

CIP - Catalogação na Publicação

Otero dos Santos , Gabriela
Eficácia de duas soluções de clorexidina no
controle da formação inicial do biofilme supra e
subgingival / Gabriela Otero dos Santos . -- 2015.
52 f.

Orientador: Rui Vicente Oppermann.
Coorientadora: Patricia Weidlich.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia,
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Porto
Alegre, BR-RS, 2015.

1. clorexidina. 2. biofilme. 3. zona livre de
placa. I. Oppermann, Rui Vicente, orient. II.
Weidlich, Patricia, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
NÍVEL MESTRADO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA
PERIODONTIA

Dissertação

***EFICÁCIA DE DUAS SOLUÇÕES DE
CLOREXIDINA NO CONTROLE DA FORMAÇÃO
INICIAL DO BIOFILME SUPRA E SUBGENGIVAL.***

GABRIELA OTERO DOS SANTOS

Porto Alegre, agosto de 2015.

GABRIELA OTERO DOS SANTOS

EFICÁCIA DE DUAS SOLUÇÕES DE CLOREXIDINA NO CONTROLE DA
FORMAÇÃO INICIAL DO BIOFILME SUPRA E SUBGENGIVAL.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia, Nível Mestrado da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como pré requisito final para obtenção do título de Mestre em Clínica Odontológica Periodontia.

Orientador: Prof. Dr. Rui Vicente Oppermann

Porto Alegre, agosto de 2015.

Agradecimentos

Aos meus pais muito obrigados pelo apoio, pelos conselhos e incentivo. Obrigada pela educação que vocês me deram, pelos bons exemplos, pelo carinho e paciência. Um agradecimento especial a minha mãe que nesses dois anos de idas e vindas a Porto Alegre, de muita correria e muito trabalho sempre esteve ao meu lado me dando força e me ajudando nessa caminhada. A minha irmã Patricia que mesmo morando longe sempre esteve presente para me apoiar, obrigada mana.

A equipe de professores da Periodontia, em especial ao meu orientador Professor Rui Vicente Oppermann, obrigada por todo conhecimento compartilhado, pelos momentos de aprendizagem e pela oportunidade de aprender com um grupo tão sólido e comprometido com o ensino.

Agradeço a Professora Patricia Weidlich por ter me incentivado a fazer o mestrado assim que acabei a especialização em Periodontia. Obrigada pela tua atenção, dedicação, paciência e por tudo que aprendi nesses dois anos.

Aos meus queridos amigos e aos meus colegas do Mestrado, com certeza a amizade de vocês fez com que essa tarefa se tornasse um pouco mais fácil e alegre. Agradeço em especial a Fernanda Milanesi e a Bruna Greggianin, obrigada gurias pela amizade, carinho e companheirismo dentro e fora da pesquisa.

Ao meu namorado, obrigada por ter sido tão paciente e compreensivo nesses dois anos. Obrigada pelo carinho e amizade de sempre.

Agradeço a família Costa Saalfeld, pelo gesto carinhoso de abrir as portas do apartamento em Porto Alegre para eu ficar tantas vezes, com certeza vocês me ajudaram muito, serei sempre grata por esse gesto.

A Natalia Leonardo, minha amiga desde a graduação e também colega de mestrado, agradeço a tua amizade e carinho.

Agradeço aos meus colegas do SEST SENAT Pelotas pelo apoio e incentivo.

Agradeço aos alunos que participaram desse estudo com tanto empenho e comprometimento, obrigada a cada um de vocês.

Sumário

Resumo.....	4
Introdução	6
Biofilmes.....	7
Biofilme supragengival e subgengival.....	11
Controle químico do biofilme supragengival	12
Objetivo	18
Materiais e métodos	19
Desenho do estudo.....	19
1) Tipo de estudo.....	19
2) Considerações éticas.....	19
3) Cálculo amostral	19
Participantes.....	19
Procedimentos experimentais	20
Análise de dados.....	22
Resultados	23
Discussão.....	25
Anexos	36
ANEXO 1 – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA PARA PESQUISA EM HUMANOS	36
ANEXO 2 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	39
ANEXO 3 – FORMULÁRIO DE EXAME	41
ANEXO 4 – FORMULÁRIO PARA REGISTRO DE EVENTOS ADVERSOS	42
ANEXO 5 – ESCALA HEDÔNICA.....	43
Referências	44

Resumo

O objetivo do presente estudo foi comparar a capacidade de inibição da formação de biofilme supra e subgingival de duas soluções de clorexidina 0,12% uma com e outra sem álcool na sua formulação.

Materiais e métodos: esse foi um ensaio clínico cruzado randomizado, duplo cego, de três braços com 35 alunos de odontologia. Foram três períodos experimentais de quatro dias e dois períodos de *wash out* de 10 dias cada um. Os participantes foram randomizados para três grupos diferentes: Grupo 1- clorexidina a 0,12% com álcool (CLXcom) (Periogard® Colgate®), Grupo 2 - clorexidina a 0,12% sem álcool (CLXsem) (Periogard® sem álcool Colgate®) e o Grupo 3 – placebo (PLA). Durante os três períodos os procedimentos mecânicos de higiene bucal foram suspensos e os participantes bochecharam as formulações duas vezes ao dia, 15 ml por 1 minuto. A presença de biofilme e zona livre de placa foram registrados em 24, 48, 72 e 96 horas. Foram registrados os relatos de efeitos adversos ao longo dos períodos experimentais. As preferências por parte dos participantes das três formulações foram medidas por uma escala hedônica.

Resultados: bochechos com clorexidina, independente da presença de álcool, mantiveram um número significativamente maior de superfícies sem biofilme até a leitura final às 96 horas em relação ao placebo ($p < 0,01$). O desaparecimento da zona livre de placa no lapso decorrido entre 48 e 72 horas e entre 72 e 96 horas se mostrou associado mais ao placebo do que às formulações de clorexidina. Bochechos de clorexidina com álcool estiveram associados a maior ocorrência de eventos adversos (20) em relação ao uso de clorexidina sem álcool (10) ($p < 0,01$). Em relação à avaliação do gosto das substâncias, a clorexidina com álcool foi a solução com a pior avaliação sensorial.

Conclusão: As formulações de clorexidina apresentaram efeito inibitório na formação do biofilme supragengival e exclusão da zona livre de placa significativamente melhores do que o placebo, porém sem diferenças entre si. A solução de clorexidina com álcool esteve associada a um maior número de efeitos adversos e pior aceitação pelos usuários.

Palavras chave: biofilme, clorexidina, zona livre de placa

Abstract

The aim of this study was to compare the inhibitory effect on the supra and subgingival biofilm formation from two 0.12% chlorhexidine solutions with and without alcohol in the formulation.

Methods: A crossover, randomized, double-blind, three-arm clinical trial, was conducted among 35 dental students. Three four-day experimental periods and two ten days wash-out periods were carried out. Participants were randomized to three different groups: Group 1 chlorhexidine to 0.12% alcohol (CLXcom) (Periogard® Colgate), Group 2 - chlorhexidine 0.12% without alcohol (CLXsem) (Periogard® No Alcohol Colgate) and Group 3 - Placebo (PLA). During the three periods mechanical oral hygiene procedures were suspended and participants were instructed to use the mouthwash formulations twice a day, 15 mL for 1 minute. Plaque formation and plaque free zone were recorded at 24, 48, 72 and 96 hours.

Adverse events reported by the subjects were recorded and a facial hedonic scale was used in order to evaluate the taste perception.

Results: mouthwashes with chlorhexidine, independent of the presence of alcohol, maintained a greater number of surfaces without biofilm compared to placebo ($p < 0.01$). The extinction of plaque free zone between 48 and 72 hours and between 72 and 96 hours was associated to a greater extend with placebo as compared to the chlorhexidine formulations.

Regarding substances taste evaluation, chlorhexidine with alcohol showed the worst sensory evaluation, the worst taste. Chlorhexidine with alcohol was associated with a higher prevalence of reported adverse effects (18) compared to chlorhexidine without alcohol (9) ($p < 0,01$).

Conclusion: chlorhexidine formulations showed significantly better inhibitory effect on the formation of supragingival biofilm and plaque free zone extinction than placebo, with no differences between chlorhexidine solutions. The formulation of chlorhexidine with alcohol was associated with a greater number of adverse effects and worse acceptance by users

Introdução

As doenças gengivais são patologias infecto inflamatórias causadas por bactérias presentes nos biofilmes dentais e podem afetar indivíduos de todas as idades (Løe H, 1986). Elas são divididas em dois grupos de doenças, as gengivites e as periodontites. As gengivites são doenças que afetam o periodonto marginal e o acúmulo do biofilme supragengival de duas a três semanas pode levar ao seu aparecimento (LOE H, 1965). Já as periodontites são doenças destrutivas que acometem indivíduos suscetíveis, e geram perda de suporte periodontal (ligamento periodontal e osso alveolar) (Lindhe J, 1973). Para a instalação e progressão das periodontites as bactérias são causa essencial, mas não suficiente. Fatores do hospedeiro como hereditariedade e fatores ambientais como o tabagismo são tão importantes, assim como determinantes na ocorrência e gravidade da doença (Page *et al.*, 1997).

A doença periodontal afeta a grande maioria da população adulta, podendo ser considerada um problema de saúde pública (Sbordone e Bortolaia, 2003). A prevalência dessa doença varia nas diferentes regiões do mundo. No estudo populacional de Porto Alegre (Susin *et al.*, 2004), aproximadamente três de cada quatro indivíduos tinham pelo menos um dente com perda de inserção maior ou igual a cinco milímetros e mais da metade dos sujeitos tinham um ou mais dentes com perda de inserção maior ou igual a sete. Esse mesmo estudo mostrou que idade e fumo estão relacionados com a evolução da doença periodontal, assim como a condição socioeconômica mais baixa.

As doenças periodontais têm uma progressão variável de acordo com alguns fatores como, idade, gênero e nível sócio econômico entre outros. Haas examinou a mesma população do estudo anterior cinco anos após. Em relação ao gênero foi observado uma maior progressão da perda de inserção entre os homens. Indivíduos com mais de 30 anos de idade apresentaram um risco aproximadamente duas vezes maior de ter progressão da perda de inserção. Aqueles com baixa escolaridade tinham 53% mais chance de desenvolver perda de inserção comparado aqueles com alto nível de escolaridade (12 anos ou mais de estudos). Entre os fumantes, as mulheres apresentaram maior risco para progressão da perda de inserção comparado aos homens. Não foi encontrada associação significativa entre cor da pele, condição socioeconômica, cuidados com a saúde bucal e diabetes com a

progressão da perda de inserção periodontal depois de ajustes estatísticos (Haas *et al.*, 2014).

