** according to a modification proposed by Löe⁵¹ in 6 sites per tooth (Disto-buccal/labial, buco-buccal/labial, Mesio-buccal/labial, disto-

lingual/palatal, linguo-lingual/palatal, mesio-lingual/palatal) was scored as: 0: Absence of visual alterations of marginal gingiva; 1: Visual alterations of marginal gingiva; 2: Bleeding upon gentle probing; 3: Tendency to spontaneous bleeding.

Periotron® Calibration:

The calibration of the Periotron 8000® was performed with a standardized syringe graduated with 10nl markings that was used to apply standard volume of 0.1 μ l to 0.8 μ l of distilled water in steps of 0.1 μ l on periopaper strips. The test fluid was repeatedly (three times) drawn in to the syringe and then dispensed into the vial to ensure that the inner walls of the syringe were coated with fluid, minimizing this way pipetting error. A quadratic regression curve was computed as standard curve for the determination of unknown GCF volumes. If the mean results of these repeated analyses differed by more than 5 Periotron units, the Periotron was recalibrated.

Assessment of intra-examiner reproducibility

Before starting the trial, multiple sessions of training for clinical parameters' assessment with a calibrated professional were performed. Disagreements were resolved by discussion. After the examiner was trained according to the calibrated professional's criteria, the intra-examiner reproducibility was assessed. For calibration, 4 dental students, who were not included in the study population, were recruited. Students were evaluated in two different sessions: One for plaque index recordings and one for gingival index recordings. In each session, the examiner scored all teeth. Duplicate examination was then performed after 1 hour. The results of plaque index and gingival index were compared with Kappa-statistics.

The K-coeficients were 0.88 and 0.93 for Quigley Hein, Turesky and Gingival Index, respectively. During the study, after half of the sample was included in the study, new intra-examiner reproducibility was assessed using two students (10% of the total

sample). The reproducibility analysis was conducted the same way as the first one and the K-coeficient was 0.78 and 0.84 for Quigley Hein, Turesky and Gingival Index, respectively).

Study Design

The outline of the experimental procedures is summarized in Fig. 1.

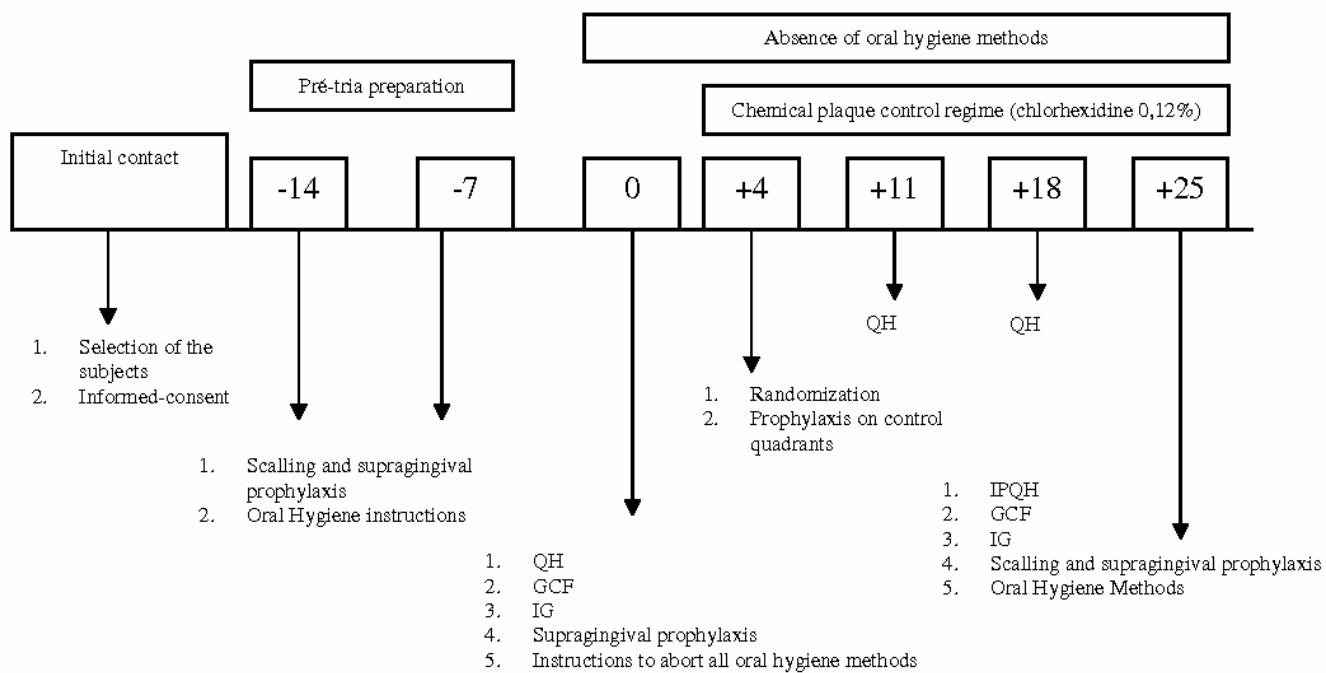


Figure 1. Experimental Design

QH= Quigley & Hein Plaque Index modified by Turesky; GCF= Gingival crevicular fluid; GI= Gingival index;

To achieve optimal gingival health and to standardize gingival baseline conditions, all subjects participated in a pretrial period during 14 days. This visit comprised professional scaling and polishing with a rubber cup and prophylactic paste (K.G. Sorensen, São Paulo, SP, Brazil) and dental floss. If their hygiene techniques were judged insufficient, individual instructions were given on how to improve their performance.

- Baseline: On day zero, QH, GCF and GI were recorded in all subjects. After the recordings, a prophylaxis was performed and detailed explanations to quit all plaque control were provided again.
- Day 4: Each subject had one upper and one lower quadrant randomly assigned as “test” (where formed supragingival biofilm was not removed) and the other quadrants were considered the “control” group (where formed supragingival biofilm was professionally removed with rubber cup, prophylactic paste and dental floss). After the prophylaxis on the control quadrants, the QH index was recorded in all teeth to ensure that control quadrants were free of supragingival biofilm. On this day, all subjects continued the oral hygiene withdrawal for 21 days and started to rinse twice daily with 15 ml of a mouthrinse containing 0,12% chlorhexidine gluconate (Noplak®).
- Day 11 and 18: QH was scored in all teeth (6 sites per tooth).
- Day 25: QH, GCF and GI were recorded in all teeth. After the recordings, a prophylaxis was performed and all subjects were free to return the normal habits of mechanical plaque control. Gingivitis was treated if necessary.

Blindness of the examiner

On days 11, 18 and 25 the examiner was kept unaware of randomization sequence and blinded as to which quadrant was either test or control. However, because of the nature of the study, it is not possible to assume that the examiner had not become aware of quadrant allocation because plaque accumulation was clinically different

between test and control quadrants especially on days 7 and 14. Whether this problem may have biased the examiner is not ascertained.

Checking of compliance

The necessary volume to all the experimental period was 630 mls (15mls- 12/12 hours). However, to check compliance, more than 630 mls of chlorhexidine solution was given in flasks with 1 liter volume, with different solution volumes in each flask. At the end of the experimental period, the remaining chlorhexidine solution was given back to check the individual adherence to the chlorhexidine rinses.

Statistical analysis

Data analysis was performed using commands that take into account clustering of observations within subjects (Stata 9.2 for Windows, Stata Corporation, College Station, TX, USA). A robust variance estimator was used to adjust for the clustering of teeth into individuals. Wald tests were used for comparisons, and the p-value was adjusted for multiple comparisons. The level of significance was set at 5%.

Results

All twenty subjects that fulfilled inclusion/exclusion criteria completed the study. Checking of compliance also revealed that 100% of the individuals used the expected amount of chlorhexidine.

Table 1 demonstrates mean QH in both groups throughout the study. At baseline, no statistically significant differences were detected among groups. An increase in mean QH was observed both for initially plaque-free and plaque-covered surfaces. However, the magnitude of increase was higher in initially plaque-covered surfaces.

Moreover, intergroup comparisons revealed that at days 11, 18 and 25, the initially plaque-covered group exhibited higher mean values of QH.

Table 1. Mean QH Index during the experimental period for initially plaque covered and plaque-free surfaces

QHI	Initially plaque-free surfaces (Control)		Initially plaque-covered surfaces (Test)	
	Mean	SE	Mean	SE
Day 0	0.13A*a**	0.02	0.16Aa	0.03
Day 11	0.20Ab	0.02	1.67Bb	0.07
Day 18	0.30Ac	0.02	1.15Bc	0.07
Day 25	0.43Ad	0.03	1.03Bd	0.05

*Upper case letters regard to comparison between initially plaque-free surfaces and plaque-covered surfaces in each experimental period. Different letters demonstrate statistically significant differences ($p<0.05$)

**Lower case letters regard to within group comparison overtime. Different letters demonstrate statistically significant differences ($p<0.05$)

In order to further examine the role of chlorhexidine in preventing gingival inflammation on initially plaque-free and plaque-covered surfaces, the mean GI scores were compared. On initially plaque-free quadrants, mean GI values increased significantly ($p<0.05$) from 0.18 ± 0.01 to 0.52 ± 0.03 at days 0 and 25 , respectively. In initially plaque-covered quadrants these values increased from 0.21 ± 0.02 to 0.93 ± 0.03 , respectively, also with statistically significant differences. The comparison of mean GI at baseline did not display statistically significant differences among groups, however at day 25, initially plaque-covered surfaces showed higher degrees of inflammation (Fig 2).

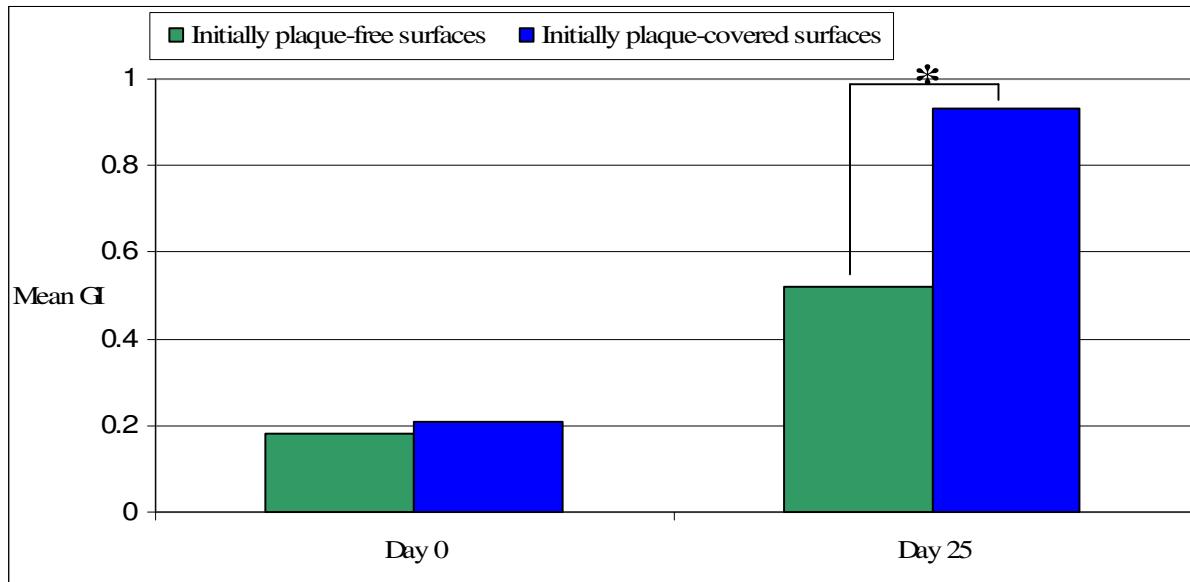


Figure 2. Mean GI scores in teeth with and without plaque on days 0 and 25.

* Statistically differences between initially plaque-free and plaque-covered surfaces.

Changes in marginal bleeding as assessed by gingival index ≥ 2 are shown in fig. 3. Both groups significantly increased marginal bleeding. However, after 3 weeks of chlorhexidine mouthrinses, percentages of GI = 2 were significantly higher in initially plaque-covered surfaces as compared to plaque-free surfaces.

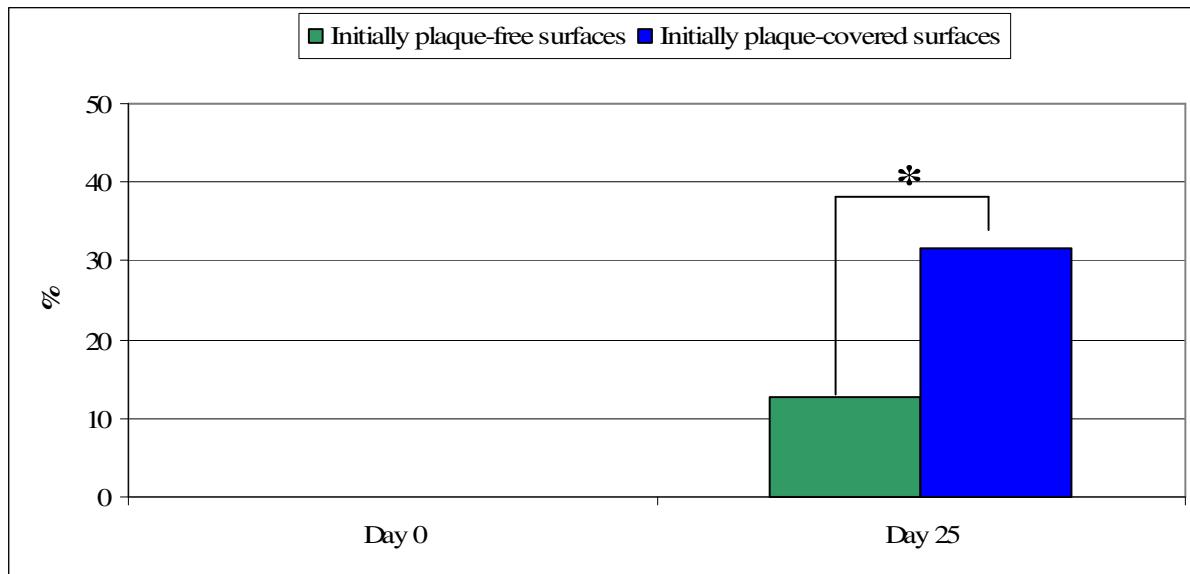


Figure 3. Percentage of sites with marginal bleeding (GI = 2) in teeth with and without plaque on days 0 and 25.