Biofilmes

O conceito de biofilme foi dado às 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) (Figura 1). Assim, o biofilme oral não deve ser entendido como bactérias orais que se comportam como uma entidade bacteriana isolada, e sim como uma ou mais comunidades de microrganismos agrupados em uma matriz extracelular de polímeros de origem bacteriana e do hospedeiro (Marsh, 2004; 2005).

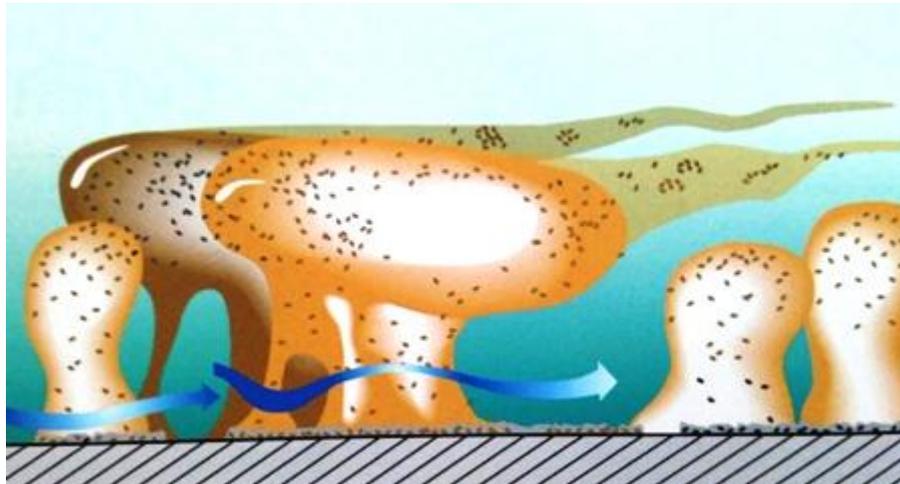


Figura 1 - Representação esquemática da estrutura do biofilme bacteriano descrito por Costerton *et al.*, 1994 (Costerton *et al.*, 1994). As estruturas em forma de torres e cogumelos representam as microcolônias que estão embebidas em uma matriz de exopolissacarídeos. As setas representam canais de água fazendo o transporte de nutrientes, metabólitos e sinalizadores intercoloniais (Brunetti, Fernandes e Moraes, 2007).

A maioria dos biofilmes são formados por múltiplas espécies e são denominados comunidades microbianas climax ou complexas. Os organismos que compõem essas comunidades não são meramente vizinhos passivos, eles estão envolvidos numa grande interação metabólica e molecular. Estas interações podem ser essenciais para o crescimento, sobrevivência e fixação das espécies em algum local, permitindo organismos de persistir em lugares que muitas vezes parecem ser ambientes hostis. Este estilo de vida em comunidade fornece enormes vantagens potenciais para os organismos nela presente. Dentre essas vantagens está o

aumento da resistência ao estresse ambiental, a agentes antimicrobianos e as defesas do hospedeiro (Shapiro, 1998).

Os biofilmes proporcionam proteção às espécies colonizadoras, já que fatores ambientais como componentes do sistema de defesa do hospedeiro e outras substâncias potencialmente tóxicas às bactérias, como antimicrobianos, tem seu acesso dificultado ou impedido ao interior dos biofilmes (Costerton, 1999). A resistência à ação dos antimicrobianos está relacionada com a matriz de exopolissacarídeos que tem mecanismos próprios para este fim. Íons ou agentes químicos podem ser neutralizados antes de atingir as camadas mais profundas do biofilme, já que a matriz intermicrobiana funciona como uma resina onde ocorrem trocas iônicas capazes de reagir e neutralizar tais agentes (Donlan e Costerton, 2002). Além disso, enzimas extracelulares com betalactamases e formaldeído dehidrogenase podem ser represadas e mantidas em altas concentrações na matriz, o que inativa a ação de alguns antimicrobianos. Nesse contexto, o biofilme também oferece proteção contra a invasão de microrganismos exógenos (Brook, 1989). Outro mecanismo proposto para a resistência antimicrobiana dos biofilmes seria o crescimento mais lento das células bacterianas associadas a biofilmes comparado as células planctônicas e isso tornaria as bactérias dos biofilmes menos suscetíveis aos antimicrobianos.

Assim, organizando-se em um biofilme, torna-se possível a colonização e o crescimento bacteriano em inúmeras estruturas duras da cavidade bucal como dentes, restaurações, próteses e implantes (Socransky e Haffajee, 2002).

Todas as superfícies da boca são cobertas por uma camada de moléculas, de origem predominantemente salivar denominada de película adquirida. As primeiras bactérias colonizadoras aderem-se a essa película. Inicialmente, essas espécies pioneiras estão aderidas as superfícies de forma reversível. Essa adesão pode se tornar permanente através de interações estereoquímicas fortes entre as adesinas das bactérias e receptores complementares da película adquirida. Esses colonizadores iniciais são geralmente estreptococos, e à medida que crescem, modificam o ambiente local tornando as condições adequadas para a colonização por organismos mais exigentes. Colonizadores secundários por coadesão se ligam aos receptores de bactérias já aderidas e, gradualmente, a diversidade do biofilme aumenta ao longo do tempo para formar uma comunidade de múltiplas espécies. As bactérias aderidas sintetizam uma variedade de polímeros extracelulares para

formar a matriz do biofilme, além de comunicarem-se entre si e interagirem sinergicamente e antagonicamente (Do, Devine e Marsh, 2013). A matriz extracelular abriga um sistema circulatório primitivo, que permeia o interior do biofilme e proporciona a troca de nutrientes, metabólitos e moléculas sinalizadoras entre as diferentes colônias. Espécies podem interagir tanto no compartilhamento da produção de nutrientes, onde uma espécie produz nutrientes para outra, quanto na remoção de produtos metabólitos inibidores ou tóxicos que geralmente é possibilitado pelo aproveitamento destes produtos tóxicos por outras bactérias (Bryers, 1993).

Dessa forma, se medidas mecânicas e/ou químicas forem empregadas corretamente, impedindo o acúmulo e organização das bactérias na superfície dental, o controle do biofilme será atingido. No entanto, falhas nestas medidas podem levar a formação de um biofilme bacteriano patogênico podendo levar ao desequilíbrio no processo saúde-doença nos tecidos moles e duros (Oppermann e Rosing, 1999).

O biofilme dentário está envolvido na etiologia das doenças mais comuns da cavidade oral, a cárie e as doenças periodontais. Os diferentes estágios do processo saúde doença resultam em ambientes distintos para o desenvolvimento dos biofilmes supra e subgengival, dessa forma torna-se importante conhecer a composição dos biofilmes. Nesse contexto, Socransky *et al.*, em 1998 descreveram a presença de cinco complexos microbianos principais observados em amostras de biofilme subgengival de 25 adultos sem periodontite e 160 com periodontite. O “complexo vermelho” composto pelas espécies *Bacteroides forsythus*, *Porphyromona gingivalis* e *Treponema denticola* foi fortemente relacionado com o aumento da profundidade de bolsa e sangramento à sondagem. Esses três microrganismos são reconhecidos atualmente como os principais agentes etiológicos da periodontite do adulto. O “complexo laranja” parece preceder a colonização do complexo vermelho, ele é composto por diversas espécies de *Fusobacterium*, *Prevotella* e *Campylobacter* e tem papel importante na patogênese da doença periodontal. Os outros três complexos o “verde”, o “amarelo” e o “roxo” são compostos por espécies consideradas benéficas como *Streptococcus* e *Actinomyces* e demonstraram associação entre si e menor associação com os outros dois complexos (Socransky *et al.*, 1998).

Uma comparação entre a proporção desses complexos microbianos no biofilme supra e subgingival de pacientes com e sem doença periodontal foi realizada por Ximenes *et al.*, no ano de 2000 (Figura 2). A maior quantidade de bactérias foi observada no biofilme supragengival de indivíduos com doença periodontal e a menor quantidade no biofilme subgingival de pacientes periodontalmente saudáveis. Em relação a composição do biofilme, foi encontrada uma maior proporção de espécies dos complexos “vermelho” e “laranja” e uma menor proporção de espécies de *Actynomices* nos pacientes com periodontite em comparação a pacientes sem doença periodontal. Patógenos periodontais do complexo vermelho e laranja foram encontrados em maior quantidade no biofilme subgingival de indivíduos com periodontite. Os autores concluíram que a principal diferença entre o biofilme supra e subgingival, assim como entre indivíduos com e sem doença periodontal estavam na proporção e na extensão dos níveis de *Actynomices* e dos complexos “vermelho” e “laranja” (Ximénez-Fyvie, Haffajee e Socransky, 2000).

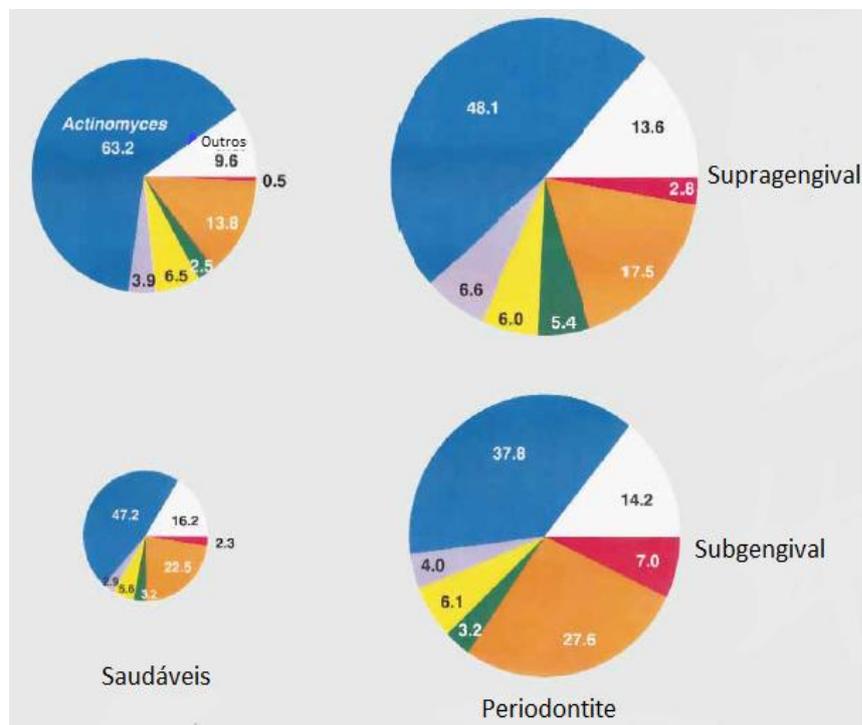


Figura 2 - Proporção de espécies bacterianas nas amostras de biofilme supra e subgingival de 22 indivíduos com saúde periodontal e 23 indivíduos com periodontite. As espécies foram agrupadas de acordo com os complexos microbianos descritos por Socransky *et al.*, (1998). O grupo azul é constituído por cinco espécies de *Actynomices* (Ximénez-Fyvie, Haffajee e Socransky, 2000)

Biofilme supragengival e subgengival

O estabelecimento e a progressão de formas destrutivas da doença periodontal estão intimamente relacionados com a presença do biofilme subgengival (Marsh, Moter e Devine, 2011). Esse biofilme deriva do biofilme supragengival e entre eles há uma relação estreita (Jakubovics e Kolenbrander, 2010).

Dessa forma, Weidlich *et al.*, (2001) avaliaram a formação do biofilme supragengival na área dentogengival e sua relação com o início da formação do biofilme subgengival. Os resultados mostraram que após 24 horas de acúmulo de biofilme formou-se uma delgada linha do mesmo ao longo da margem gengival. Junto a essa linha, separando a gengiva marginal do biofilme, observou-se a presença de uma área ausente de biofilme a chamada Zona Livre de Placa. No período de 48 a 72 horas a microbiota formou-se mais em direção incisal do que apical, o que permitiu a presença da ZLP. Depois de 96 horas a maior parte das superfícies não apresentou ZLP (início da formação do biofilme subgengival), de tal maneira que clinicamente havia um contato entre a gengiva e o biofilme supragengival, e concomitantemente o crescimento da microbiota em direção coronal. Ao dividir a superfície vestibular em terços o desaparecimento da ZLP foi maior nas áreas proximais do que no terço médio. A proporção de áreas com ZLP foi estatisticamente diferente só depois de 96 horas, comparado com os outros períodos, em áreas proximais. O mesmo estudo por meio de microscopia de varredura observou projeções de biofilme em direção gengival nas áreas proximais após 72 horas de acúmulo de placa. Além disso, houve aumento de volume do fluido crevicular, em conjunto com a migração coronal da margem gengival, devido ao edema essas mudanças possivelmente levaram a formação de biofilme subgengival (Weidlich, Lopes de Souza e Oppermann, 2001).

Essas observações reforçam a importância da compreensão dos mecanismos de formação do biofilme supragengival e do seu significado para o ambiente subgengival. Nesse sentido o estudo de Gomes *et al.*, (2007) ilustra clinicamente a relação muito próxima entre um adequado controle do biofilme supragengival e as condições encontradas subgengivalmente. O estudo teve por objetivo avaliar os efeitos clínicos do controle da placa supragengival sobre os sinais clínicos periodontais de fumantes e não fumantes. O mesmo mostrou que o controle do biofilme supragengival melhorou significativamente os parâmetros clínicos

associados à gengivite (sangramento gengival e índice da placa) e à periodontite (sangramento a sondagem, profundidade de sondagem e perda de inserção) (Gomes *et al.*, 2007). A mesma autora em 2008 avaliou o efeito do controle estrito do biofilme na microbiota subgengival e encontrou uma redução significativa no número de bactérias do biofilme subgengival tanto em fumantes como em não fumantes (Gomes *et al.*, 2008).

Haffajee *et al.*, (2003) avaliou o efeito da remoção do biofilme supragengival, em conjunto com terapias periodontais diferentes sobre a composição do biofilme subgengival em diferentes populações. Eles concluíram que a remoção meticulosa do biofilme supragengival tem efeitos benéficos sobre os parâmetros clínicos da doença periodontal e sobre a natureza da microbiota que coloniza tanto acima como abaixo da margem gengival e apropriadamente tem sido um foco importante na prevenção e controle das doenças dentais, particularmente a doença periodontal (Haffajee *et al.*, 2003).

Esses estudos corroboram a importância reconhecida de um adequado controle do biofilme supragengival para o reestabelecimento e manutenção da saúde periodontal (Haffajee *et al.*, 2003; Axelsson, Nyström e Lindhe, 2004).

Controle químico do biofilme supragengival

Diversas substâncias como clorexidina, óleos essenciais, triclosan e cloreto de cetilperidínio são utilizadas para o controle do biofilme oral. Dentre estes, a clorexidina sem dúvida é o agente antimicrobiano mais estudado e eficaz no controle químico do biofilme dental, sendo considerado o padrão ouro para o controle do biofilme supragengival (LANG e BRECX, 1986; Addy, Jenkins e Newcombe, 1990; Jones, 1997).

A clorexidina é uma bisbiguanida catiônica, com uma ampla atividade antibacteriana, baixa toxicidade em células de mamíferos, e uma elevada afinidade com a pele, mucosa e membranas. Seu mecanismo de ação inclui dano direto ao interior da membrana citoplasmática. Sendo bacteriostática a baixas dosagens e bactericida em concentrações elevadas (DAVIES *et al.*, 1954).

Suas vantagens não residem apenas na sua propriedade antimicrobiana, mas também na sua propriedade conhecida como substantividade, isto é, tempo de permanência ativa na cavidade bucal, de aproximadamente 12 horas, e que é

explicada pela sua natureza dicatiônica. 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 os dentes. Desta forma, ela exercerá uma ação bactericida inicial imediatamente depois do bochecho, combinada com uma ação bacteriostática prolongada (Bonesvoll e Gjermo, 1978).

O uso de soluções orais contendo clorexidina tem, no entanto, eventos adversos. Manchamento de dentes, restaurações, próteses e língua, alterações do paladar principalmente para alimentos salgados e formação de cálculo supragengival estão dentre os eventos adversos mais comumente relatados pelos pacientes. Dentre os eventos raros estão tumefação reversível dos lábios ou glândulas parótidas, descamações na mucosa oral, urticária, dispneia e choque anafilático (Flötra *et al.*, 1971; Okano *et al.*, 1989; Ciancio, 1995). Dentre estes eventos, o manchamento dental destaca-se como a principal queixa por parte dos pacientes sendo o principal fator limitante do uso da clorexidina por períodos prolongados (Albandar, Gjermo e Preus, 1994).

Existem diferentes formulações de clorexidina no mercado, entre elas está a clorexidina sem álcool, a qual foi criada com o intuito de reduzir os efeitos causados pelo álcool, como a sensação de queimação da mucosa oral e de boca seca, o possível efeito carcinogênico e o efeito de deterioração produzido sobre as resinas compostas (Winn *et al.*, 1991; Penugonda *et al.*, 1994; Elmore e Horwitz, 1995; Shapiro, Castellana e Sprafka, 1996).

A presença de álcool em enxaguatórios tem sido analisada quanto a uma possível relação entre seu uso diário e o desenvolvimento de câncer orofaríngeo. Estudos mais antigos reportam associações positivas. Resultados de estudos de caso controle concluíram que o uso de enxaguatórios orais contendo álcool aumentaria o risco de câncer bucal (Winn *et al.*, 1991; Guha *et al.*, 2007). McCulloch e Farah, em sua revisão da literatura, concluíram que existe evidência suficiente para aceitar a proposição de que enxaguatórios bucais com álcool contribuem para o aumento do risco de desenvolvimento de câncer de boca e ainda recomendam que o uso de enxaguatórios bucais contendo álcool deve ser restrito ao uso por períodos curtos (McCullough e Farah, 2008).

Contudo, alguns estudos estão em conflito com as conclusões acima descritas. Revisões sobre o mesmo tema concluíram que as evidências

epidemiológicas disponíveis não suportam uma ligação entre o uso de enxaguatórios bucais contendo álcool e câncer bucal (Elmore e Horwitz, 1995; Cole, Rodu e Mathisen, 2003; La Vecchia, 2009).

Uma metanálise mais recente investigou a relação entre antissépticos orais contendo álcool e câncer bucal. O estudo não encontrou associação significativa entre o uso desses e o risco de câncer bucal, como também não encontrou um aumento significativo no risco com o aumento da frequência do uso diário de enxaguatórios contendo álcool (Gandini *et al.*, 2012).

Independente da existência de evidência científica quanto às possíveis correlações entre o uso diário de enxaguatórios contendo álcool e câncer orofaríngeo pode-se observar que o mercado tem se valido desse questionamento para o lançamento de produtos alternativos onde a ausência de álcool é a principal chamada. Mesmo marcas tradicionais têm lançado produtos com e sem álcool como é o caso do Listerine produzido pela Johnson & Johnson.

No Brasil a clorexidina é comercializada em concentrações de 0,12% com álcool (Periogard®, Noplak®, Perioplak®) e clorexidina 0,12% sem álcool (Periogard®, Noplak Sem Álcool®, Noplak Max®, Cariax Gingival®, PerioKin®, Perio Therapy®, Kin Forte®). O álcool é utilizado em colutórios orais como solvente de outros ingredientes e como agente antisséptico (Overholser *et al.*, 1990). Além disso, o álcool é importante para estabilidade e atividade do produto, uma vez que ele pode evitar a sua contaminação (Vigeant *et al.*, 1998). As formulações com clorexidina livres de álcool muitas vezes trazem outros ingredientes que tentam estabilizar e conservar a solução e por isso estas formulações de clorexidina para uso oral com e sem álcool vêm sendo testadas. Trata-se, portanto, de novas formulações com o mesmo princípio ativo, porém, sem a necessária evidência de eficácia específica para essas novas formulações. Por essas razões não é possível transferir de pronto os resultados clínicos bastante reconhecidos da formulação contendo álcool para a nova formulação sem álcool. Avaliando o que a literatura apresenta, observa-se inconsistência a respeito do efeito da solução de clorexidina sem álcool na formação de biofilme oral.

Arweiler *et al.*, (2006) realizaram um estudo clínico cruzado que teve como objetivo avaliar as propriedades antibacterianas e de inibição de placa de duas composições diferentes de clorexidina a 0,2% comparadas a um controle negativo. Vinte e um voluntários interromperam o controle mecânico diário do biofilme e

bochecharam duas vezes ao dia 10 ml de solução de clorexidina com álcool ou sem álcool (contendo substância para reduzir manchamento dentário) ou solução placebo. O Índice de placa e a vitalidade bacteriana foram avaliados em 24 e 96 horas de acúmulo de biofilme e a área de placa apenas em 96 horas. Comparando a solução livre de álcool com o placebo houve uma redução do índice de placa de 37% após 96 horas de acúmulo de biofilme ($p < 0,001$). A solução contendo álcool mostrou redução significativamente maior no índice de placa após quatro dias, 73%, em comparação com a solução placebo ($p < 0,001$). Em relação à área de placa, a redução provocada pelo uso da solução sem álcool foi de 43%, enquanto que este parâmetro na solução com presença de álcool foi de 75% ($p < 0,001$). O uso de solução de clorexidina com álcool provocou redução significativa na vitalidade bacteriana em comparação com placebo. Quando se comparou a clorexidina sem álcool ao placebo a redução na vitalidade bacteriana não foi significativa.