* Statistically differences between initially plaque-free and plaque-covered surfaces

The analysis of GCF volume is demonstrated in Figure 4. At baseline, no significant differences were observed among groups. ($p>0,05$). Both groups presented a statistically significant increase in CGF means from day 0 to day 25 (in plaque-free surfaces, from $46.94 \mu\text{l}$ to $64.99 \mu\text{l}$ and in plaque-covered surfaces from $48.09 \mu\text{l}$ to $94.28 \mu\text{l}$). At day 25, a statistically significant difference was observed between groups (Fig 4).

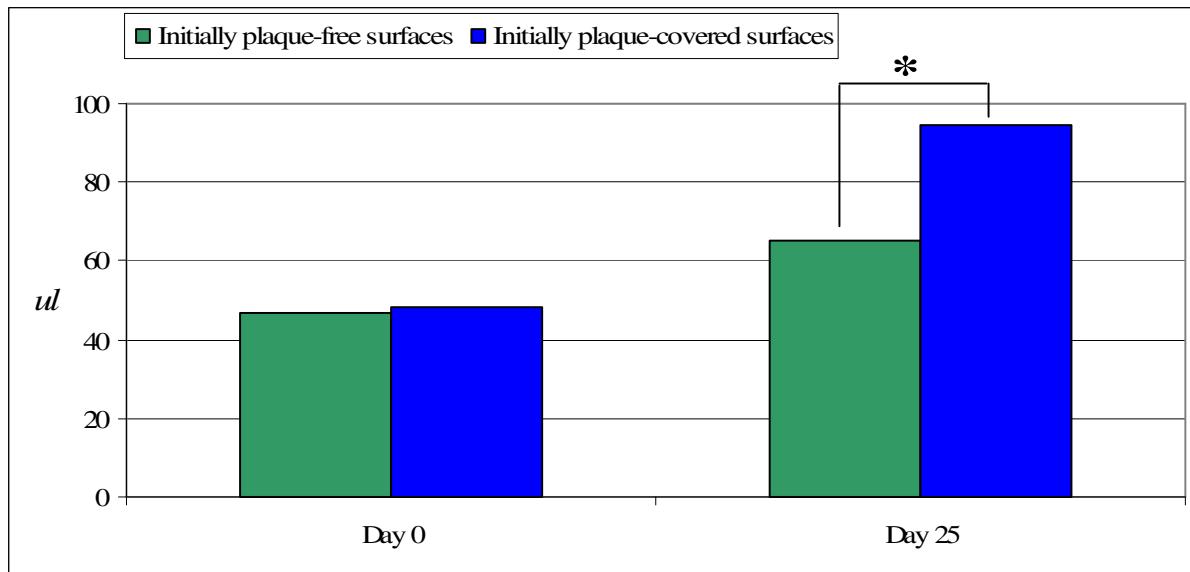


Figure 4. Mean GCF volumes (μ l) in teeth with and without plaque on day 0 and 25.

* Statistically differences between initially plaque-free and plaque-covered surfaces.

Discussion

The purpose of the present investigation was to answer an oftenly asked clinical question, but with scarce evidence in humans: Is it really necessary remove plaque before starting a chlorhexidine plaque control regime as a substitute to mechanical plaque control? In order to test the hypothesis of no difference between chlorhexidine usage in initially plaque-covered or plaque-free surfaces, a randomized split-mouth clinical trial was designed.

The methods used in our study were chosen trying to reduce variability, increasing validity. Choosing dental students to the investigation aimed at having the best possible gingival health. An experimental gingivitis model was used to evaluate the impact of professional prophylaxis on gingival status over a 21-day period. The split-mouth model used in our study could evaluate, in the same person, the gingival response to chlorhexidine in previously plaque-free and plaque-covered surfaces, avoiding a comparison between different inflammatory response patterns if the groups were in different persons. Furthermore, a calibrated clinical examiner,

unaware of the group distribution, as much as possible, assessed all clinical parameters. Moreover, to minimize the bias from factors that had been shown to affect the gingival inflammatory response, smokers were not included and only males were selected to reduce the physiologic changes in hormone levels associated to female gender that could exacerbate the gingival response to plaque.⁵²

GI was not assessed at days 11 and 18, in order not to interfere on plaque structure on formed biofilm. We faced similar methodological limitations to asses the CGF volume on days 11 and 18 because, as well as GI assessment, we had to remove supragingival plaque at the 8 Periotron sites before fluid collection to avoid plaque contamination of filter paper strips assuring a minimum influence on volumetric determination of GCF.^{53, 54}

Chlorhexidine was selected as the test substance because it is the best characterized and most effective chemical antiplaque agent known today.^{39, 41, 42, 45 46} The concentration selected corresponds to that used clinically for substitutive plaque control (0.12%). The subjects compliance during the experimental phase was 100% as assured by the remaining chlorhexidine turned in at the end of the experimental period.

As showed table 1, QH plaque scores on test group (initially plaque-covered surfaces) were statistically higher than control group (initially plaque-free surfaces) in all experimental periods, except for baseline. This demonstrates that regardless of the initial presence of plaque, chlorhexidine did not totally stop plaque growth. The tendency to increase plaque score on initially plaque-free surfaces was expected as shown in other studies.^{38,43, 55, 56} The most interesting factor to study is whether this plaque accumulation is associated with different patterns of gingival inflammation.

The initially plaque-covered surfaces (Test group) showed a significant higher gingival inflammatory response, assessed by GI and GCF, as compared to plaque-free surfaces (Control group) during the study, except for day 0, which allows better comparison. These results suggest that the initial professional prophylaxis seems to have a higher effect on preventing gingival inflammation to occur in the absence of mechanical plaque disruption.

The importance of biofilm disruption previously to the initiation of a CXH regime was investigated by Brownstein et al.⁵⁷ that compared 0.12% chlorhexidine rinsing solution in sites with and without initial prophylaxis (split-mouth design) in individuals with pre-established gingivitis at the start of the study. Their results showed that CHX only helped in decreasing the GI mean, decreasing in % of sites with GI ≥ 2 and decrease in bleeding on probing where initial prophylaxis was performed. However, it has to be highlighted that they studied the effects of CHX in reducing established gingivitis. In the present study, individuals started with gingival health and the capacity of CHX to prevent gingivitis was tested.

Corbet et al.⁵⁸ tested the therapeutic effect of 0.12% chlorhexidine in a group of individuals with established untreated gingivitis and presence of abundant calculus in a parallel control group design as compared to a placebo solution. The mean GI of the CXH group was significantly reduced from GI=1.40 to 1.08 with a marked reduction in the percentage of sites with a GI=2 scores (50% to 36%). Besides, this significant effect of CXH on gingivitis observed in the study may be too limited to assure prognostic benefits in the prevention of the future disease progression.

In our study, a statistically significant increase in GI was observed in plaque-free surfaces between days 0 and 25. Means ranged from 0.18 to 0.52. These results are in accordance with results previously reported that demonstrated this tendency of increase in GI.^{38, 56, 59, 60} However, these cited studies used the GI proposed by Löe & Silness⁶¹ whose score 2 corresponds to bleeding upon periodontal probing of the external portion of the marginal gingival tissues. In our study, we used the GI modified by Löe⁵¹ whose score 2 corresponds to bleeding upon periodontal probing of the intrasulcular marginal gingival tissues. Thus, the final GI mean could be higher because of the greater number of GI scores 2. In addition, this method seems to be more adequate to the actual knowledge diagnosis of gingivitis.

It is acknowledged that the mode of action of CXH in plaque inhibition *in vivo* occurs in a first immediate bactericidal effect followed by prolonged bacteriostatic action resulting from CXH adsorption to the biofilm-coated enamel surface.^{55, 62} The hypothesis for the inefficacy of chlorhexidine over plaque-covered surfaces in

preventing the establishment of gingivitis can be due the only superficial effect on mature biofilm.³⁷ Pratten, Burnett and Wilson³⁵ exposed a biofilm with a bacterial composition similar to that found in supragingival dental plaque to 0.2% CXH solution and showed that exposure for 1 or 5 minutes elicited no statistically significant effect on the viability of any of the six species tested.

Simulating intra-oral biofilms, Zaura-Arite et al.³⁶ demonstrated by means of confocal scanning laser microscopy only a superficial bactericidal effect of CXH in in-situ-grown dental biofilm. Auschill et al.⁶³ in a similar study design, showed a reduction on mean bacterial viability of 89% as compared to water. The difference was that CXH solution (0.2%) was applied intra-orally for 1 min twice a day for four days and participants started to rinse at the same time that in situ intra-oral splint was inserted. Thus, only a small bacterial layer was formed. The chlorhexidine-induced morphological alterations in oral biofilms were investigated by Vitkop et al.³⁴ A loss of bacterial membrane integrity and fimbrial disintegration in a few bacteria were demonstrated. A restricted matrix disintegration was also observed and showed the insufficient effect of CHX on oral biofilm. Kara et al.⁶⁴ recently showed that dual-species biofilms (*Streptococcus mutans* and *Veillonella parvula*) were less susceptible to CXH than single-species biofilms (*V. parvula*) due to more favorable growth conditions generated by utilization of additional lactate produced by *S. mutans*. These evidences showed that the environmental heterogeneity found in multibacterial biofilms can accelerate phenotypic and genotypic diversity in bacterial populations what might be the mechanisms whereby cells are better prepared to cope with adverse conditions like the antimicrobial agents.

In conclusion, both initially plaque-free and plaque-covered surface increased plaque and gingival inflammation following refrain of mechanical plaque control. However, the initially plaque-covered surfaces displayed higher values of plaque and gingival inflammation. Thus, professional removal of plaque is recommended before starting a chlorhexidine regime as a plaque control substitute.

REFERENCES

1. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM
Microbial Biofilms. Ann Rev Microbiol 1995; 49: 711 - 745.
2. Bernimoulin JP. Recent concepts in plaque formation. *J Clin Periodontol* 2003;
30: 7 - 9.
3. March PD. Dental plaque as a microbial biofilm. *Caries Res* 2004; 38: 204 -
211.
4. Marsh PD. Dental plaque: biological significance of a biofilm and community
life-style. *J Clin Periodontol* 2005; 32: 7 -15.
5. Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets.
Periodontol 2000 2002; 28:12 - 55.
6. Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontol 2000*
2005; 38: 135 -187.
7. Albandar JM, Rams TE. Global epidemiology of periodontal diseases: an
overview. *Periodontol 2000* 2002; 29:7-10.
8. Kinane DF, Attström R. Advances in the pathogenesis of periodontitis
consensus report of the fifth workshop in Periodontology. *J Cli Periodontol*
2005; 32:130 – 131.
9. Susin C, Oppermann RV, Haugejorden O, Albandar JM. Tooth loss and
associated risk indicators in an adult urban population from south Brazil. *Acta
Odontol Scand* 2005; 63: 85 - 93.
10. Löe H, Theilade E, Jensen SB. Experimental gingivitis in man. *J Periodontol*
1965; 36:177 – 187.

11. Tatakis DN, Trombelli L. Modulation of clinical expression of plaque-induced gingivitis I. Background review and rationale. *J Clin Periodontol* 2004; 31: 229 - 238.
12. Trombelli L, Tatakis DN, Scapoli C, Bottega S, Orlandini E, Tosi M. Modulation of clinical expression of plaque-induced gingivitis II. Identification of "high-responder" and "low-responder" subjects. *J Clin Periodontol* 2004; 31: 239 – 252.
13. Trombelli L, Scapoli C, Orlandini E, Tosi M, Bottega S, Tatakis DN. Modulation of clinical expression of plaque-induced gingivitis. III. Response of "high responders" and "low responders" to therapy. *J Clin Periodontol* 2004; 31: 253 – 259.
14. Trombelli L, Scapoli C, Tatakis DN, Grassi L. Modulation of clinical expression of plaque-induced gingivitis: effects of personality traits, social support and stress. *J Clin Periodontol* 2005; 32: 1143-1150.
15. Lovdal A, Arno A, Schei O, Waerhaug J. Combined effect of subgingival scaling and controlled oral hygiene on the incidence of gingivitis. *Acta Odontol Scand* 1961; 19: 537 – 555.
16. Halla JR. Avaliação do uso supervisionado da escova e do fio dental em um grupo de escolares do 2º grau. [Thesis]. Canoas, RS: Lutheran University of Brazil; 1999. 111p.
17. Cachapuz MF. Comparação da eficácia de duas técnicas de escovação na remoção de placa bacteriana. [Thesis]. Canoas, RS: Lutheran University of Brazil; 2001. 62p.