Já Leyes Borrajo *et al.*, (2002) avaliaram a eficácia de duas soluções de clorexidina 0,12% versus placebo. Este estudo duplo cego em paralelo com 96 pacientes testou uma solução placebo e três colutórios orais contendo: (1) digluconato de clorexidina 0,12%, fluoreto de sódio a 0,05% e etanol 11%; (2) digluconato de clorexidina sem álcool e (3) solução placebo. Índice de placa e sangramento papilar foram avaliados no exame inicial, aos 14 e aos 28 dias de estudo. Os pacientes foram orientados a escovar os dentes com o dentifrício e a escova de sua preferência. Os valores para o índice de placa aos 14 e 28 dias nos grupos de clorexidina (1 e 2) foram significativamente menores quando comparados com a solução placebo. No entanto, não houve diferença quando comparadas as duas soluções contendo clorexidina entre si. O mesmo comportamento foi mostrado para o índice de sangramento papilar. Tais resultados mostram comportamento semelhante de solução de clorexidina com e sem álcool no acúmulo de biofilme e na redução de inflamação gengival (Leyes Borrajo *et al.*, 2002).

Zimmer *et al.*, (2014) no ensaio clínico randomizado em paralelo compararam a eficácia de duas soluções de clorexidina sem álcool na redução do biofilme e da gengivite com uma solução de clorexidina com álcool. Os participantes foram randomizados para quatro grupos diferentes: 1) escovação duas vezes ao dia + bochecho com solução de clorexidina a 0,06% contendo 0,025% NaF e álcool (controle positivo); 2) escovação duas vezes ao dia + bochecho com a mesma solução de clorexidina descrita acima, porém sem álcool; 3) escovação duas vezes

ao dia + bochecho da solução de clorexidina a 0,06% com 0,025% NaF, 0,03% CPC e sem álcool; 4) apenas escovação duas vezes ao dia (controle negativo). O índice de placa de Quigley – Hein (QHI), o índice modificado de placa proximal (MPPI) e o índice de sangramento papilar (PBI) foram medidos no baseline e após oito semanas. Os bochechos testados (2 e 3) reduziram QHI e MPPI mais do que o controle negativo, mas em relação ao controle positivo nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada. Para o sangramento papilar nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os quatro grupos. Dessa forma, concluiu-se que a escovação combinada com qualquer um dos enxaguatórios utilizados é mais eficaz do que apenas a escovação sozinha para os índices de placa de Quigley – Hein e para o índice de placa proximal. Mas nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada entre as soluções de clorexidina com e sem álcool (Zimmer *et al.*, 2014).

O ensaio clínico randomizado cruzado duplo cego de Quyrinen *et al.*, de 2001 comparou quatro enxaguatórios orais contendo clorexidina: 1) clorexidina a 0,12% e etanol, 2) clorexidina a 0,2% e etanol, 3) clorexidina a 0,12% e fluoreto de sódio a 0,05% 4) Clorexidina a 0,12% e cetilperidínio a 0,05%. Sangramento gengival (índice de Muhlemann e Son), extensão de biofilme (Índice de Quigley e Hein) e vitalidade bacteriana foram avaliados no baseline, e após sete e onze dias de acúmulo de biofilme. Além disso, os eventos adversos relacionados ao uso dos colutórios orais assim como a percepção de gosto de cada participante do estudo foram avaliados por meio da escala visual analógica (EVA). Bochechos com clorexidina contendo fluoreto de sódio resultaram em uma formação significativamente maior de biofilme comparado as outras três soluções. Em relação ao sangramento gengival não houve diferença significativa entre as quatro soluções testadas. Quanto a vitalidade bacteriana a clorexidina com fluoreto de sódio mostrou-se significativamente inferior em relação as outras três soluções. A clorexidina contendo cetilperidínio foi a mais apreciada comparada as outras sendo essa diferença significativa. Em relação aos eventos adversos não houve diferença significativa quando comparado as soluções entre si. Os autores concluíram que este estudo indica que a nova solução de clorexidina a 0,12% contendo cetilperidínio a 0,05% e sem álcool tem um efeito anti-placa e anti-inflamatório eficaz. Os autores concluem também que esse estudo indica que a solução de clorexidina contendo cetilperidíneo tem um efeito anti-placa

comparável ao da solução de clorexidina a 0,2% contendo álcool (Quirynen *et al.*, 2001).

Pode-se observar que os estudos não são conclusivos o que reforça ainda mais a necessidade de testar as diferentes formulações em diferentes circunstâncias clínicas. Nesse sentido a comparação de ambas as formulações na capacidade de inibição da formação do biofilme subgengival parece ser justificada entre outras razões, pela importância que a correlação entre biofilmes supra e subgengival tem para o estabelecimento e progressão das doenças periodontais. Maliska *et al.*, (2006) desenvolveram um método para avaliar a formação de biofilme subgengival relacionado à presença/ausência de uma zona livre de placa entre o biofilme que se forma e a margem gengival durante os primeiros dias de formação desses depósitos (Maliska *et al.*, 2006). A hipótese deste estudo é que a formulação de clorexidina a 0,12% sem álcool terá menor efeito inibitório na formação do biofilme supragingival e sua extensão subgengival em relação ao uso de solução de clorexidina 0,12% com álcool.

Objetivo

O objetivo do presente estudo foi comparar a capacidade de inibição da formação de biofilme supra e subgengival de duas soluções de clorexidina a 0,12% uma com e outra sem álcool na sua formulação.

Materiais e métodos

Desenho do estudo

1) Tipo de estudo

O presente estudo é um ensaio clínico cruzado randomizado, duplo cego, de três braços e foi desenvolvido na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

2) Considerações éticas

O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética para Pesquisa em Humanos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Anexo 1). Os indivíduos foram incluídos após a leitura e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 2). O número CAAE (Certificado de Apresentação para Apreciação Ética) é 40236514.3.0000.5347.

3) Cálculo amostral

Com base no estudo de Arweiler *et al.*, de 2006 considerou-se 37% a redução de formação de biofilme com uso de solução de clorexidina sem álcool e 73% com o uso da solução de clorexidina com álcool (Arweiler *et al.*, 2006). A estimativa de tamanho de amostra foi de 29 pacientes, com uso do software GPower 3.1, e o número final de indivíduos incluídos foi de 35 pacientes, considerando-se taxa de atrição de 20%.

Participantes

Um total de 35 estudantes da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul participou do estudo (18 mulheres, 14 homens, média de idade e desvio padrão $22,5 \pm 3,2$). Os critérios de inclusão para o estudo foram: ter idade entre 18 e 40 anos, não ser fumante; ter disponibilidade para três períodos de quatro dias de investigação mais dois períodos de dez dias de *wash out*; ter boa saúde geral e no mínimo 20 dentes permanentes naturais (excluindo-se terceiros molares) incluindo dentes anteriores superiores e inferiores bem como primeiros pré-

molares; dentes experimentais (14 a 24) sem nenhuma restauração, banda ortodôntica, irregularidades anatômicas, recessão, gengivite (avaliada pelo Índice de Sangramento Gengival de Ainamo & Bay, 1975) e/ou periodontite (perda de inserção clínica e sangramento periodontal); não apresentar tumor (es) dos tecidos moles ou duros da cavidade bucal a partir de avaliação clínica; não ter ingerido antibióticos em qualquer momento durante o mês anterior a entrada no estudo; não estar grávida ou amamentando e não ter história de alergia aos produtos de higiene bucal ou seus ingredientes.

Procedimentos experimentais

O presente estudo ocorreu entre Abril e Maio de 2015, sendo três períodos experimentais de quatro dias cada, intercalados por 10 dias de *wash out* (Figura 3). Os participantes foram randomizados para três grupos diferentes: Grupo 1- clorexidina a 0,12% com álcool (CLXcom) (Periogard® Colgate®), Grupo 2 - clorexidina a 0,12% sem álcool (CLXsem) (Periogard® Sem Álcool Colgate®) e o Grupo 3 – placebo (PLA). A randomização foi realizada por meio do site www.randomization.com por um pesquisador não envolvido no exame dos pacientes (FCM). A tabela de randomização foi mantida sob sigilo ao longo de toda parte experimental. O pesquisador responsável pela alocação também realizou a distribuição e identificação dos produtos nos frascos. As formulações experimentais foram distribuídas em frascos individuais com 15 ml cada. Os participantes recebiam diariamente dois frascos opacos identificados com código alfanumérico de seis dígitos a fim de manter a alocação sob sigilo. O examinador (GOS), assim como os participantes não eram informados sobre a substância utilizada em cada um dos três períodos. A solução placebo tinha cor, cheiro e gosto semelhantes aos das soluções de clorexidina e foi manipulada por encomenda na farmácia Uso Indicado (Pelotas-RS) com a seguinte formulação: corante azul brilhante QS, glicerina 5%, metilparabeno 0,18%, flavorizante menta 6% e água QSP.

Antes do início de cada período experimental procedeu-se a evidenciação do biofilme de 14 a 24 com o uso de fucsina básica (ReplanicT, Iodontec, São Paulo) aplicada com uma bolinha de algodão. Após 30 segundos os participantes realizaram um bochecho com água e o biofilme evidenciado foi removido com o auxílio de taça de borracha, pasta profilática PertX (SSWhite, Rio de Janeiro) e fio

dental. Na sequência os indivíduos foram orientados a não escovar ou passar fio dental de 15 a 25. Nos outros dentes os procedimentos de escovação mais fio dental foram liberados com o uso do dentífrico Sorriso® (Colgate Palmolive®) disponibilizado pela pesquisa. Os participantes foram instruídos a bochechar somente a substância disponibilizada pelo estudo e toda a quantidade fornecida (15ml), de 12 em 12 horas, por 01 minuto e não comer ou beber por 30 minutos após o uso das soluções.

Os dentes teste foram avaliados em 24, 48, 72 e 96 horas de acúmulo de biofilme no primeiro período (P1). Para essa avaliação foi utilizado um sistema de classificação que descreve o processo de formação do biofilme até a extinção da zona livre de placa (ZLP), proposto por Maliska *et al.*, 2006. Tal parâmetro clínico baseia-se nos seguintes critérios para avaliar a ZLP (Figura 4): critério zero; ausência de placa e ZLP, critério um presença de placa evidenciada e presença de ZLP e critério dois; formação inicial do biofilme subgingival (presença de placa evidenciada e ausência de ZLP) (Maliska *et al.*, 2006). Para conduzir o estudo um examinador foi previamente treinado e calibrado por um examinador experiente (PW) para medir os critérios descritos acima, sendo o Coeficiente Kappa intraexaminador de 0,81 e interexaminador de 0,85.

Durante os três períodos experimentais os dentes teste eram lavados com água, o biofilme evidenciado com fucsina básica, e após 30 segundos os dentes eram novamente lavados e então secados com jato de ar e a região isolada com roletes de algodão. Na sequência, utilizava-se um lápis cópia para cada participante com o objetivo de marcar duas referências na gengiva vestibular de 1 a 2 mm apicalmente a margem gengival, dividindo a superfície vestibular de forma longitudinal em três terços: mesio vestibular, vestibular e disto vestibular. A partir desse momento as três áreas marcadas em cada dente estavam prontas para serem avaliadas pelo examinador principal (GOS). Os achados clínicos eram registrados em um formulário específico por um auxiliar (Anexo 3).

Após o exame das 96 horas do P1 era realizada profilaxia profissional e iniciava-se o período de 10 dias de *wash out*. Após esses 10 dias o estudo continuou com o período dois (P2) e após o segundo período de *wash out* continuou com o período três (P3), intercalando as três soluções de acordo com o esquema de uso selecionado inicialmente.

Ao longo de todo o estudo os efeitos adversos relatados pelos participantes foram registrados em fichas específicas para tal evento (Anexo 4).

Ao fim de cada período experimental uma escala hedônica facial foi usada com o intuito de avaliar a percepção de gosto de cada indivíduo. A escala continha nove graduações que foram convertidas em valores numéricos. O termo desgostou extremamente foi convertido no número um, o termo desgostou muito foi convertido no número dois, o termo desgostou moderadamente no número três e assim por diante, passando pelo termo indiferente convertido no número cinco até o termo gostou extremamente, o qual foi convertido no número nove (Anexo 5) (Lim, 2011; Davanço *et al.*, 2013).

Análise de dados

Frequências médias de cada escore do Índice de Zona Livre de Placa para cada grupo em cada período experimental foram calculadas. Para avaliar a formação de biofilme subgingival, foi calculada a conversão dos escores 0 e 1 em escore 2 entre os períodos experimentais. As comparações foram realizadas com teste de Friedman e teste de McNemar. Correção de Bonferroni foi aplicada em casos de múltiplas comparações.

Todos os indivíduos completaram todos os períodos experimentais. Contudo, três indivíduos não aderiram ao protocolo do estudo e em função disso são apresentadas análises tanto por protocolo quanto por intenção de tratar. O desenho cruzado do estudo foi considerado na análise. Para avaliar o efeito de “*carry-over*” foram comparadas as frequências percentuais de escore 1 no tempo de 48 horas para cada período experimental com teste de Friedman. A contagem de indivíduos com presença/ausência de eventos adversos ao longo do estudo foi comparada com teste Q de Cochran e teste de McNemar. As médias para escala hedônica facial foram calculadas para cada solução e comparada através de ANOVA e teste de Tukey. Para análise foi utilizado o software SPSS v.18.0 (SPSS Inc., Chicago, USA) e o nível de significância foi estabelecido em 5%.

Resultados

Os resultados demonstraram que bochechos com clorexidina, independente da presença de álcool, mantiveram um número significativamente maior de superfícies sem placa às 24 horas em relação ao placebo ($p < 0,01$). Dessa forma, 80,2% e 75,5% das superfícies apresentaram escore zero associado a bochechos com clorexidina com e sem álcool, respectivamente, enquanto que somente 33,6% das superfícies se encontravam nessa situação com o uso de placebo. Embora se tenha observado redução no número de escores zero ao longo do período experimental associado ao uso de clorexidina, as diferenças significativas observadas para com o placebo foram mantidas até a leitura final às 96 horas. Neste último tempo avaliado, houve diferenças significativas para ambas as formulações de clorexidina quando comparadas ao placebo ($p < 0,01$) porém, sem diferenças entre si (Tabela 1). Analisando as superfícies livres e proximais separadamente encontraram-se resultados semelhantes aos descritos acima para todos os tempos experimentais.

Também foi realizada análise por intenção de tratar, visto que três participantes não aderiram ao protocolo do estudo (Tabela 2). Um deles fez uso de clorexidina sem álcool e de placebo sob o efeito de amoxicilina e o outro fez uso de clorexidina com álcool e de placebo sob o efeito de amoxicilina. Ambas as medicações foram usadas para tratar amigdalite. O terceiro indivíduo fez uso de clorexidina com álcool no intervalo entre P2 e P3 em função de exodontia de terceiro molar, o que significa que não fez *wash out* entre o uso de clorexidina com e sem álcool. Esta análise considerou todos os 35 indivíduos e mostrou que os resultados de formação de biofilme foram semelhantes àqueles encontrados na análise por protocolo, exceto em 24 horas onde não houve diferença estatisticamente significativa na distribuição dos percentuais de escores 0, 1 e 2 entre as soluções de clorexidina.

As conversões de escores 0 e 1 para escore 2 estão apresentadas na figura 5. Entre 24 e 48 horas não houve diferença significativa entre as três soluções. Já no lapso decorrido entre 48 e 72 horas e entre 72 e 96 horas, um menor número de superfícies se transformou em escore 2 (presença de biofilme subgengival) durante o uso de bochechos com clorexidina, independente da presença do álcool, quando

comparado ao uso do placebo. Essa diferença entre as formulações de clorexidina e o placebo foi significativa ($p < 0,01$) tanto para o intervalo de 48 para 72 horas quanto para o intervalo de 72 para 96 horas. Na análise por intenção de tratar, os resultados de conversão de escores foram semelhantes aos resultados encontrados na análise por protocolo, conforme mostrado na figura 6.

Não houve diferença estatisticamente significativa para o percentual de escores 1 obtidos em cada período experimental para cada solução avaliada (Tabela 3).

Os eventos adversos mais frequentemente relatados pelos participantes foram queimação da boca, gosto amargo após o bochecho e perda do paladar, conforme descrito na tabela 4.

Ao analisar a presença ou ausência de relato de evento adverso após uso de cada solução, observou-se que doze indivíduos relataram a presença desses eventos no uso da solução placebo, dez participantes relataram evento adverso com uso da clorexidina sem álcool e vinte indivíduos relataram ter sentido algum efeito adverso após o uso da clorexidina com álcool (Tabela 5). Quando os indivíduos realizaram bochechos de clorexidina com álcool houve frequência significativamente maior de eventos adversos em relação ao uso de bochechos com clorexidina sem álcool ($p < 0,01$). Bochechos com a solução placebo não resultaram em diferenças na ocorrência de relato de evento adverso quando comparados aos bochechos com ambas as soluções de clorexidina.

Em relação à avaliação sensorial, a clorexidina com álcool foi a solução com o pior desempenho, ou seja, com o gosto menos agradável. A média da escala hedônica facial foi de 5,77 ($\pm 1,63$) para o placebo, 5,21 ($\pm 1,84$) para clorexidina sem álcool e 4,37 ($\pm 2,13$) para a clorexidina com álcool (Tabela 6). A diferença entre a clorexidina com álcool em relação às outras duas soluções foi estatisticamente significativa ($p = 0,007$).

Discussão

Os resultados do presente estudo mostraram que quando comparadas ao placebo ambas as formulações de clorexidina mostraram efeito inibitório significativo. Isso pode ser constatado tanto na manutenção de um percentual maior de superfícies sem biofilme (escore 0) como também por apresentar um percentual significativamente menor de superfícies com a presença do biofilme supragingival e ausência da zona livre de placa (escore 2). Após 96 horas 27,1% das superfícies sob o uso do placebo apresentavam escore 2 contra apenas 2,8% e 1,7% das superfícies sob o uso de clorexidina com álcool e sem álcool respectivamente. Os efeitos inibitórios da clorexidina sobre a formação do biofilme supragingival são amplamente reconhecidos (Løe e Schiott, 1970; LANG e BRECX, 1986; Jenkins, Addy e Wade, 1988; Ramberg *et al.*, 1992) o que lhe dá a condição de padrão-ouro para comparações com outros antissépticos (Jones, 1997). Os resultados do presente estudo estão em linha com os reportados por Maliska *et al.*, (2006). Esses autores compararam a solução de clorexidina contendo álcool com um placebo valendo-se do mesmo sistema de medição empregado no presente estudo (Maliska *et al.*, 2006). No presente estudo o percentual de escores 2, presença de biofilme supragingival e ausência de zona livre de placa, às 96 horas após o uso da formulação de clorexidina com álcool foi de 2,8% enquanto que no estudo de Maliska *et al.*, (2006) o mesmo foi de 3,4% (Maliska *et al.*, 2006). Os efeitos inibitórios observados para ambas as formulações de clorexidina ampliam o escopo de efeitos inibitórios da clorexidina incluindo a sua capacidade de inibir a formação de biofilme subgingival a partir do biofilme supragingival.

No presente estudo foram observadas diferenças significativas entre as duas formulações de clorexidina testadas. Essas diferenças foram significativas até a leitura de 72 horas. Porém, a presença de escores 2 (presença de biofilme e ausência de zona livre de placa) se deu apenas a partir da leitura de 72 horas e mesmo assim em uma proporção abaixo de 1% para ambas as formulações. Na leitura de 96 horas, já não foram observadas diferenças significativas nos resultados associados às duas formulações. Dessa forma, pode-se inferir que as diferenças significativas se deram na distribuição de superfícies sem biofilme e o relativo aumento proporcional de escores 1 (presença de biofilme e presença de zona livre

de placa). Quando se calculou a transformação de escores 0 e 1 em 2 as formulações apresentaram diferenças significativas para com o placebo mas não quando comparadas entre si. No seu conjunto esses resultados mostram que o efeito inibitório de ambas as soluções de clorexidina se deu nos primeiros dias do estudo baseado principalmente na manutenção de uma maior proporção de superfícies livres de biofilme. Entretanto, esse efeito não foi suficiente para produzir diferenças significativas na extinção da zona livre de placa e consequente formação do biofilme subgengival.

As diferenças significativas observadas entre as duas formulações estão de acordo com os resultados do estudo de Arweiler *et al.*,(2006). Esses autores também observaram maior redução na quantidade de biofilme supragengival bem como na extensão do mesmo com o uso da formulação contendo álcool. O efeito relatado, porém se deu ao longo das 96 horas de observação diferentemente do observado no presente estudo. É possível que diferenças metodológicas, principalmente na medição da presença e extensão do biofilme supragengival possam estar associadas a essa observação. Estudos com maior duração talvez sejam necessários para que se possa aferir o comportamento do biofilme sob os dois tipos de tratamento. Leyes Borrajo *et al.*, (2002), não encontraram diferença significativa entre as formulações de clorexidina com e sem álcool ao longo de 28 dias de observação. Entretanto, nesse estudo foi permitida a escovação dos dentes o que impede uma comparação mais direta de resultados (Leyes Borrajo *et al.*, 2002).