18. Axelsson P, Lindhe J. Effect of oral hygiene instruction and Professional toothcleaning on caries and gingivitis in schoolchildren. *Community Dent Oral Epidemiol* 1981; 9: 251 – 255.
19. Gjermo P, Baastad KL, Rölla G. The plaque inhibiting capacity of 11 antibacterial compounds. *J Periodontal Res* 1970; 5: 102-109.
20. Roberts WR, Addy M. Comparison of the in vivo and in vitro antibacterial properties of antiseptic mouthrinses containing chlorhexidine, alexidine, cetyl pyridinium chloride and hexetidine. Relevance to mode of action. *J Clin Periodontol* 1981; 8: 295 - 310.
21. Addy M. Chlorhexidine compared with other locally delivered antimicrobials. A short review. *J Clin Periodontol* 1986; 13: 957 – 964.
22. Fine DH. Chemical agents to prevent and regulate plaque development. *Periodontol 2000* 1995; 8: 87 – 107.
23. Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Controle do crescimento microbiano. In: Tortora GJ, Funke BR, Case CL, eds, *Microbiologia*, vol 6, Porto Alegre: Artmed; 2000: 181-206.
24. Rölla G, Melsen B. On the mechanism of plaque inhibition by chlorhexidine. *J Dent Res* 1975; 54: 57-62.
25. Gjermo P, Bonesvoll P, Rölla G. Relationship between plaque-inhibiting effect and retention of chlorhexidine in the human oral cavity. *Archs Oral Biol* 1974; 19:1031 – 1034.
26. Bonesvoll P, Lökkens P, Rölla G, Poulsen P. Retention of chlorhexidine in the human oral cavity after mouthrinses. *Arch Oral Biol* 1974; 19: 1025-1029.

27. Kozlovsky A, Artzi Z, Moses O, Kamin-Belsky N, Greenstein RB. Interaction of chlorhexidine with smooth and rough types of titanium surfaces. *J Periodontol* 2006; 77:1194 – 2000.
28. Hjeljord LG, Rölla G, Bonesvoll P. Chlorhexidine-protein interactions. *J Periodontol Res* 1973; 8: 11 - 16.
29. Hugo WB, Longworth AR. Some aspects of the mode of action of chlorhexidine. *J Pharm Pharmacol* 1964; 16: 655 – 662.
30. Rölla G, Melsen B. On the mechanism of plaque inhibition by chlorhexidine. *J Dent Res* 1975; 54: 57 – 62.
31. Xie H; Cook GS, Costerton JW, Bruce G, Rose TM, Lamont RJ. Intergeneric communication in dental plaque biofilmes. *J Bacteriol* 2000; 182: 7067-7069.
32. Ghigo JM. Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature* 2001; 26: 442 – 445.
33. Donlan RM. Role of biofilms in antimicrobial resistance. *ASAIO J* 2000; 46: 47 – 52. Epub 2001; 47:99.
34. Vitkov L, Hermann A, Krautgartner WD, et al. Chlorhexidine-induced ultrastructural alterations in oral biofilm. *Microsc Res Tech* 2005; 68: 85 - 9.
35. Pratten J, Barnett P, Wilson M. composition and susceptibility to chlorhexidine of multispecies biofilms of oral bacteria. *Appl Env microbial* 1998; 9: 3515 – 3519.
36. Zaura - Arite E, Van Marle J, Tencate JM. Confocal microscopy study of undisturbed and chlorhexidine-treated dental biofilm. *J Dent Res* 2001; 80: 1436 – 1440.

37. Decker EM, Weiger R, von Ohle C, Wiech I, Brecx M. Susceptibility of planktonic versus attached *Streptococcus sanguinis* cells to chlorhexidine. *Clin Oral Investig* 2003; 7: 98 -102.
38. Löe H, Rindom Schiött C. The effect of mouthrinses and topical application of chlorhexidine on the development of dental plaque and gingivitis in man. *J Periodont Res* 1970; 5: 79 – 83.
39. Gjermo P, Baastad KL, Rölla G. The plaque inhibiting capacity of 11 antibacterial compounds. *J Periodontal Res* 1970; 5: 102 – 109.
40. Cumming BR, Löe H. Optimal dosage and method of delivering chlorhexidine solutions for the inhibition of dental plaque. *J Periodont Res* 1973; 8: 57 – 62.
41. Brecx, M. Strategies and agents in supragingival chemical plaque control. *Periodontol 2000* 1997; 15: 100 – 108.
42. Hull PS. Chemical inhibition of plaque. *J Clin Periodontol* 1980; 7: 431 – 442.
43. Segreto, V.A., Collins, E.M., Beiswanger, B., et al. (1986) A comparison of mouthrinses containing two concentrations of chlorhexidine. *J Periodontal Res Suppl* 1986; 14: 23 – 32.
44. Smith RG, Moran J, Addy M, Doherty F, Newcombe RG. Smith, R.G. Comparative staining in vitro and plaque inhibitory properties in vivo of 0,12% and 0,2% chlorhexidine mouthrinses. *J Clin Periodontol* 1995; 22: 613 – 617.
45. Jones CG. Chlorhexidine: is it still the gold Standard? *Periodontol 2000* 1997; 15: 55 – 62.

46. Noiri Y, Okami Y, Narimatsu M, Takahashi Y, Kawahara T, Ebisu S. Effects of chlorhexidine, minocycline, and metronidazole on *Porphyromonas gingivalis* strain 381 in biofilms. *J Periodontol* 2003; 74:1647- 51.
47. Van Der Weijden GA, Timmerman MF, Novotny AGA, Rosema NAM, Verkerk AAJ. Three different rinsing times and inhibition of plaque accumulation with chlorhexidine. *J Clin Periodontol* 2005; 32: 89 – 92.
48. Quigley GA, Hein JW. Comparative cleansing efficiency of manual and power brushing. *J Am Dent Assoc* 1962; 65: 26 – 29.
49. Turesky S, Gilmore ND, Glickman I. Reduced plaque formation by the choromethyl analogue of victamine C. *J Periododontol* 1970; 41: 41 – 43.
50. Deinzer R, Mossanen BS, Herforth A. Methodological considerations in the assesment of gingival crevicular fluid volume. *J Clin Periodontol* 2000; 27: 481 – 488.
51. Löe H. The gingival index, the plaque index and the retention index systems. *J Periodontol* 1967; 38: 38 - 44.
52. Schatzle M, Loe H, Lang NP, Burgin W, Anerud A, Boysen H. The clinical course of chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2004; 31:1122-7.
53. Shearer B, Hall P, Clarke P, Marshall G, Kinane DF. Reducing variability and choosing ideal subjects for experimental gingivitis studies. *J Clin Periodontol* 2005; 32: 784 - 788.
54. Stoller NH, Karras DC, Johnson LR. Reliability of crevicular fluid measurements taken in the presence of supragingival plaque. *J Periodontol* 1990; 61: 670 – 673.

55. Griffiths GS, Wilton JMA, Curtis MA. Contamination of human gingival crevicular fluid by plaque and saliva. *Archs Oral Biol* 1992; 37: 559 – 564.
56. Addy M, Moran J. Comparison of plaque accumulation after topical application and mouth rinsing with chlorhexidine gluconate. *J Clin Periodontol* 1983; 10: 69 – 71.
57. Löe H, Rindom Schiött C, Glavind L, Karring T. Two years oral use of chlorhexidine in man. *J Periodontol Res* 1976; 11:135 -144.
58. Brownstein CN, Briggs SD, Schweitzer KL, Briner WW, Kornman KS. Irrigation with chlorhexidine to resolve naturally occurring gingivitis. A methodologic study. *J Clin Periodontol* 1990; 17: 588 - 593.
59. Corbet EF, Tam JO, Zee KY, et al. Therapeutic effects of supervised chlorhexidine mouthrinses on untreated gingivitis. *Oral Dis* 1997; 3: 9 -18.
60. Ramberg P, Furuichi Y, Volpe AR, Gaffar A, Lindhe J. The effects of antimicrobial mouthrinses on de novo plaque formation at sites with healthy and inflamed gingivae. *J Clin Periodontol* 1996;23: 7-11.
61. Waerhaug M, Gjermo P, Rölla G, Johansen JR. Comparison of the effect of chlorhexidine and CuSO₄ on the plaque formation and development of gingivitis. *J Clin Periodontol* 1984;11: 176 – 180.
62. Löe H, Silness J. Periodontal disease in pregnancy I. Prevalence and severity. *Acta Odontol Scand* 1963; 21: 533 - 551.
63. Jenkins S, Addy M, Wade W. The mechanism of action of chlorhexidine. A study of plaque growth on enamel inserts in vivo. *J Clin Periodontol* 1988; 15: 415 – 424.

64. Auschill TM, Hein N, Hellwig E, Follo M, Sculean A, Arweiler NB. Effect of two antimicrobial agents on early in situ biofilm formation. *J Clin Periodontol* 2005; 32: 147 – 152.
65. Kara D, Luppens SB, Cate JM. Differences between single- and dual-species biofilms of *Streptococcus mutans* and *Veillonella parvula* in growth, acidogenicity and susceptibility to chlorhexidine. *Eur J Oral Sci* 2006; 114: 58 - 63.

5. ARTIGO 2

Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to ***Journal of Clinical Periodontology***.

Manuscript ID: CPE-02-07-1038

Title: SIDE EFFECTS OF 0.12% CHLORHEXIDINE IN PLAQUE-FREE AND PLAQUE COVERED SURFACES. A RANDOMIZED TRIAL.

Authors: Zanatta, Fabricio
Antoniazzi, Raquel
Rösing, Cassiano

Date Submitted: 12-Feb-2007

**SIDE EFFECTS OF 0.12% CHLORHEXIDINE IN PLAQUE-FREE AND PLAQUE
COVERED SURFACES. A RANDOMIZED TRIAL.**

Running title: Side effects after chlorhexidine rinses.

Fabricio B. Zanatta, Raquel P. Antoniazzi, Cassiano K. Rösing

Fabricio B. Zanatta, D.D.S. * #

Raquel P. Antoniazzi, MSD*

Cassiano K. Rösing, PhD *

* Post-Graduate Program in Dentistry

Lutheran University of Brazil

Rua Miguel Tostes, 101

94420-280 – Canoas-RS

School of Dentistry

Franciscan University Center

Rua dos Andradas, 1614

97010-032 – Santa Maria, RS

Brazil

CORRESPONDENCE AUTHOR:

Fabrício B. Zanatta

Rua Humberto de Campos, 250/302

97095-230 – Santa Maria - RS

Brazil

Phone: +55 55 32212225

FAX: +55 51 3338 4221

Email: fabriciobzanatta@yahoo.com.br

ABSTRACT

Aim: The purpose of this study was to compare the side effects of 0.12% chlorhexidine on previously plaque-free and plaque-covered surfaces.

Material and Methods: This study had a single-blind, randomized, split-mouth, 21 days-experimental gingivitis design, including 20 individuals who abandoned all mechanical plaque control methods during 25 days. After 4 days of plaque accumulation, the individuals had 2 randomized quadrants cleaned, remaining 2 quadrants with plaque-covered dental surfaces. On the fourth day, the individuals started with 0.12% chlorhexidine (Noplak®) rinsing lasting for 21 days. Stain index intensity and extent as well as calculus formation were evaluated during the experimental period.

Results: Intergroup comparisons showed statistically higher ($p<0.05$) stain intensity and extent index as well as calculus formation over the study in plaque-covered surfaces as compared to plaque-free surfaces. 26.19% of initially plaque-covered surfaces presented calculus, whereas calculus was observed in 4.52% in initially plaque-free surfaces.

Conclusions: The presence of plaque increased 0.12% chlorhexidine side effects. These results strengthen the necessity of biofilm disruption previous to the start of chlorhexidine mouthrinses in order to reduce side effects.

KEY WORDS: Chlorhexidine; adverse effects; staining; tooth discoloration; dental calculus

CLINICAL RELEVANCE

Scientific rationale: The presence of plaque on tooth surfaces as a predictor of chlorhexidine side effects has not been evaluated especially because most studies utilized a previous disruption of biofilms in all dental surfaces before the beginning of rinsing. In this study, staining and calculus formation after 0.12% chlorhexidine was

compared between previously plaque-free and plaque-covered surfaces by means of an experimental gingivitis model.

Principal findings: Previously plaque-covered surfaces showed statistically higher stain index mean and extent as well as calculus formation.

Practical implications: It's necessary remove plaque from teeth before the beginning of CXH moutrinses to reduce tooth stain and calculus formation.

SOURCE OF FUNDING AND CONFLICT OF INTEREST:

The present investigation is independent and was supported by the University and the authors.

INTRODUCTION

Many antimicrobial agents have been incorporated in mouthrinses to improve the outcome of mechanical oral hygiene procedures or even to replace mechanical plaque control. Chlorhexidine (CHX) is presently the most effective compound (Gjermo et al. 1970, Fine 1995, Addy 1986) having pronounced antimicrobial effects both on Gram-positive and Gram-negative bacteria as well as on fungi and some viruses (Tortora et al. 2000). CHX is a positively charged bisbiguanide, which can adsorb to different negatively charged sites including mucous membranes, salivary pellicle on teeth and titanium implant surfaces as well as several components of the biofilm on the tooth surfaces such as bacteria, extracellular polysaccharides and glycoproteins (Rölla & Melsen, 1975, Gjermo et al. 1974, Bonesvoll et al. 1974, Kozlovsky et al. 2006). However, it has not been recommended for long periods because of the observed side effects.

The reported side-effects of CXH are alteration in taste, increase of calculus formation, staining of teeth and mucous membranes and, more rarely, oral mucosa desquamation and parotid swelling (Löe & Rindom Schiött 1970, Flötra et al. 1971, Flötra 1973). However, the most obvious and important local side effects are the brown staining of the teeth, restorative materials and dorsum of the tongue (Löe & Rindom Schiött 1970, Flötra et al. 1971, Gjermo & Rölla 1971) as well as supragingival calculus formation (Löe et al. 1976, Lang et al. 1982, Grossman et al. 1989).

Non-enzymatic browning (Maillard reactions) and formation of pigmented metal sulfides are considered the possible mechanisms of tooth discolorations due to CHX application (Ellingsen et al. 1982, Eriksen et al. 1985). However, clinical and laboratory studies provided strong evidence that staining is caused by interaction or precipitation of dietary chromogens with locally adsorbed CXH (Addy & Roberts 1981, Prayttino et al. 1979, Addy et al. 1991, Addy et al. 1995). In the presence of food components, CHX dyes produce colored compounds on hydroxyapatite (Jensen 1977, Jensen & Tustian 1978). Moreover, when associated with tea and coffee

intake, brown staining of tooth and acrylic previously exposed to CXH is more likely to occur (Addy & Moran 1984). Corroborating these findings, Addy et al. (1979) demonstrated that tea, coffee and red wine were particularly chromogenic.

CXH has proven in many clinical trials to be effective in reducing the formation of dental plaque and preventing gingivitis (Löe & Rindom Schiött 1970, Gjermo et al. 1970; Cumming & Löe 1973, Brecx 1997, Hull 1980, Segreto et al. 1986, Smith et al. 1995, Jones 1997, Noiri et al. 2003, Van Der Weijden et al. 2005). However, calculus formation seems to be increased (Löe et al. 1976, Lang et al. 1982, Grossman et al. 1989). All these studies utilized a previous disruption of present biofilms in all dental surfaces. However, there is a lack of evidence if the presence of biofilm formed on tooth surfaces would increase the side effects of CHX.

The aim of the present study was to compare the effects of 0.12% CXH gluconate 0,12% on staining and calculus formation in previously plaque-free and plaque covered surfaces, by means of an experimental gingivitis clinical trial.

Material and Methods

The present study is a randomized split-mouth clinical trial using the experimental gingivitis model proposed by Löe et al. (1965). The study protocol was submitted to and approved by the Ethical Committee of the Lutheran University of Brazil, Canoas, Rio Grande do Sul.

Test panel

The test panel was recruited from the dental students of the Lutheran University of Brazil, Canoas, Rio Grande do Sul, Brazil. In order to assess the power of the present study, using the Quigley & Hein plaque index as a primary outcome (reported elsewhere), and taking into consideration the paired design, a mean difference of 0.60 (with a standard deviation of 0.25) and accepting an α -error of .05, revealed a power of 0.88.

The mean age of the volunteers was 28.15 ± 3.15 yrs. At recruitment, subjects were asked about their medical and dental history. Written and oral explanations

detailling the study purpose and design were given for each subject. Subjects that preliminarily met inclusion/exclusion criteria were selected for a dental screening appointment. If the subject met all the inclusion/exclusion criteria, an informed consent was handed out and, upon acceptance, signed by the volunteers.

Inclusion criteria

- Age between 18-35 years;
- Male;
- No relevant medical conditions that could interfere on the periodontal health;
- Willingness to comply.

Exclusion criteria

- Probing pocket depth > 3mm and/or clinical attachment loss > 2mm at any site;
- Antibiotic and/or anti-inflammatory therapy within 3 months prior to baseline examination;
- Oral mucosal lesions;
- Smokers;
- Need for antibiotic premedication;
- History of hypersensitivity to chlorhexidine;
- Any device that could act as plaque retentive factor (carious lesions; inadequate restorations; dental implants; orthodontic appliances; fixed or removable prostheses).

Clinical Parameters

The following clinical parameters were assessed in the order listed below from all teeth, excepting the third higher/lower molar.

- Presence of calculus (C) in all teeth, at 6 sites per tooth (mesio-buccal, mid-buccal, disto-buccal, mesio-lingual, mid-lingual and disto-lingual) was scored as a dichotomous index: 0 - Absence of calculus; 1 - Presence of calculus.

- Discoloration Index proposed by Lobene (1968) and modified by Macpherson et al. (2000). This involves visual stain assessment of the buccal/labial and lingual/palatal aspects of the index teeth. The modification consisted of dividing each aspect into 4 separate sites (Figure 1), classified as:

- Gingival (G): 2mm wide strip running parallel to the gingival margin. The limit towards the incisal edge given by the end of the interdental papilla;
- Body (B): Central area of buccal/lingual aspect, between gingival and distal/mesial sites, extending to incisal edge;
- Mesial (M): Visible area between line angle and adjacent tooth, ending at the interdental papilla and starting at gingival site;
- Distal (D): as for mesial (M) site.

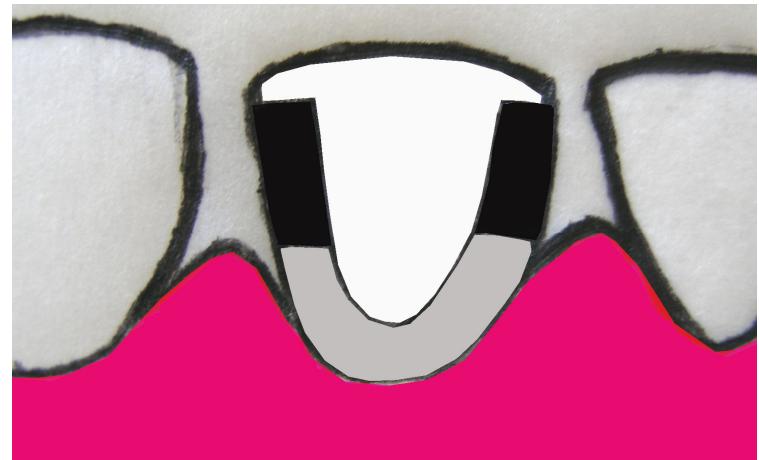


Figure. 1. The stain sites of an anterior tooth: Body (White); Gingival (Grey); Mesial and distal (black).

Stain was recorded using two separate characteristics, namely intensity and area (extent). The criteria and codes for intensity were:

0= no stain present with the natural tooth colouration;

1= slim stain;

2= clearly visible stain, orange to brown;

3= dark stain, dark brown to black.

The area (extent) of the stain was recorded only if an intensity score of 2 or 3 was given. The area criteria and codes for approximal, gingival and body sites were:

1= up to 1/3 of area affected;

2= between 1/3 and 2/3 of area affected

3= more than 2/3 of area affected.

Assessment of intra-examiner reproducibility

Before starting the trial, multiple sessions of training exercises for clinical parameters were performed. After the examiner was trained, the intra-examiner reproducibility was assessed. For reproducibility, 4 chronic chlorhexidine users, who were not included in the study population, were recruited. After an informed consent, subjects were evaluated two times with one day intermission. In each session, the examiner scored all teeth, except the third molars. The results of presence/absence of calculus and stain index (Lobene modified by Macpherson et al. 2000) were analysed by Kappa-statistics. The K-coeficient was 0.96 and 0.68 for calculus and Stain indexes, respectively.

Study design

The outline of the experimental procedures is summarized in Figure 2.

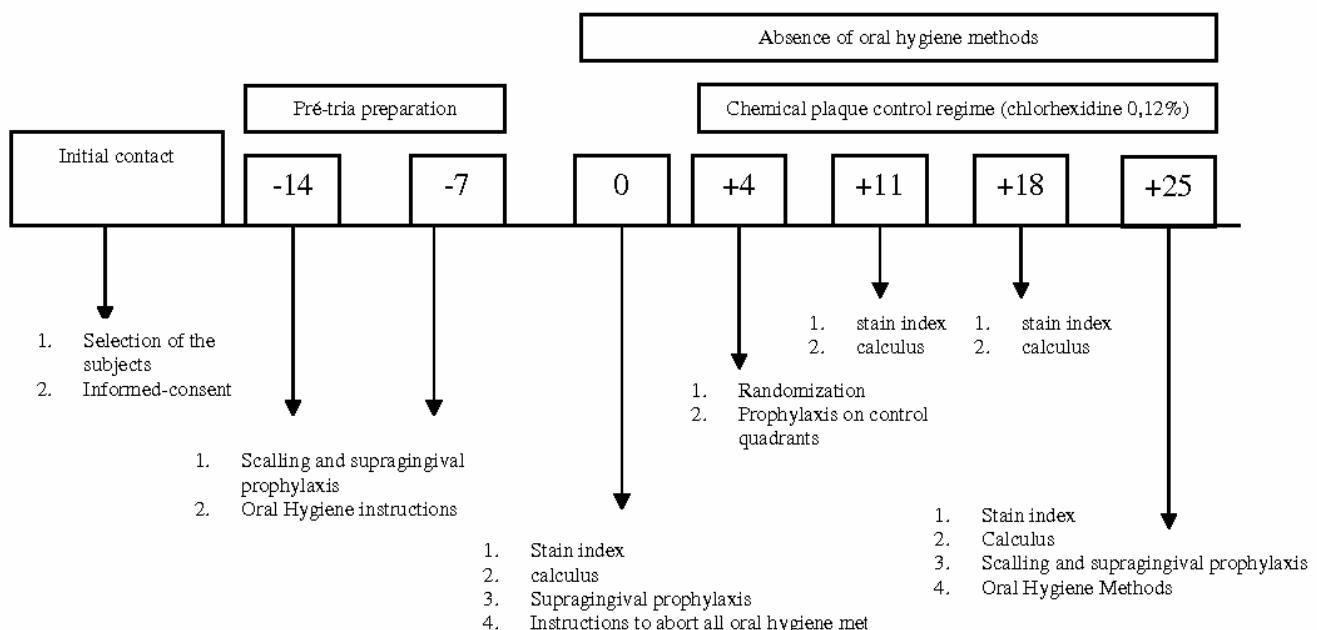


Figure 2. Experimental Design.

To achieve optimal gingival health and to standardize gingival baseline conditions, all subjects participated in a pretrial period during 14 days. Thorough professional scaling and polishing with a rubber cup and prophylactic paste and dental floss was performed. If hygiene was judged unsatisfactory, individual instructions were given on how to improve the performance.

- Baseline: On day zero, the presence of calculus and the stain index were recorded in all subjects. After the recordings, a prophylaxis was performed and detailed explanations to abort all the plaque control measurements were provided again.
- Day 4: Each subject had one maxillary and mandibular quadrant randomly assigned by a heads or tails raffle made by the examiner, as “test” (supragingival plaque-covered sites) and the other two quadrants as “controls” (supragingival plaque was professionally removed by the examiner to warrant plaque-free surfaces). After the prophylaxis on control quadrants, the Quigley & Hein Plaque Index was recorded in all teeth to ensure that control quadrants were plaque-free. Following, all subjects continued the oral hygiene withdrawal for a 21 days and started to rinse twice daily with 15 ml of a mouthrinse containing 0.12% chlorhexidine gluconate.
- Day 11 and 18: Presence/absence of calculus and stain index were recorded in all teeth.
- Day 25: Similar to days 11 and 18. After the recordings, a professional scaling and prophylaxis was performed to remove stain and calculus and all subjects were free to return the normal habits of mechanical plaque control. Gingivitis was treated if necessary.

Blindness

On days 11, 18 and 25, the examiner was kept unaware of randomization sequence and blinded to which quadrant was test or control. However, because of the nature of the study, it is not possible to assume that the examiner had not become aware of quadrant allocation because plaque accumulation was clinically different between test and control quadrants essentially on days 11 and 18. Whether this problem may have biased the examiner is not ascertained.

Compliance

The necessary volume to all the experimental period was 630 mls (15mls-12/12 hours). However, to ensure compliance, more than 630 mls of chlorhexidine solution was given in flasks with 1 liter volume, with different volumes in each flask. At the end of the experiment, the remaining solution was turned in to check the individual adherence.

Statistical analysis

Data analysis was performed using commands that take into account clustering of observations within subjects (Stata 9.2 for Windows, Stata Corporation, College Station, TX, USA). A robust variance estimator was used to adjust for the clustering of teeth into individuals. Wald tests were used for comparisons, and the p-value was adjusted for multiple comparisons. The level of significance was set at 5%.

RESULTS

All twenty subjects who fulfilled all inclusion/exclusion criteria completed the study. Checking of compliance revealed that all volunteers adhered to the instructions, with the correct amount of left over rinsing solution given back. No other side effects such as taste alterations, allergic reaction, etc. were observed.

The intensity of stain as assessed by discoloration index didn't differ in the baseline exam among experimental groups. When initially plaque-free and plaque-covered surfaces are compared, higher degrees of staining were present in initially plaque-covered surfaces at days 11, 18 and 25 (Figure 3).