O desenho do presente estudo foi definido como cruzado a partir da natureza da substância testada, por ser de uso tópico, ter efeitos adversos reversíveis e de curta duração, além de permitir usar cada participante como seu próprio controle. Entretanto, a perda de participantes ao longo do estudo é uma das desvantagens deste desenho experimental. Considerando que três participantes quebraram o protocolo do estudo, foi realizada análise por protocolo e por intenção de tratar para mostrar o impacto da quebra de protocolo nos resultados. Os resultados mostram diferença na formação de biofilme somente em 24 horas, onde não houve diferença na composição dos escores 0, 1 e 2 nas duas formulações de clorexidina na análise por intenção de tratar. No presente estudo, a inibição da colonização subgengival é o ponto principal na comparação dos três tipos de tratamento. Nesse aspecto as duas análises, não apresentaram diferenças entre o uso de clorexidina com e sem

álcool. Estudos cruzados tem a limitação de que os resultados da segunda série podem ser influenciados por um efeito residual associado à primeira série experimental (*carry over effect*). No presente estudo o intervalo entre as séries foi de 10 dias. Esse tempo é considerado suficiente e aceito por diferentes autores (Herrera *et al.*, 2003; Arweiler *et al.*, 2006; Maliska *et al.*, 2006).

No presente estudo foi incluída uma avaliação dos eventos adversos relatados pelos participantes. Ao fim de cada exame durante os três períodos experimentais era perguntado a cada participante sobre o surgimento de algum evento adverso relacionado ao uso das três soluções e a descrição desses eventos era anotada por um auxiliar. O uso da solução de clorexidina contendo álcool esteve associado a uma prevalência significativamente maior de indivíduos relatando a presença de efeitos adversos se comparado com a solução sem álcool ou o placebo. É interessante observar que os participantes relataram a presença de efeitos adversos também para o uso da solução placebo em prevalência semelhante à da solução teste sem álcool. As soluções experimentais, com exceção do álcool apresentam formulação semelhante. Da mesma forma as três soluções têm em comum a presença de menta como edulcorante. A sensação de queimação relatada pelos participantes, em especial associada ao uso do placebo e clorexidina com álcool pode estar associada à presença desse aditivo que por sua vez pode se encontrar atenuado na formulação sem álcool da clorexidina. Em contraposição aos nossos resultados, o estudo de Quirynen *et al.*, 2001 mostrou ocorrência similar de eventos adversos entre formulações com e sem álcool (Quirynen *et al.*, 2001; Solís *et al.*, 2011). Outros dois estudos que avaliaram eventos adversos o fizeram com duas soluções de clorexidina sem álcool (Cortellini *et al.*, 2008; Solís *et al.* 2011), o que impossibilita realizar comparação direta com os resultados deste estudo.

Os participantes também demonstraram diferenças na aceitação das três formulações a partir da escala hedônica utilizada. Novamente a formulação de clorexidina com álcool recebeu uma avaliação significativamente pior daquela dada à formulação sem álcool ou placebo. Este resultado é corroborado por outros estudos, que também apontam para melhor percepção gustativa relacionada à formulação livre de álcool (Quirynen *et al.*, 2001; Van Strydonck *et al.*, 2005). O objetivo da avaliação sensorial é detectar diferenças entre os produtos baseado nas diferenças perceptíveis na intensidade de alguns atributos (FERREIRA *et al.*, 2000). Na medida em que a adesão a protocolos de uso de antimicrobianos se dá também

pelo grau de aceitação do paciente para com o uso do produto é inegável que uma formulação com a mesma eficácia clínica, menor número de efeitos adversos e maior aceitação terá maior possibilidade de uso como indicado (Addy, Jenkins e Newcombe, 1989).

De qualquer forma esses resultados juntamente com os resultados observados quanto à inibição da formação dos biofilmes apontam para o fato de que não se pode extrapolar resultados de uma formulação para outra contendo ingredientes semelhantes em apresentação diferenciada. Esses resultados também justificam que para além das comparações dos efeitos clínicos deve-se incluir uma análise comparativa dos efeitos adversos, bem como análises da aceitação por parte dos usuários das formulações propostas.

Conclusão

A formulação de clorexidina sem álcool mostrou efeito inibitório comparável à formulação com álcool tanto na formação do biofilme supragengival como também na exclusão da zona livre de placa. Ambas as formulações apresentaram resultados significativamente melhores que a solução placebo na inibição dos biofilmes bacterianos, entretanto, a solução de clorexidina com álcool esteve associada a um maior número de efeitos adversos e teve pior aceitação pelos usuários.

Tabela 1 – Análise por protocolo da frequência do percentual de escores 0, 1 e 2 para todas as superfícies dentárias de acordo com a solução utilizada (CLXcom – clorexidina com álcool, CLXsem – clorexidina sem álcool e PLA – placebo) e tempo experimental.

N=32

	Placebo (% médio de sítios)	CLXcom (% médio sítios)	CLXsem (% médio sítios)
24 horas			
0	33,6	80,2	75,5
1	66,4	19,8	24,5
2	0	0 * #	0 * #
48 horas			
0	9,2	65,1	54,5
1	90,4	34,9	45,5
2	0,4	0 * #	0 * #
72 horas			
0	2,8	47,6	41,6
1	80,1	51,5	58
2	17,1	0,9 * #	0,4 * #
96 horas			
0	2,8	32,9	34,7
1	70,1	64,3	63,6
2	27,1	2,8 *	1,7 *

* Diferença estatisticamente significativa em relação ao placebo (testes de Friedman e McNemar, $p < 0,01$).

Diferença estatisticamente significativa entre as soluções de clorexidina (testes de Friedman e McNemar, $p < 0,01$)

Tabela 2 – Análise por intenção de tratar da frequência do percentual de escores 0,1 e 2 para todas as superfícies dentárias de acordo com a solução utilizada (CLXcom – clorexidina com álcool, CLXsem – clorexidina sem álcool e PLA – placebo) e tempo experimental.

N=35

	Placebo (% médio de sítios)	CLXcom (% médio sítios)	CLXsem (% médio sítios)
24horas			
0	34,2	79,9	76,2
1	65,8	20,1	23,8
2	0	0 *	0 *
48horas			
0	9,9	65,5	54,9
1	89,9	34,4	45,1
2	0,4	0,1 * #	0 * #
72horas			
0	3,5	47,4	42,7
1	80,9	51,7	56,9
2	15,6	0,8 * #	0,4 * #
96horas			
0	3	33,7	36,7
1	69,8	63,3	61,7
2	27,2	3 *	1,6 *

* Diferença estatisticamente significativa em relação ao placebo

(testes de Friedman e McNemar, $p < 0,01$).

Diferença estatisticamente significativa entre as soluções de clorexidina

(testes de Friedman e McNemar, $p < 0,01$).

Figura 3 – Fluxograma do estudo.

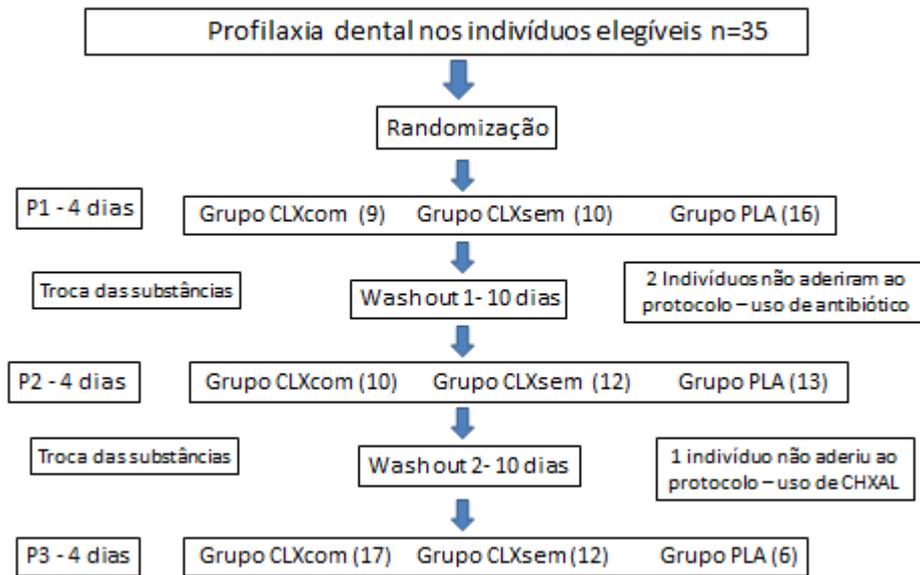
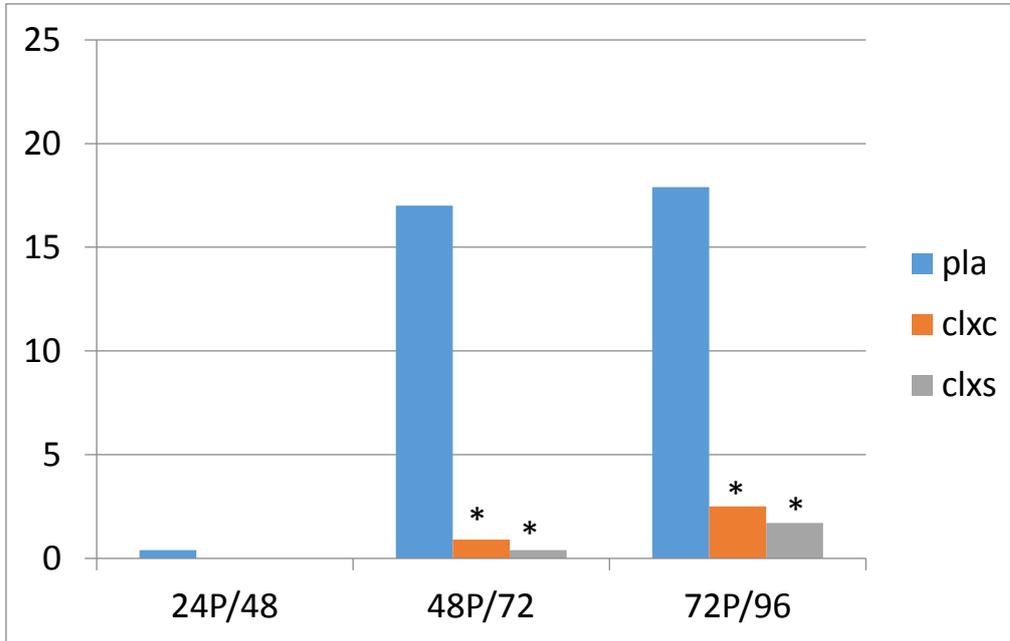