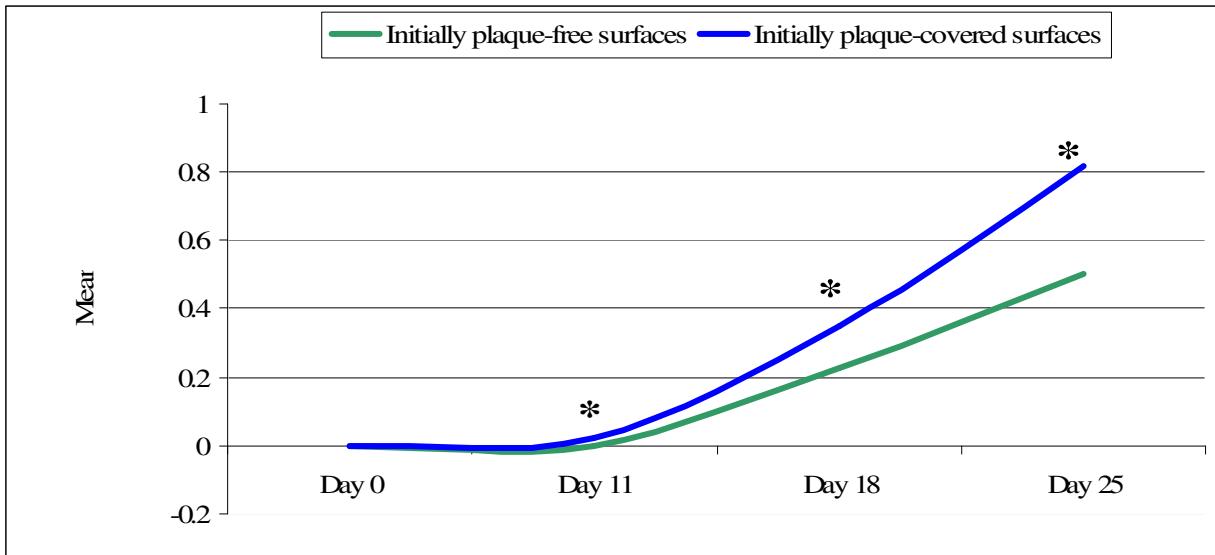


Figure 3 - Mean discoloration intensity index in surfaces initially plaque-free or plaque-covered at different experimental periods.

* Statistically significant differences between initially plaque-free and plaque-covered surfaces.

The stain area (extent) was recorded only if an intensity score of 2 or 3 was given. Both initially plaque-free and plaque-covered surfaces didn't show any score 2 or 3 at days 11 and 18. At day 25, the mean extent index was 1.59 ± 0.13 on initially plaque-free surfaces and 1.62 ± 0.09 on initially plaque-covered surfaces. These differences weren't statistically significant. The frequency of extent scores on day 25 in initially plaque-covered surfaces showed was 8.66 % of the surfaces with score 1, whereas at initially plaque-free surfaces was of 3.03%. Score 2 was detected in 10.22% of initially plaque-covered surfaces and 3.88 at initially plaque-free surfaces. Differences were also observed concerning frequency of score 3 (0.71% for initially plaque-covered and 0.17% for initially plaque-free surfaces (Figure 4).

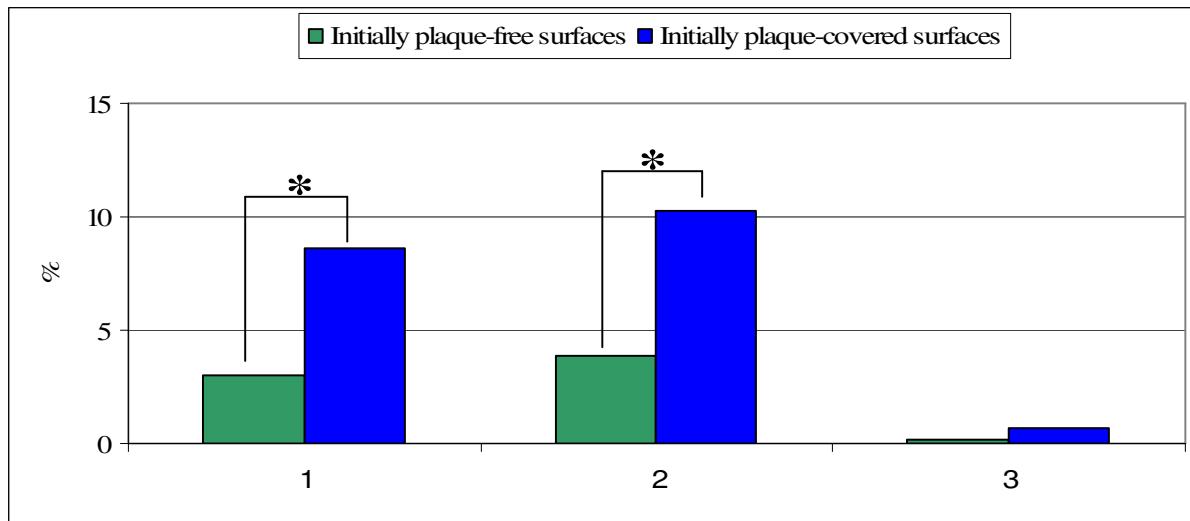


Figure 4 – Frequency of sites with scores 1, 2 and 3 of stain extent on day 25.

* Statistically significant differences between initially plaque-free and plaque-covered surfaces.

The presence/absence of calculus was analyzed by a dichotomous index. The mean percentage of calculus in initially plaque-covered and plaque-free surfaces is shown in Table 1. Both groups significantly increased calculus from days 11 to 18 and 18 to 25. When initially plaque-covered and plaque-free surfaces are compared, statistically significant differences were observed at days 18 and 25.

Table 1. Mean calculus scores on days 0, 11, 18 and 25.

Presence /absence of calculus	Initially plaque-free surfaces (Control)		Initially plaque-covered surfaces (Test)	
	Mean	SE	Mean	SE
Day 0	0.00Aa	0.00	0.00Aa	0.00
Day 11	0.00Aa	0.00	0.00Aa	0.00
Day 18	0.05Aa	0.01	0.26Bb	0.02
Day 25	0.12Ab	0.02	0.34Bc	0.02

*Upper case letters regard to comparison between initially plaque-free surfaces and plaque-covered surfaces in each experimental period. Different letters demonstrate statistically significant differences ($p<0.05$)

**Lower case letters regard to within group comparison overtime. Different letters demonstrate statistically significant differences ($p<0.05$)

When the frequency of presence of calculus is compared between groups at day 18, 26.19% of initially plaque-covered surfaces presented calculus, whereas calculus was observed in 4.52% in initially plaque-free surfaces. On day 25, these values were of 34.4% for initially plaque-covered surfaces and 12.38% for plaque-free surfaces (Figure 5). These differences were statistically significant.

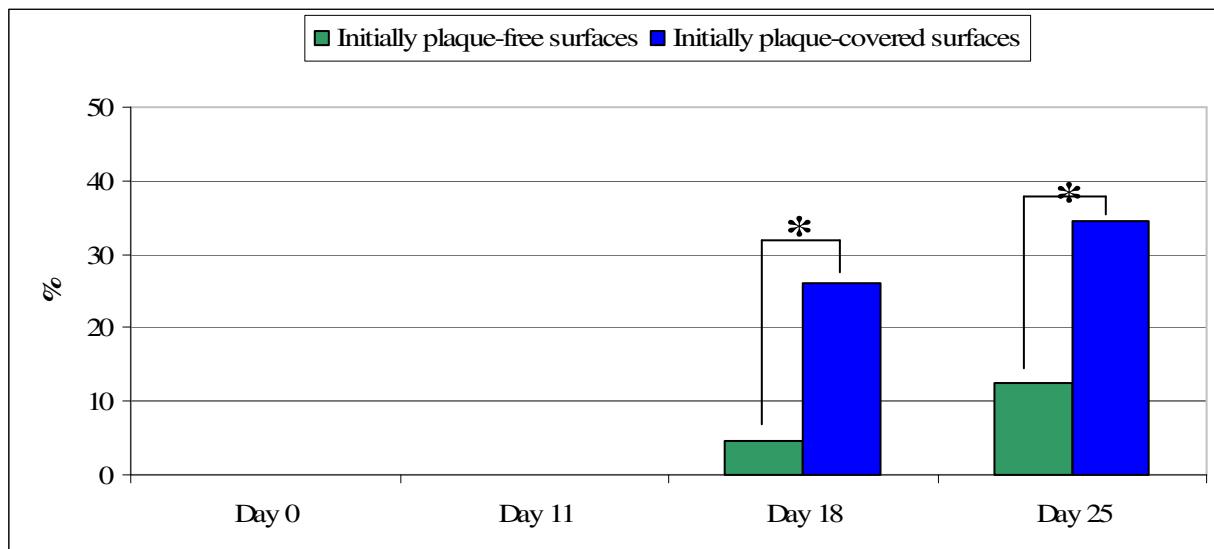


Figure 5. Percentage of sites with calculus in teeth initially plaque-covered and plaque free at different experimental periods.

* Statistically significant differences between initially plaque-free and plaque-covered surfaces.

DISCUSSION

The purpose of the present study was to investigate if initial professional prophylaxis before the start of chlorhexidine plaque control regime would result in different levels of CXH side effects (stain and calculus formation). Initially plaque-covered surfaces (Test group) showed significantly higher degrees of stain intensity and extent of surface area as well as calculus formation as compared to initially

plaque-free surfaces (Control group). These results showed that the initial professional prophylaxis seems to have a greater effect in reducing CXH side effects.

The etiology of extrinsic tooth discolotations due to CXH rinsing is not fully understood. Non-enzymatic browning reactions (Maillard reactions) and formation of pigmented metal (Fe, Sn) sulfides hypotheses are not supported by direct and conclusive *in vivo* evidence (Eriksen et al. 1985). However, the main possible mechanism of extrinsic tooth stain is the reaction products of food and beverage, where aldehydes and ketones, natural constituents of various foods, may react with chlorhexidine forming colored products. However, a discoloring capacity of CXH combined with tea, red wine and coffee has been demonstrated both *in vivo* (Prayitno et al. 1979, Addy et al. 1982) and *in vitro* (Addy et al. 1979, Prayitno & Addy 1979, Jensen 1977, McDonald et al. 1985).

Clinical investigations have demonstrated marked variations in the individual discoloration tendency after a period of chlorhexidine rinsing (Flötra et al. 1971, Dolles et al. 1979). However, the significant increase in stain in surfaces previously plaque-free has been demonstrated by means of staining indexes (Prayttino et al. 1979, Dolles et al. 1979, Addy & Roberts 1981, Addy et al. 1991, Corbet et al. 1997, Eriksen et al. 1985, Gründemann et al. 2000). Our results are in accordance to these observations. In our investigation, we found an important effect of the presence of plaque over intensity and extent of tooth staining, since surfaces without supragingival plaque at the beginning of CHX rinsing showed significant lower staining as compared to surfaces with established plaque over 21 days (Figures 3 and 4). Thus, surfaces initially plaque-covered were stained earlier than plaque-free surfaces.

There is scarce evidence investigating the presence of plaque over CHX side effects. Corbet et al. (1997) demonstrated in a population with large amounts of plaque and calculus, a significantly higher mean of stain, as assessed by a discoloration index system (Lang & Räber 1981) when compared to a parallel control group (Placebo solution). In our study, we used a randomized split-mouth design. Thus, each subject was its own control. Both test and control surfaces were exposed

the same dietary compounds influence. This methodological aspect aimed at reducing inter-individual variability, reducing bias and consequently increasing statistical confidence in the results obtained. Furthermore, a single calibrated blind clinical examiner assessed all clinical parameters.

The increase of calculus formation due to chlorhexidine mouthrinse is an usual finding in early long-term investigations (Löe et al. 1976, Lang et al. 1982, Grossman et al. 1989). However, short-term studies suggested reduced calculus formation with chlorhexidine rinsing (Löe et al. 1971, Cancro et al. 1972). Our data showed that initial prophylaxis was important to reduce calculus formation. Initially plaque-free surfaces showed little amounts of calculus formation over 21 days (about 12% of surfaces), while plaque-covered surfaces presented 34.4% of calculus. Thus, plaque-covered surfaces presented calculus earlier than plaque-free surfaces. These results may be explained by the fact that supragingival calculus is essentially mineralized plaque (Davies et al. 1997). The process of mineralization is not fully understood, but involves localized supersaturation, nucleation, crystal growth and the transformation of precursor phases such as dicalcium phosphate dehydrate, octacalcium phosphate and amorphous calcium phosphate into more stable, crystalline deposits of hydroxyapatite (White et al. 1989). The higher tendency to calculus formation in lingual aspects of lower anterior and buccal aspects of upper posterior tooth surfaces may be due the submandibular and parotid ducts location. In these areas, the abundant supply of urea from the saliva and the high salivary film velocity tend to promote base formation to plaque and calcium phosphate precipitation (Davies et al. 1997). Hence, it has been advocated that these locations may be more susceptible to calculus formation because of the low sucrose concentration in saliva with a high saliva film velocity promoting clearance of salivary sugar and acid from plaque, and the higher plaque pH associated to better access to salivary urea (Dawes & Macpherson 1993). However, these results have to be interpreted with prudence because our criteria for calculus included both stained and non-stained calculus. Thus, the increased scores could represent the incremental build-up and hardening of stain in the gingival third of the crowns.

Chlorhexidine was selected for the antimicrobial treatment because it is the best characterized and most effective chemical antiplaque agent known today (Gjermo et al. 1970, Brex 1997, Noiri et al. 2003, Hull 1980, Jones 1997). The concentration selected corresponds to that used clinically for plaque control (0.12% or 0.2%). Moreover, extensive evidence showed similar plaque reduction and gingival inflammation effectiveness when comparing 0.2% and 0.12% chlorhexidine concentrations. Thus, 0.12% CHX seems to reduce stain side effects (Segreto et al. 1986, Smith et al. 1995).

In conclusion, both initially plaque-covered and plaque-free surfaces presented tooth stain and calculus formation with different magnitude and timing. Our results confirm the necessity of professional prophylaxis to remove supragingival plaque before the start of chlorhexidine rinsing period without mechanical plaque control to reduce tooth staining and calculus formation.

References

- Addy, M. & Moran, J. (1984) The formation of stain on acrylic surfaces by the interaction of cationic antiseptic mouthwashes and tea. *Journal of Biomedical Material Research* **18**, 631-41
- Addy, M. (1986) Chlorhexidine compared with other locally delivered antimicrobials. A short review. *Journal of Clinical Periodontology* **13**, 957 – 964.
- Addy, M., Mahdavi, S.A. & Loyn, T. (1995) Dietary staining in vitro by mouthrinses as a comparative measure of antiseptic activity and predictor of staining in vivo. *Journal of Dentistry* **23**: 95 - 99.
- Addy, M., Moran, J., Davies, R.M., Beak, A. & Lewis, A. (1982) The effect of single morning and evening rinses of chlorhexidine on the development of tooth staining and plaque accumulation. A blind cross-over trial. *Journal of Clinical Periodontology* **9**, 134 - 140.
- Addy, M., Prayitno, S., Taylor, L. & Cadogan, S. (1979) An in vitro study of the role of dietary factors in the aetiology of tooth staining associated with the use of chlorhexidine. *Journal of Periodontal Research* **14**, 403 - 410.
- Addy, M. & Roberts, W.R. (1981) Comparison of the bisbiguanide antiseptics alexidine and chlorhexidine. II. Clinical and in vitro staining properties. *Journal of Clinical Periodontology* **8**, 220 - 230.
- Addy, M., Wade, W. & Goodfield, S. (1991) Staining and antimicrobial properties in vitro of some chlorhexidine formulations. *Clinical Preventive Dentistry* **13**, 13 - 17.
- Bonesvoll, P., Lökken, P., Rölla, G. & Poulsen, P. (1974) Retention of chlorhexidine in the human oral cavity after mouthrinses. *Archives of Oral Biology* **19**, 1025-1029.
- Brecx, M. (1997) Strategies and agents in supragingival chemical plaque control. *Periodontology 2000* **15**, 100 – 108.
- Cancro, L.P., Paulovich, D.B., Klein, K. & Picozzi, A. (1972) Effects of a chlorhexidine gluconate mouthrinse on dental plaque and calculus. *Journal of Periodontology* **43**, 687 - 691.

- Corbet, E.F., Tam, J.O., Zee KY, Wong, M.C., Lo, E.C., Mombelli, A.W. & Lang, N.P. (1997) Therapeutic effects of supervised chlorhexidine mouthrinses on untreated gingivitis. *Oral Diseases* **3**, 9 -18.
- Cumming, B.R. & Löe, H. (1973) Optimal dosage and method of delivering chlorhexidine solutions for the inhibition of dental plaque. *Journal of Periodontal Research* **8**, 57 – 62.
- Davies, R.M., Ellwood, R.P., Volpe, A.R. & Petrone, M.E. (1997) Supragingival calculus and periodontal disease. *Periodontology 2000* **15**, 74 - 83.
- Dawes, C. & Macpherson, L.M.D. (1993) The distribution of saliva and sucrose around the mouth during the use of chewing gum and the implications for the site specificity of caries and calculus deposition. *Journal of Dental Research* **3**, 232 - 235.
- Dolles, O.K., Eriksen, H.M. & Gjermo, P. (1979) Tooth stain during 2 years' use of chlorhexidine - and fluoride-containing dentifrices. *Scandinavian Journal of Dental Research* **87**, 268 - 274.
- Ellingsen, J.E., Rolla, G. & Eriksen, H.M. (1982) Extrinsic dental stain caused by chlorhexidine and other denaturing agents. *Journal of Clinical Periodontology* **9**, 317 - 322.
- Eriksen, H.M., Nordbo, H., Kantanen. H. & Ellingsen, J.E. (1985) Chemical plaque control and extrinsic tooth discoloration. A review of possible mechanisms. *Journal of clinical Periodontology* **12**, 345 - 350.
- Fine, D.H. (1995) Chemical agents to prevent and regulate plaque development. *Periodontology 2000* **8**, 87 – 107.
- Flötra, L., Gjermo, P., Rolla, G. & Waerhaug, J. (1971) Side effects of chlorhexidine mouth washes. *Scandinavian Journal of Dental Research* **79**, 119 – 125.
- Flötra, L. (1973) Different modes of chlorhexidine application and related local side effects. *Journal of Periodontal Research* **8**, 41 – 44.
- Gjermo, P., Baastad, K.L. & Rölla, G. (1970) The plaque inhibiting capacity of 11 antibacterial compounds. *Journal of Periodontal Research* **5**, 102-109.

- Gjermo, P., Bonesvoll, P. & Rölla, G. (1974) Relationship between plaque-inhibiting effect and retention of chlorhexidine in the human oral cavity. *Archives of Oral Biology* **19**, 1031 – 1034.
- Gjermo, P. & Rolla, G. (1971) The plaque-inhibiting effect of chlorhexidine-containing dentifrices. *Scandinavian Journal of Dental Research* **79**, 126 – 132.
- Grossman, E., Meckel, A.H., Isaacs, R.L., Ferretti, G.A., Sturzenberger, O.P., Bollmer, B.W., Moore, D.J., Lijana, R.C. & Manhart, M.D. (1989) A clinical comparison of antibacterial mouthrinses: effects of chlorhexidine, phenolics, and sanguinarine on dental plaque and gingivitis. *Journal of Periodontology* **60**, 435 - 440.
- Grundemann, L.J., Timmerman, M.F., Ijzerman, Y. & Van Der Weijden G.A. (2000) Stain, plaque and gingivitis reduction by combining chlorhexidine and peroxyborate. *Journal of Clinical Periodontology* **27**, 9 -15.
- Hull, P.S. (1980) Chemical inhibition of plaque. *Journal of Clinical Periodontology* **7**, 431 – 442.
- Jensen, J.E. & Tustian, D.G. (1978) The effect of chlorhexidine and cetylpyridine on the binding of amaranth to saliva-coated hydroxyapatite. *Journal of Periodontal Research* **13**, 275 – 279.
- Jensen, J.E. (1977) Binding of dyes to chlorhexidine-treated hydroxyapatite. *Scandinavian Journal of Dental Research* **85**, 334 - 340.
- Jones, C.G. (1997) Chlorhexidine: is it still the gold Standard? *Periodontology 2000* **15**, 55 – 62.Kinane, D.F. & Attström, R. (2005) Advances in the pathogenesis of periodontitis consensus report of the fifth workshop in Periodontology. *Journal of Clinical Periodontology* **32**, 130 – 131.
- Kozlovsky, A., Artzi, Z., Moses, O., Kamin-Belsky, N. & Greenstein R.B. (2006) Interaction of chlorhexidine with smooth and rough types of titanium surfaces. *Journal of Periodontology* **77**, 1194 – 2000.
- Lang, N.P., Hotz, P., Graf, H., Geering, A.H., Saxon, U.P., Sturzenberger, O.P. & Meckel, A.H. (1982) Effects of supervised chlorhexidine mouthrinses in children. A longitudinal clinical trial. *Journal of Periodontal Research* **17**, 101 - 111.

- Lang, N.P. & Raber, K. (1981) Use of oral irrigators as vehicle for the application of antimicrobial agents in chemical plaque control. *Journal of Clinical Periodontology* **8**, 177 – 188.
- Lobene, R.R. (1968) Effect of dentifrices on tooth stains with controlled brushing. *Journal of the American Dental Association* **77**, 849 – 855.
- Löe, H., Mandell, M., Derry, A. & Schott, C.R. (1971) The effect of mouthrinses and topical application of chlorhexidine on calculus formation in man. *Journal of Periodontal Research* **6**, 312 – 314.
- Löe, H., Rindom Schiött, C., Glavind, L. & Karring, T. (1976) Two years oral use of chlorhexidine in man. *Journal of Periodontal Research* **11**, 135 -144.
- Löe, H. & Rindom Schiött, C. (1970) The effect of mouthrinses and topical application of chlorhexidine on the development of dental plaque and gingivitis in man. *Journal of Periodontal Research* **5**, 79 – 83.
- Löe, H., Theilade, E. & Jensen, S.B. (1965) Experimental gingivitis in man. *Journal of Periodontology* **36**, 177 – 187.
- McDonald, J.L., Schemehorn, B.R. & Stookey, G.K. (1985) Factors relating to dental stain formation in the rat. *Journal of Dental Research* **64**, 810-4.
- Macpherson, L.M., Stephen, K.W., Joiner, A., Schafer, F. & Huntington, E. (2000) Comparison of a conventional and modified tooth stain index. *Journal of Clinical Periodontology* **27**, 854 - 859.
- Noiri, Y., Okami, Y., Narimatsu, M., Takahashi, Y., Kawahara, T. & Ebisu, S. (2003) Effects of chlorhexidine, minocycline, and metronidazole on Porphyromonas gingivalis strain 381 in biofilms. *Journal of Periodontology* **74**, 1647-1651.
- Prayitno, S. & Addy, M. (1979) An in vitro study of factors affecting the development of staining associated with the use of chlorhexidine. *Journal of Periodontal Research* **14**, 397 – 402.
- Prayitno, S., Taylor, L., Cadogan, S. & Addy, M. (1979) An in vivo study of dietary factors in the aetiology of tooth staining associated with the use of chlorhexidine. *Journal of Periodontal Research* **14**, 411 - 417.

- Rölla, G. & Melsen, B. (1975) On the mechanism of plaque inhibition by chlorhexidine. *Journal of Dental Research* **54**, 57-62.
- Segreto, V.A., Collins, E.M., Beiswanger, B., De La Rosa, M., Isaacs, R.L., Lang, N.P., Mallatt, M.E. & Meckei A.H. (1986) A comparison of mouthrinses containing two concentrations of chlorhexidine. *Journal of Periodontal Research Supplement* **14**, 23 – 32.
- Smith, R.G., Moran, J., Addy, M., Doherty, F., Newcombe, R.G. & Smith, R.G. (1995) Comparative staining in vitro and plaque inhibitory properties in vivo of 0,12% and 0,2% chlorhexidine mouthrinses. *Journal of Clinical Periodontology* **22**, 613 – 617.
- Tortora, G.J., Funke, B.R. & Case, C.L. (2000) Controle do crescimento microbiano. In: Tortora GJ, Funke BR, Case CL, eds, *Microbiologia*, vol 6, pp. 181-206, Porto Alegre: Artmed.
- Van Der Weijden, G.A., Timmerman, M.F., Novotny, A.G.A., Rosema, N.A.M. & Verkerk, A.A.J. (2005) Three different rinsing times and inhibition of plaque accumulation with chlorhexidine. *Journal of Clinical Periodontology* **32**, 89 – 92.
- White, D.J., Bowman, W.D. & Nancollas, G.H. (1989) Physical-chemical aspects of dental calculus formation and inhibition: in vivo and in vitro studies. In: Ten Cate, J.M. *Recent advances in the study of dental calculus*, vol. 1, pp. 175 -188, St Oxford, IRL Press.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- 1- A presença de placa bacteriana nas superfícies dentais previa ao início da utilização da clorexidina proporcionou uma menor ação anti-placa e anti-gengivite do fármaco;
- 2- A presença de placa bacteriana nas superfícies dentais previa ao início da utilização da clorexidina proporcionou efeitos adversos de manchamento e cálculo em maiores magnitudes. Ainda, as superfícies com placa começaram a manchar e apresentar cálculo mais rapidamente que as superfícies onde a placa foi removida.
- 3- Com base nisso, pode-se indicar a necessidade de remoção mecânica de placa antes do início da utilização de clorexidina 0.12% para potencializar o efeito anti-placa e anti-gengivite da mesma, bem como diminuir o manchamento e a formação de cálculo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Addy M. Chlorhexidine compared with other locally delivered antimicrobials. A short review. *J Clin Periodontol.* 1986;13: 957 – 964.
- Addy M, Moran J. Comparison of plaque accumulation after topical application and mouth rinsing with chlorhexidine gluconate. *J Clin Periodontol.* 1983; 10: 69-71.
- Addy M, Prayitno S, Taylor L, Cadogan S. An in vitro study of the role of dietary factors in the aetiology of tooth staining associated with the use of chlorhexidine. *J Periodontal Res.* 1979; 14: 403 – 410.
- Albandar JM, Gjermo P, Preus HR. Chlorhexidine use after two decades of over-the-counter availability. *J Periodontol.* 1994; 65:109-12.
- Armitage CG. Developman of a classification system for Periodontal Disease and conditions. *Ann. Periodontol.* 1999, 4: 1-6.
- Auschill TM, Hein N, Hellwig E, Follo M, Sculean A, Arweiler NB. Effect of two antimicrobial agents on early in situ biofilm formation. *J Clin Periodontol.* 2005; 32:147-152.
- Axelsson P, Lindhe J. Effect of oral hygiene instruction and Professional toothcleaning on caries and gingivitis in schoolchildren. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1981; 9: 251 – 255.
- Axelsson P, Nyström B, Lindhe J. The long-term effect of a plaque control program on tooth mortality, caries and periodontal disease in adults. Results after 30 years of maintenance. *J Clin Periodontol.* 2004 Sep;31(9):749-57.
- Barkvoll P, Rölla G, Svendsen K. Interaction between chlorhexidine digluconate and sodium lauryl sulfate in vivo. *J Clin Periodontol.* 1989; 16: 593-595.
- Bernimoulin JP. Recent concepts in plaque formation. *J Clin Periodontol.* 2003; 30: 7-9.
- Bonesvoll P. Influence of ionic strength, calcium, sodium dodecyl sulphate and urea on the retention of chlorhexidine in the human mouth after mouth rinses. *Arch Oral Biol.* 1977; 22: 273-279.
- Bonesvoll P, Gjermo P. A comparision between chlorhexidine and some quaternary ammonium compounds with regard to retention, salivary concentration and plaque-inhibiting effect in the human mouth after mouth rinses. *Arch Oral Biol.* 1978; 23: 289-294.