Figura 4 - Sistema de classificação

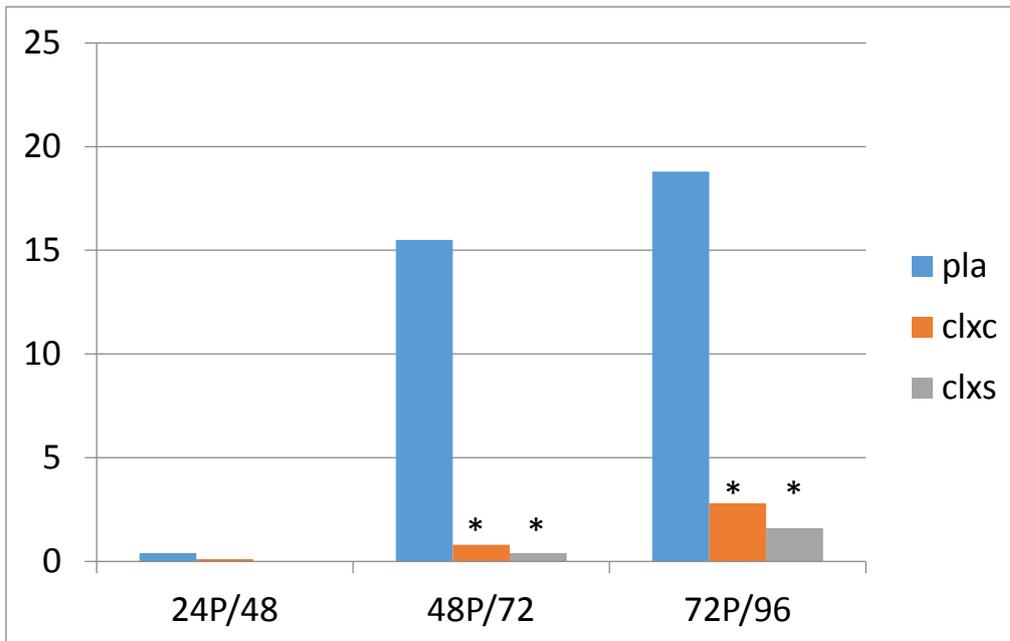


Figura 45– Análise por protocolo da transformação de escores 0 e 1 para dois em todas as superfícies dentárias de acordo com as soluções utilizadas e tempo experimental.



* Diferença estatisticamente significativa em relação ao placebo (testes de Friedman e McNemar, $p < 0,01$).

Figura 6 – Análise por intenção de tratar da transformação de escores 0 e 1 para dois em todas as superfícies dentárias de acordo com as soluções utilizadas e tempo experimental.



* Diferença estatisticamente significativa em relação ao placebo (testes de Friedman e McNemar, $p < 0,01$).

Tabela 3 – Frequência percentual de escores 1 em cada período do estudo no tempo experimental de 48 horas de acordo com cada solução.

	Placebo	CLXcom	CLXsem
Período 1	89.5	32.9	43.6
Período 2	90	36.3	45.9
Período 3	91.7	35.5	47
p*	0,2	0,08	0,09

* teste de Friedman

Tabela 4 – Frequência de relato de evento adverso durante o uso de cada uma das soluções avaliadas no estudo.

Evento adverso	PLA	CLXcom	CLXsem
Ausente	23	15	25
Queimação da boca	10	9	4
Gosto amargo após bochecho	0	3	1
Perda do paladar	1	3	1
Queimação e mau gosto	0	2	1
Mau gosto e perda de paladar	1	1	0
Queimação e perda de paladar	0	1	1
Queimação, mau gosto e perda de paladar	0	1	2
Total	35	35	35

Tabela 5 – Contagem de indivíduos com presença/ausência de eventos adversos ao longo do estudo de acordo com as soluções testadas: placebo (PLA), clorexidina com álcool (CLXcom) e clorexidina sem álcool (CLXsem)

Evento adverso	PLA	CLXcom	CLXsem	p*
Ausente	23	15	25	
Presente	12	20	10	0,013

* Diferença estatisticamente significativa da CLXcom em relação a CLXsem (testes Q de Cochran e McNemar).

Tabela 6 – Avaliação sensorial das soluções testadas: placebo (PLA), clorexidina com álcool (CLXcom) e clorexidina sem álcool (CLXsem).

	PLA	CLXcom	CLXsem	p*
Média (\pm dp)	5,77 \pm 1,63	4,37 \pm 2,13	5,21 \pm 1,84	0,007

* Diferença estatisticamente significativa da CLXcom em relação ao PLA e a CLXsem (testes de ANOVA e Turkey) .

Anexos

ANEXO 1 – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA PARA PESQUISA EM HUMANOS

	<p>UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL / PRÓ-REITORIA DE PESQUISA -</p>	
<p>PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP</p>		
<p>DADOS DO PROJETO DE PESQUISA</p>		
<p>Título da Pesquisa: Eficácia de duas soluções de clorexidina no controle da formação inicial de biofilme subgengival</p>		
<p>Pesquisador: Patricia Weidlich</p>		
<p>Área Temática:</p>		
<p>Versão: 2</p>		
<p>CAAE: 40236514.3.0000.5347</p>		
<p>Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL</p>		
<p>Patrocinador Principal: Financiamento Próprio</p>		
<p>DADOS DO PARECER</p>		
<p>Número do Parecer: 1.009.534</p>		
<p>Data da Relatoria: 19/03/2015</p>		
<p>Apresentação do Projeto:</p>		
<p>Retorno de diligência</p>		
<p>Projeto de mestrado</p>		
<p>Ensaio clínico cruzado randomizado, triplo cego</p>		
<p>Clorexidina é uma substância amplamente utilizada para o controle químico do biofilme oral sendo que, entre os eventos adversos, o manchamento do dentes é uma das principais reclamações pelos pacientes.</p>		
<p>Entre as diferentes formulações disponíveis no mercado, a clorexidina sem álcool apresenta menos efeitos adversos; entretanto, revisões sistemáticas indicam uma maior eficiência da formulação com álcool para assepsia da pele.</p>		
<p>O objetivo do presente estudo é avaliar a capacidade de inibição da formação de biofilme supra e subgengival de duas soluções de clorexidina 0,12% uma com álcool na sua formulação e a outra sem álcool na sua composição.</p>		
<p>Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro Bairro: Farroupilha CEP: 90.040-060 UF: RS Município: PORTO ALEGRE Telefone: (51)3308-3738 Fax: (51)3308-4085 E-mail: etica@propesq.ufrgs.br</p>		
<p>Página 01 de 03</p>		



UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO GRANDE DO SUL / PRÓ-
REITORIA DE PESQUISA -



Continuação do Parecer: 1.009.534

A estimativa de tamanho de amostra foi de 29 pacientes, com uso do software GPower 3.1, e o número final de indivíduos a incluir será de 35 pacientes, considerando-se taxa de atrição de 20%.

Os sujeitos elegíveis serão aqueles que se voluntariarem, a partir da leitura do cartaz de chamamento (Anexo 1) que será fixado nos corredores dos andares e das salas de espera das Clínicas Odontológicas da Faculdade de Odontologia da UFRGS.

Os indivíduos receberão raspagem supragengival e profilaxia profissional. A partir desse momento será feita a randomização dos sujeitos da pesquisa em três soluções:

- A) Clorexidina 0,12% sem álcool, Periogard sem álcool (grupo CHX)
- B) Clorexidina 0,12% e álcool, Periogard com álcool (grupo CHXAL)
- C) Solução placebo, manipulada a fim de não apresentar agente ativo e com sabor, cor e aroma semelhante aos das outras duas soluções

Todos os participantes serão submetidos a 3 períodos no estudo (1 período para cada solução). Para cada período, o participante será instruído a suspender o controle mecânico de placa nos dentes experimentais (8 dentes) por 96h e bochechar 15 ml do produto entre seus dentes por um minuto, de 12 em 12 horas, sendo avaliada a formação de biofilme a cada 24h bem como de possíveis efeitos adversos e achados clínicos.

Finalizado cada período (4 dias), os pacientes receberão profilaxia profissional e haverá um período de 10 dias (wash out) para iniciar o próximo período experimental.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a capacidade de inibição da formação de biofilme supra e subgengival de duas soluções de clorexidina 0,12% uma com álcool na sua formulação e a outra sem álcool na sua composição.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Adequados

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto foi avaliado e aprovado pela COMPESQ-ODO. A introdução, a metodologia, cronograma e orçamentos estão adequados, bem como o cartaz de convite aos participantes.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro
Bairro: Farroupilha CEP: 90.040-060
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3308-3738 Fax: (51)3308-4085 E-mail: etica@propesq.ufrgs.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO GRANDE DO SUL / PRÓ-
REITORIA DE PESQUISA -



Continuação do Parecer: 1.009.534

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Os pesquisadores modificaram o TCLE conforme solicitado pelo CEP.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado.

PORTO ALEGRE, 02 de Abril de 2015

Assinado por:
MARIA DA GRAÇA CORSO DA MOTTA
(Coordenador)

ANEXO 2 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nós gostaríamos de convidar você para participar de um estudo que estamos realizando aqui na Faculdade de Odontologia da UFRGS. O nome do estudo é "Eficácia de duas soluções de clorexidina no controle da formação inicial de biofilme subgingival" e esta pesquisa quer investigar se o uso de bochechos pode impedir ou tornar mais lenta a formação de placa bacteriana, que é um biofilme formado por micróbios que grudam nos dentes. Nesse estudo serão utilizados três bochechos diferentes, dois contendo clorexidina, sendo um com álcool e outro sem álcool e o terceiro bochecho será o placebo, substância essa com a mesma coloração, gosto e aspecto da clorexidina, porém sem o efeito ativo. Por favor, leia o termo de consentimento com atenção. Você pode fazer perguntas sobre o objetivo da pesquisa, o que nós iremos lhe pedir para fazer, os possíveis riscos e benefícios e qualquer outra coisa sobre a pesquisa ou sobre este documento que não esteja clara. Quando tivermos respondido todas as suas perguntas, você pode decidir se você quer participar do estudo ou não. Este processo é chamado "consentimento informado." Vamos dar-lhe uma cópia do formulário para seus registros.