Bonesvoll P, Lökkens P, Rölla G, Poulsen P. Retention of chlorhexidine in the human oral cavity after mouthrinses. Arch Oral Biol. 1974; 19: 1025-1029.

Brecx M. Strategies and agents in supragingival chemical plaque control. Periodontol 2000. 1997; 15: 100 – 108.

Brown JL, Löe H. Prevalence, extent, severity and progression of periodontal disease. Periodontol 2000. 1993; 2: 57-71.

Brownstein CN, Briggs SD, Schweitzer KL, Briner WW, Kornaman KS. Irrigation with chlorhexidine to resolve naturally occurring gingivitis. A methodologic study. J Clin Periodontol. 1990; 17: 588-593.

Cachapuz MF Comparação da eficácia de duas técnicas de escovação na remoção de placa bacteriana. [dissertação]. Canoas/ RS, 2001., Faculdade de Odontologia, ULBRA, 2001.

Cancro LP, Paulovich DB, Klein K, Picozzi, A. Effects of a chlorhexidine gluconate mouthrinse on dental plaque and calculus. Journal of Periodontol 1972; 43: 687 - 691.

Case DE. Safety of hibitane I. Laboratory experiments. J Clin Periodontol. 1977; 4: 66-72.

Ciancio SG. Chemical agents: plaque control, calculus reduction and treatment of dentinal hypersensitivity. Periodontol 2000. 1995; 8: 75-86.

Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial Biofilms. Ann Rev Microbiol. 1995; 49: 711-745.

Corbet EF, et al. Therapeutic effects of supervised chlorhexidine mouthrinses on untreated gingivitis. Oral Dis. 1997; 3: 9-18.

Cumming BR, Löe H. Optimal dosage and method of delivering chlorhexidine solutions for the inhibition of dental plaque. J Periodont Res. 1973; 8: 57-62.

Cury JA. Controle químico da placa dental. In: Kriger L, editor. ABOPREV-Promoção de saúde bucal. 2 ed. São Paulo: Artes Médicas, 1999. p. 129-139.

Davies GE, Francis J, Martin AR, Rose FL, Swain G. 1:6-di-4'-chlorophenylguanidohexane ("hibitane"). Laboratory investigation of a new antibacterial agent of high potency. Brit J Pharmacol. 1954; 9:192-196.

Davies RM, Ellwood RP, Volpe AR, Petrone ME. Supragingival calculus and periodontal disease. Periodontol 2000. 1997; 15: 74 - 83.

Davies RM, Hull PS. Plaque inhibition and distribution of chlorhexidine in beagles dogs. J Periodontol Res Suppl. 1973;12: 22-27.

Deinzer R, Mossanen BS, Herforth A. Methodological considerations in the assessment of gingival crevicular fluid volume. J Clin Periodontol. 2000; 27: 481 – 488.

Donlan RM. Role of biofilms in antimicrobial resistance. ASAIO J. 2000; 46: 47-52. Erratum in: ASAIO J., v. 47, p. 99, 2001.

Ellingsen, JE, Rolla G, Eriksen H.M. Extrinsic dental stain caused by chlorhexidine and other denaturing agents. J Clin Periodontol. 1982; 9: 317 - 322.

Eriksen HM, Nordbo H, Kantanen H, Ellingsen JE. Chemical plaque control and extrinsic tooth discoloration. A review of possible mechanisms. J clin Periodontol. 1985; 12: 345 - 350.

Fejerskov O, Thylstrup A. O ambiente oral – uma introdução. IN: Cariologia Clinica. 2º ed., Editora Santos, São Paulo, 1994.

Fine DH. Chemical agents to prevent and regulate plaque development. Periodontol 2000. 1995; 8: 87-107.

Fux CA, Stoodley P, Hall-stoodley L, Costerton JW. Bacterial biofilms: a diagnostic and therapeutic challenge. Expert Rev Anti Infect Ther. 2003; 1: 667-683.

Flötra L. Different modes of chlorhexidine application and related local side effects. J Periodont Res. 1973; 8: 41-44.

Flötra L, Gjermo P, Rolla G, Waerhaug J. Side effects of chlorhexidine mouth washes. Scand J Dent Res. 1971; 79: 119 – 125.

Ghigo JM. Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. Nature. 2001; 26: 442-445.

Gjermo P, Baastad KL, Rölla G. The plaque inhibiting capacity of 11 antibacterial compounds. J Periodontal Res. 1970; 5: 102-109.

Gjermo P, Bonesvoll P, Rölla G. Relationship between plaque-inhibiting effect and retention of chlorhexidine in the human oral cavity. Archs Oral Biol.1974; 19: 1031-1034.

Gomes SC, Piccinin FB, Oppermann RV,et al. Periodontal status in smokers and never-smokers: clinical findings and real-time polymerase chain reaction quantification of putative periodontal pathogens. J Periodontol. 2006; 77:1483-90.

Goodson JM, Tanner ACR, Haffajee AD, Sornberger GC, Socransky SS. Patterns of progression and regression of advanced destructive periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1982; 10: 298-310.

Grossman E, Meckel AH, Isaacs RL, et al. A clinical comparison of antibacterial mouthrinses: effects of chlorhexidine, phenolics, and sanguinarine on dental plaque and gingivitis. *Journal of Periodontol.* 1989; 60: 435 -440.

Halla JR. Avaliação do uso supervisionado da escova e do fio dental em um grupo de escolares do 2º grau. [dissertação]. Canoas/ RS, 1999., Faculdade de Odontologia, ULBRA, 1999.

Hjeljor LG, Rölla G, Bonesvoll P. *J Periodontol Res.* 1973; 8: 11-16.

Hugo WB, Longworth AR. Some aspects of the mode of action of chlorhexidine. *J Pharm Pharmacol.* 1964; 16: 655-662.

Hull PS. Chemical inhibition of plaque. *J Clin Periodontol.* 1980; 7: 431-442.

Jenkins S, Addy M, Wade W. The mechanism of action of chlorhexidine. A study of plaque growth on enamel inserts in vivo. *J Clin Periodontol.* 1988; 15: 415-424. Jenkins S, Addy M, Newcombe RG. Dose response of chlorexidine against plaque and comparison with triclosan. *J Clin Periodontol.* 1994; 21: 250 – 255.

Jensen JE. Binding of dyes to chlorhexidine-treated hydroxyapatite. *Scand J Dent Res.* 1977; 85: 334-40.

Jones CG. Chlorhexidine: is it still the gold Standard? *Periodontol 2000.* 1997; 15: 55 – 62.

Kinane DF, Attström R. Advances in the pathogenesis of periodontitis consensus report of the fifth workshop in Periodontology. *J Clin Periodontol.* 2005; 32:130-131.

Lang NP, Ostergaard E, Löe H. A fluorescence plaque disclosing agent. *J Periodont Res.* 1972; 7: 59-67.

Leach SA, Saxton CA. An electron microscopic study of the acquired pellicle and plaque formed on enamel of human incisors. *Archs Oral Biol.* 1966; 11: 1081-1094.

Leao A, Sheiham A. Relation between clinical dental status and subjective impacts on daily living. *J Dent Res.* 1995; 74: 1408-1413.

Lindhe J, Hamp S, Löe H. Experimental periodontitis in the beagle dog. *J Periodontol Res.* 1973; 8: 1-10.

Listgarten M, Schifter CC, Laster L. 3 year longitudinal study of the periodontal status of an adult population with gingivitis. *J Clin Periodontol.* 1985; 12: 225-238.

Löe H. The gingival index, the plaque index and the retention index systems. *J Periodontol.* 1967; 38: 38-44.

Löe H, Mandell M, Derry A, Schott CR. The effect of mouthrinses and topical application of chlorhexidine on calculus formation in man. *J Periodontal Res.* 1971; 6: 312 – 314.

Löe H, Rindom Schiött C. The effect of mouthrinses and topical application of chlorhexidine on the development of dental plaque and gingivitis in man. *J Periodont Res.* 1970; 5: 79-83.

Löe H, Rindom Schiött C, Glavind L, Karring T. Two years oral use of chlorhexidine in man. *J Periodontal Res.* 1976; 11: 135-144.

Löe H, Theilade E, Jensen SB. Experimental gingivitis in man. *J Periodontol.* 1965; 36: 177 – 187.

Lövdal A et al. Combined effect of subgingival scaling and controlled oral hygiene on the incidence of gingivitis. *Acta Odontol Scand.* 1961; 19: 537 – 555.

Masaki Okano MD et al. Anaphylactic symptoms due to chlorhexidine gluconate. *Arch Dermatol.* 1989; 125: 50-52.

Marsh PD. Dental plaque as a microbial biofilm. *Caries Res.* 2004; 38: 204-211.

Marsh PD. Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style. *J Clin Periodontol.* 2005; 32: 7-15.

Marsh PD, Nyvad B. A microbiota oral e biofilmes formados sobre os dentes. In: Fejerskov O, Kidd E, editores. Cárie dentária: a doença e seu tratamento clínico. São Paulo: Editora Santos. p. 29-47, 2005.

Noiri Y, Okami Y, Narimatsu M, Takahashi Y, Kawahara T, Ebisu S. Effects of chlorhexidine, minocycline and metronidazole on *porphyromonas gingivalis* strain 381 in biofilms. *J Periodontol.* 2003; 74: 1647-1651.

Nordbo H, Eriksen HM, Rolla G, Attramadal A, Solheim H. Iron staining of the acquired enamel pellicle after exposure to tannic acid or chlorhexidine: preliminary report. *Scand J Dent Res.* 1982; 90: 117-23.

Nordbo H, Attramadal A, Eriksen HM. Adsorption of iron to saliva coated hydroxyapatite. *Scand J Dent Res.* 1983; 91:182-5.

Nordbo H, Skjoorland KK, Eriksen HM. Auger electron spectroscopy of iron in dental pellicle from stainers and non-stainers. *Acta Odontol Scand*. 1984; 42: 37-40.

Oppermann RV, Rösing CK. Prevenção e tratamento das doenças periodontais. In: Kriger L, editor. ABOPREV- Promoção de saúde bucal. 2 ed. São Paulo: Artes Médicas, 1999. p. 257-281.

Palmer RJ, Sternberg C. Modern microscopy in biofilm research: confocal microscopy and other approaches. *Curr Opin Biotechnol*. 1999; 10: 263-268.

Pratten J, Barnett P, Wilson M. Composition and susceptibility to chlorhexidine of multispecies biofilms of oral bacteria. *Appl Env Microbiol*. 1998; 9: 3515-3519.

Pillon FL. Avaliação crítica dos recursos para o controle da placa bacteriana supragengival. In: Oppermann RV, Rösing CK, editores. *Periodontia Ciência e Clínica*, São Paulo: Artes Médicas; 2001. p. 105-118.

Rapp GE, Garcia RV, Cardoso AK. Avaliação crítica dos recursos mecânicos para o controle da placa. In: Oppermann RV, Rösing CK, editores. *Periodontia: Ciência e clínica*. São Paulo: Artes Médicas. p. 87- 104, 2001.

Rodrigues R, Serpa AB. Perfil bioemocional do paciente e o controle da placa bacteriana. IN: Oppermann RV, Rösing CK, editors. *Periodontia Ciência e Clínica*, São Paulo: Artes Médicas; 2001. p. 73-85.

Rölla G, Melsen B. On the mechanism of plaque inhibition by chlorhexidine. *J Dent Res*. 1975; 54: 57-62.

Rösing CK, Fernandes MI, Susin C, Oppermann RV. Biofilme dental e cálculo dental. In: *Periodontia: A atuação clínica baseada em evidências científicas*. São Paulo: Artes médicas. Cap. 2, p. 23-38, 2005.

Rösing CK, Maltz M, Oppermann RV. Controle químico do biofilme supragengival. *Cadernos da ABOPREV V*, maio, p. 1-8, 2005.

Rushton A. Safety of hibitane II. Human experience. *J Clin Periodontol*. 1977; 4: 73-79.

Segreto VA, Collins EM, Beiswanger B, De La Rosa M, Isaacs RL, Lang NP, Mallatt ME, Meckei AH. A comparison of mouthrinses containing two concentrations of chlorhexidine. *J Periodontol Res*. 1986; 23-32.

Schatzle M, Loe H, Burgin W, Anerud A, Boysen H, Lang NP. Clinical course of chronic periodontitis. I. Role of gingivitis. *J Clin Periodontol.* 2003; 30:887-901. Erratum in: *J Clin Periodontol.* 2004 31:813.

Schatzle M, Loe H, Lang NP, Burgin W, Anerud A, Boysen H. The clinical course of chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2004; 31:1122-7.

Sheiham A. Is the chemical prevention of gingivitis necessary to prevent severe periodontitis? *Periodontol* 2000. 1997; 15: 15-24.

Smith, RG et al. Comparative staining in vitro and plaque inhibitory properties in vivo of 0,12% and 0,2% chlorhexidine mouthrinses. *J Clin Periodontol.* 1995; 22: 613-617.

Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol* 2000. 2002; 28: 12-55.

Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontol* 2000. 2005; 38: 135-187.

Sonju T. Investigations of some salivary glycoproteins and their possible role in pellicle formation. *Nor Tannlaegeforen Tid.* 1975; 85: 393-403.

Tatakis DN, Trombelli L. Modulation of clinical expression of plaque-induced gingivitis I. Background review and rationale. *J Clin Periodontol.* 2004; 31: 229-238.

Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Controle do crescimento microbiano. In: Microbiologia. 6 ed., Porto Alegre: Artmed, 2000., cap.7, p.181-206.

Trombelli L, Tatakis DN, Scapoli C, Bottega S, Orlandini E, Tosi M. Modulation of clinical expression of plaque-induced gingivitis II. Identification of "high-responder" and "low-responder" subjects. *J Clin Periodontol.* 2004; 31: 239-252.

Trombelli L, Scapoli C, Orlandini E, Tosi M, Bottega S, Tatakis DN. Modulation of clinical expression of plaque-induced gingivitis. III. Response of "high responders" and "low responders" to therapy. *J Clin Periodontol.* 2004; 31: 253-259.

Trombelli L, Scapoli C, Tatakis DN, Grassi L. Modulation of clinical expression of plaque-induced gingivitis: effects of personality traits, social support and stress. *J Clin Periodontol.* 2005; 32: 1143-1150.

Theilade E, Wright WH, Jensen SB, Loe H. Experimental gingivitis in man. A longitudinal clinical and bacteriological investigation. *J Periodontal Res.* 1966; 1: 1 – 13.

Tolker-Nielsen T, Molin S. Spatial organization of microbial biofilm communities. *Microb Ecol*. 2000; 40: 75-84.

Xie H, Cook GS, Costerton JW, Bruce G, Rose TM, Lamont RJ. Intergeneric communication in dental plaque biofilmes. *J Bacteriol*. 2000; 182: 7067-7069.

Zaura-Arite E, Van Marle J, Tencate JM. Confocal microscopy study of undisturbed and chlorhexidine-treated dental biofilm. *J Dent Res*. 2001; 80: 1436-1440.

Waerhaug M, Gjermo P, Rölla G, Johansen JR. Comparison of the effect of chlorhexidine and CuSO₄ on the plaque formation and development of gingivitis. *J Clin Periodontol*. 1984; 11: 176-180.

Weidlich P, Lopes de Souza MA, Oppermann RV. Evaluation of the dentogingival area during early plaque formation. *J Periodontol*. 2001; 72: 901-910.

Winrow MJ. Metabolic studies with radiolabelled chlorhexidine in animals and man. *J. Periodont Res*. 1973; 8: 45-48.

Van Der Weijden GA, Timmerman MF, Novotny AGA, Rosema NAM, Verkerk AAJ. Three different rinsing times and inhibition of plaque accumulation with chlorhexidine. *J Clin Periodontol*. 2005; 32: 89-92.

6. APÊNDICES

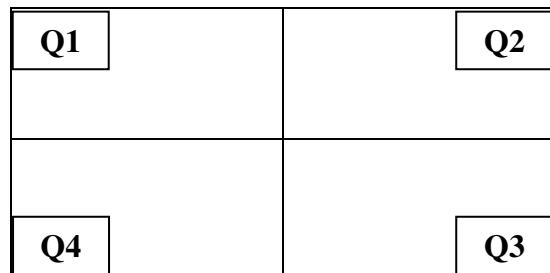
1. RANDOMIZAÇÃO

NOME: _____

IDADE: _____ TELEFONE: _____

RANDOMIZAÇÃO DOS QUADRANTES QUE SERÃO DEPLACADOS NO QUARTO

DIA EXPERIMENTAL:



2. FICHA DO EXAME

Nome: Data: Exame: () dia 0 () dia 4 () dia 11 () dia 18 () dia 25

ÍNDICE DE PLACA (QUIGLEY HEIN), ÍNDICE GENGIVAL (LÖE & SILNESS) e CÁLCULO

	17			16			15			14			13			12			11			21			22			23			24			25			26			27		
	D V	V	MV	DV	V	MV	MV	V	DV																																	
IP																																										
IG																																										
C																																										
IP	DP	P	MP	DP	P	MP	DP	P	MP	DP	P	MP	DP	P	MP	DP	P	MP	DP	P	MP	DP	P	DP	MP	P	DP															
IG																																										
C																																										
	47			46			45			44			43			42			41			31			32			33			34			35			36			37		
IP	DV	V	MV	DV	V	MV	DV	V	MV	DV	V	MV	DV	V	MV	DV	V	MV	MV	V	DV																					
IG																																										
C																																										
IP	DL	L	ML	DL	L	ML	DL	L	ML	DL	L	ML	DL	L	ML	DL	L	ML	ML	L	DL	M	D	L	DL																	
IG																																										
C																																										

FLUIDO CREVICULAR GENGIVAL

Quadrante 1			Quadrante 2		
D	D	D	D	D	D
Quadrante 4			Quadrante 3		
D	D	D	D	D	D

-

3. ÍNDICE DE MANCHAMENTO (LOBENE MODIFICADO – MACPHERSON, 2000)

Nome:.....Data:.....Exame: ()Dia 4 ()dia 11() dia 18 () dia 25

	17				16				15				14				13				12				11				21				22				23				24				25				26				27			
	D	G	M	C	D	G	M	C	D	G	M	C	D	G	M	C	D	G	M	C	D	G	M	C	D	G	M	C	M	G	D	C	M	G	D	C	M	G	D	C	M	G	D	C												
S																																																								
E																																																								
	D	G	M	C	D	G	M	C	D	G	M	C	D	G	M	C	D	G	M	C	D	G	M	C	M	G	D	C	M	G	D	C	M	G	D	C	M	G	D	C																
S																																																								
E																																																								
	47				46				45				44				43				42				41				31				32				33				34				35				36				37			
S	D	G	M	C	D	G	M	C	D	G	M	C	D	G	M	C	D	G	M	C	D	G	M	C	M	G	D	C	M	G	D	C	M	G	D	C	M	G	D	C																
E																																																								
	D	G	M	C	D	G	M	C	D	G	M	C	D	G	M	C	D	G	M	C	D	G	M	C	M	G	D	C	M	G	D	C	M	G	D	C	M	G	D	C																
S																																																								
E																																																								

Severidade:

- 0 -sem manchas (cor natural do dente)
- 1 -manchamento leve
- 2 -manchamento moderado - visível claramente, laranja à marrom
- 3 -manchamento pesado - marrom escuro à preto.

Extensão: (Só é aplicado às áreas que recebem escores 2 ou 3 para severidade).

- 1- até 1/3 da área manchada
- 2- entre 1/3 e 2/3 da área manchada
- 3- acima de 2/3 da área manchada.

4. QUESTIONÁRIO DE SAÚDE.

IDENTIFICAÇÃO:

Nome: _____

Data de nascimento: _____

Endereço: _____

Telefones: _____

ANAMNESE:

Está em tratamento médico? _____ Nome e telefone do médico _____

Já esteve hospitalizado? _____ Submeteu-se a algum tipo de cirurgia _____

Você é fumante? _____ Quantidade _____

- Já teve alguma das seguintes doenças ou problemas ?

() tuberculose () anemia-leucemia () distúrbio do sistema nervoso
() febre reumática () hepatite () DST/ HIV
() doenças renais () diabetes ()
() alergia _____ () problema circulatório
() desmaio/ convulsões / hemorragias
() outras. Quais ? _____

- Apresenta alguma cardiopatia- problema cardíaco?

() hipertensão () infarto
() febre reumática () sopro
() angina

- Faz uso de alguma medicação?

() antibióticos () medicamento imunossupressores (ciclosporina)
() bloqueadores de canais de cálcio
() insulina () outro _____
() antiinflamatório

Quanto tempo? _____

Você possui alguma doença ou problema médico não listado neste questionário? _____

Afirmo sob minha responsabilidade que as respostas acima são verdadeiras

5. REAÇÕES ADVERSAS AO PRODUTO

Nome:..... Data:.....

Marque nos itens abaixo, se caso você tenha tido alguma reação adversa ao produto usado, bem como se estas alterações o tenham causado algum desconforto:

As manchas me causaram:

()Nenhum desconforto ()Pouco desconforto () Moderado desconforto () Muito desconforto

Alteração do paladar:

()Nada ()Pouco ()moderada () Muito

A alteração do paladar me causou:

()Nenhum desconforto ()Pouco desconforto () Moderado desconforto () Muito desconforto

Caso você tenha percebido qualquer outra alteração decorrida do uso do produto, anote abaixo:

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

.....
Assinatura do participante da pesquisa

6. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DO PARTICIPANTE

Dados de Identificação do Sujeito da Pesquisa ou Responsável Legal

1. Nome:.....

Carteira de Identidade nº:.....Data Nascimento:...../...../.....

Endereço:.....

Bairro:.....Cidade:.....Estado:.....

CEP:.....Telefone: (.....).....

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa que tem o objetivo de verificar o efeito contra a placa e contra a gengivite de um bochecho contendo clorexidina 0,12% quando administrada sobre dentes com presença e ausência de placa bacteriana concomitantemente. Para isso, os participantes deverão ficar todo o período experimental na total ausência de qualquer meio de limpeza dental. Serão realizados exames periodontais rotineiros, onde será utilizada uma sonda que mede o estado inflamatório das gengivas, sendo estes procedimentos minimamente invasivos.

Os participantes desta pesquisa farão uso de uma solução de clorexidina 0,12% que será utilizada como sob a forma de bochechos. O uso desta solução provavelmente promoverá uma maior formação de cálculo, manchamento extrínseco dos dentes, bem como alteração temporária do paladar. Casos de outras reações adversas ao produto são raros. Ao final do experimento, com a cessação do uso da solução, o paladar voltará ao normal e todas as possíveis manchas e cálculos serão devidamente removidos. Havendo desenvolvimento de gengivite esta será tratada.

Participando deste experimento, você poderá estar contribuindo para uma melhor compreensão do efeito da clorexidina na presença de um biofilme supragengival. Evidências neste contexto são escassas na literatura. Lembre-se que sua participação é totalmente voluntária e você pode retirar-se do estudo e cancelar este consentimento esclarecido a qualquer momento sem que ocorra penalização ou prejuízo de qualquer natureza. Vale lembrar que a sua participação não acarretará em nenhuma despesa extra para você bem como não haverá qualquer tipo de compensação, seja financeira ou de qualquer outra forma.

É importante lembrar que você tem a garantia de poder tomar conhecimento e obter informações, a qualquer tempo, dos procedimentos utilizados neste estudo, bem como dos resultados, parciais e finais, desta pesquisa. Para tanto, você pode consultar o pesquisador responsável ou o comitê de Ética em Pesquisa da Ulbra Canoas-RS, com os respectivos endereços abaixo.

Pesquisador Responsável: C.D. Fabricio Batistin Zanatta

Endereço: Rua 17 de junho, 525/401 Telefone: (55) 30298387 ou (51) 84488484

Comitê de Ética em Pesquisa da Ulbra Canoas-RS:

Endereço: Rua Farroupilha, 8001 – Prédio 14 – Sala 224, Bairro São Luis Fone: (51) 477-9217

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu,..... declaro que, após convenientemente esclarecido(a) pelo pesquisador sobre os termos deste estudo e tendo entendido o que me fora explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa. Além disto, confirmo ter recebido cópia devidamente assinada deste consentimento.

Porto Alegre,.....dede 200.....

Assinatura do Sujeito da Pesquisa

Assinatura do Pesquisador

- Carimbo ou Nome Legível -

7. APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA



UNIVERSIDADE LUTERANA DO BRASIL PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E EXTENSÃO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS E ANIMAIS

TERMO DE AVALIAÇÃO

CEP-ULBRA 2006-095H

Título: AVALIAÇÃO CLÍNICA DA CLOREXIDINA SOBRE O BIOFILME SUPRAGENGIVAL FORMADO EM UM MODELO DE GENGIVITE EXPERIMENTAL EM HUMANOS										
Autor(a) e Pesq. Resp: Fabricio Batistin Zanatta										
P. Orient. Geraldo Augusto Chiapinotto										
Tipo de projeto: Pesquisa TCC X Dissertação Tese Grupo: III Ds. Pesq:										
Curso: Programa de Pós-Graduação em Periodontia Data: 13/03/2006										
Instituição onde será realizada: Ulbra Canoas/RS										
Número de Sujetos	No centro: 19	Projeto Multicêntrico:	<input checked="" type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Não	x	Nacional	<input type="checkbox"/> Sim	Coperação Estrangeira:	<input checked="" type="checkbox"/> x	<input type="checkbox"/> Não
Patrocinador:	Autora									
Data:	Reunião Ordinária de 30/03/2006									

O projeto de pesquisa, acima identificado, foi avaliado e aprovado pelo plenário do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos e Animais da ULBRA, por estar de acordo com as normas vigentes na Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde, e em suas complementares (Resoluções 240/97, 251/97, 292/99, 303/00, 304/00 e 340/04 do CNS/MS) que regulamentam a pesquisa envolvendo seres humanos.

O (a) pesquisador (a) responsável deverá apresentar relatório(s) anual(is) e final a este CEP, informando os resultados da pesquisa, bem como comunicar a data de conclusão da mesma.

Canoas, 10 de abril de 2006.

Liberdade
Dr. JOSÉ SCHNEIDER SANTOS
Coordenador do CEP-ULBRA

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)

[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)

[Baixar livros de Literatura Infantil](#)

[Baixar livros de Matemática](#)

[Baixar livros de Medicina](#)

[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)

[Baixar livros de Meio Ambiente](#)

[Baixar livros de Meteorologia](#)

[Baixar Monografias e TCC](#)

[Baixar livros Multidisciplinar](#)

[Baixar livros de Música](#)

[Baixar livros de Psicologia](#)

[Baixar livros de Química](#)

[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)

[Baixar livros de Serviço Social](#)

[Baixar livros de Sociologia](#)

[Baixar livros de Teologia](#)

[Baixar livros de Trabalho](#)

[Baixar livros de Turismo](#)