Ao início do estudo, você irá às dependências da clínica sem ter escovado os dentes e sem ter usado qualquer outro procedimento de higiene oral por pelo menos doze (12) horas antes de sua visita agendada. Além disso, você não deve comer, beber ou fumar por quatro (4) horas antes de sua visita agendada. Seus dentes e gengivas serão examinados por um dentista, que usará um corante vermelho, usado como rotina para avaliar a presença de placa (micróbios que grudam nos dentes). Antes de você terminar a consulta, o dentista irá limpar e retirar todo o corante que permanecer nos seus dentes, bochechas e lábios. Você será instruído a utilizar apenas os produtos para escovar os dentes que serão fornecidos durante o estudo. Durante 4 dias, você terá consultas diárias com a nossa equipe e usará uma das soluções para bochecho que estamos avaliando. Neste período, você escovará todos os dentes, menos os oito dentes anteriores da arcada superior (dentes da frente da arcada de cima). Depois deste tempo você ficará 10 dias escovando normalmente todos os dentes, com a escova de dentes e o creme dental que serão fornecidos a você. Esse período de 4 dias, onde você bochechará uma das duas soluções que estamos avaliando, será repetido por mais duas vezes, sempre intercalado por um período de 10 dias. Sua alimentação não deverá ser modificada durante o tempo do estudo.

Os potenciais benefícios de sua participação no estudo são saber como está sua saúde bucal (depois do exame que faremos) e ser encaminhado para tratamento se este for o seu caso. Para outras pessoas, esta pesquisa poderá trazer informações sobre substâncias que podem ser colocadas nos cremes dentais, que ajudam a ter menos placa (micróbios que grudam nos dentes) e com isso ajudar no tratamento das doenças das gengivas. De um modo geral, os riscos da participação do estudo são os mesmos que os pacientes têm quando realizam tratamento odontológico de rotina. Você pode sentir sensibilidade nos dentes com uso de água fria ou alimento doce, e pode sentir seus dentes ásperos em algumas etapas do estudo. Pode haver alguma irritação da sua boca com o uso das pastas de dentes em questão, o que é raro porque estas pastas de dentes são vendidas nos supermercados nos dias de hoje. Os dentes sensíveis podem ser tratados com substâncias que o dentista aplica nos seus dentes, os dentes ásperos serão limpos e polidos ao final do estudo e se você tiver irritação da sua boca, o uso dos produtos será suspenso. O fato de você ter que ficar 4 dias sem higienizar os oito dentes anteriores por quatro dias pode levar a um acúmulo de biofilme o que poderá levar ao desenvolvimento de gengivite

(inflamação da gengiva), caso isso venha a ocorrer você receberá o tratamento correto e eficaz ao fim dos quatro dias de suspensão da higiene oral. Sempre que você achar que há alguma coisa de diferente com sua boca durante o estudo, você deve ligar para o telefone 3308 5318 para receber agendamento imediato de consulta com a equipe de pesquisa. Se você tiver algum problema ou qualquer dano relacionado a pesquisa, você deverá entrar em contato com a equipe de pesquisa pelo fone 3308 5318.

Se você decidir participar, as suas respostas serão apresentadas sem sua identificação, pois os questionários e todos os dados coletados serão numerados e codificados.

Se você tiver alguma dúvida, pode perguntar antes de se decidir. Não haverá qualquer custo para a sua participação no estudo. Haverá ressarcimento do valor da sua passagem de ônibus (ida e volta) para as consultas que você vier somente para participar deste estudo.

Sua assinatura abaixo significa que você entende e concorda com o acima, e afirma que você se voluntariou a participar de sua própria vontade. Além disso, você afirma que você é maior de dezoito (18) anos de idade, mas não mais do que quarenta (40) anos de idade e não está amamentando ou grávida, e que lhe foi dada a oportunidade de fazer perguntas sobre o estudo. Você pode se retirar deste estudo a qualquer momento sem prejuízo no que se refere ao seu tratamento dentro da Faculdade de Odontologia da UFRGS.

Data:

Nome e assinatura do participante

Assinatura do pesquisador

ANEXO 3 – FORMULÁRIO DE EXAME

Paciente _____

Período: P1 () P2 () P3 ()

Dente	24 horas			48 horas			72 horas			96 horas		
	DV	V	MV									
14												
13												
12												
11												
	MV	V	DV									
21												
22												
23												
24												

ANEXO 4 – FORMULÁRIO PARA REGISTRO DE EVENTOS ADVERSOS

Formulário para registro de eventos adversos (EA)

Indivíduo (número no estudo e iniciais):	
Descrição do EA	
Data de início	
Medidas adotadas	
Data de resolução	
Resultado	
Gravidade	
Seriedade	
Relacionamento com a medicação em estudo	
Ações tomadas	

Referências

Addy, M.; Jenkins, S.; Newcombe, R. Studies on the effect of toothpaste rinses on plaque regrowth. (I). Influence of surfactants on chlorhexidine efficacy. **J Clin Periodontol**, v. 16, n. 6, p. 380-4, Jul 1989. ISSN 0303-6979. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2760250> >.

_____. The effect of triclosan, stannous fluoride and chlorhexidine products on: (I) Plaque regrowth over a 4-day period. **J Clin Periodontol**, v. 17, n. 10, p. 693-7, Nov 1990. ISSN 0303-6979. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2262581> >.

Albandar, J. M.; Gjermo, P.; Preus, H. R. Chlorhexidine use after two decades of over-the-counter availability. **J Periodontol**, v. 65, n. 2, p. 109-12, Feb 1994. ISSN 0022-3492. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8158506> >.

Arweiler, N. B. et al. Differences in efficacy of two commercial 0.2% chlorhexidine mouthrinse solutions: a 4-day plaque re-growth study. **J Clin Periodontol**, v. 33, n. 5, p. 334-9, May 2006. ISSN 0303-6979. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16634954> >.

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**, v. 31, n. 9, p. 749-57, Sep 2004. ISSN 0303-6979. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15312097> >.

Bonesvoll, P.; Gjermo, P. A comparison between chlorhexidine and some quaternary ammonium compounds with regard to retention, salivary concentration and plaque-inhibiting effect in the human mouth after mouth rinses. **Arch Oral Biol**, v. 23, n. 4, p. 289-94, 1978. ISSN 0003-9969. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/278566> >.

Brook, I. Direct and indirect pathogenicity of beta-lactamase-producing bacteria in mixed infections in children. **Crit Rev Microbiol**, v. 16, n. 3, p. 161-80, 1989. ISSN 1040-841X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2644068> >.

Brunetti, M. C.; Fernandes, M. I.; Moraes, R. G. B. d. **Fundamentos da Periodontia - Teoria e Prática**. São Paulo: Artes Médicas, 2007. 353.

Bryers, J. D. Bacterial biofilms. **Curr Opin Biotechnol**, v. 4, n. 2, p. 197-204, Apr 1993. ISSN 0958-1669. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7763570> >.

Ciancio, S. G. Chemical agents: plaque control, calculus reduction and treatment of dentinal hypersensitivity. **Periodontol 2000**, v. 8, p. 75-86, Jun 1995. ISSN 0906-6713. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9567947> >.

Cole, P.; Rodu, B.; Mathisen, A. Alcohol-containing mouthwash and oropharyngeal cancer: a review of the epidemiology. **J Am Dent Assoc**, v. 134, n. 8, p. 1079-87, Aug 2003. ISSN 0002-8177. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12956348> >.

Cortellini, P. et al. Chlorhexidine with an anti discoloration system after periodontal flap surgery: a cross-over, randomized, triple-blind clinical trial. **J Clin Periodontol**, v. 35, n. 7, p. 614-20, Jul 2008. ISSN 1600-051X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18422695> >.

Costerton, J. W. Introduction to biofilm. **Int J Antimicrob Agents**, v. 11, n. 3-4, p. 217-21; discussion 237-9, May 1999. ISSN 0924-8579. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10394973> >.

Costerton, J. W. et al. Microbial biofilms. **Annu Rev Microbiol**, v. 49, p. 711-45, 1995. ISSN 0066-4227. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8561477> >.

_____. Biofilms, the customized microniche. **J Bacteriol**, v. 176, n. 8, p. 2137-42, Apr 1994. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8157581> >.

Davanço, T. et al. Acceptability of an Alimentary Supplement of Whey-Protein Concentrate and TGF- β in Patients with Crohn's Disease. **ISRN Nutr**, v. 2013, p. 947865, 2013. ISSN 2314-4068. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24967262> >.

DAVIES, G. E. et al. 1:6-Di-4'-chlorophenyldiguanido-hexane (hibitane); laboratory investigation of a new antibacterial agent of high potency. **Br J Pharmacol Chemother**, v. 9, n. 2, p. 192-6, Jun 1954. ISSN 0366-0826. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13172429> >.

Do, T.; Devine, D.; Marsh, P. D. Oral biofilms: molecular analysis, challenges, and future prospects in dental diagnostics. **Clin Cosmet Investig Dent**, v. 5, p. 11-9, 2013. ISSN 1179-1357. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23674928> >.

Donlan, R. M.; Costerton, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clin Microbiol Rev**, v. 15, n. 2, p. 167-93, Apr 2002. ISSN 0893-8512. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11932229> >.

Elmore, J. G.; Horwitz, R. I. Oral cancer and mouthwash use: evaluation of the epidemiologic evidence. **Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 113, n. 3, p. 253-61, Sep 1995. ISSN 0194-5998. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7675486> >.

FERREIRA, V. L. P. et al. **Análise sensorial: testes discriminativos e afetivos. manual: série qualidade.** Campinas, SBCTA: 2000. 127.

Flötra, L. et al. Side effects of chlorhexidine mouth washes. **Scand J Dent Res**, v. 79, n. 2, p. 119-25, 1971. ISSN 0029-845X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5280246> >.

Gandini, S. et al. Mouthwash and oral cancer risk quantitative meta-analysis of epidemiologic studies. **Ann Agric Environ Med**, v. 19, n. 2, p. 173-80, 2012. ISSN 1898-2263. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22742785> >.

Gomes, S. C. et al. The effect of a supragingival plaque-control regimen on the subgingival microbiota in smokers and never-smokers: evaluation by real-time polymerase chain reaction. **J Periodontol**, v. 79, n. 12, p. 2297-304, Dec 2008. ISSN 0022-3492. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19053920> >.

_____. Effect of supragingival plaque control in smokers and never-smokers: 6-month evaluation of patients with periodontitis. **J Periodontol**, v. 78, n. 8, p. 1515-21, Aug 2007. ISSN 0022-3492. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17668970> >.

Guha, N. et al. Oral health and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck and esophagus: results of two multicentric case-control studies. **Am J Epidemiol**, v. 166, n. 10, p. 1159-73, Nov 2007. ISSN 1476-6256. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17761691> >.

Haas, A. N. et al. Risk factors for the progression of periodontal attachment loss: a 5-year population-based study in South Brazil. **J Clin Periodontol**, v. 41, n. 3, p. 215-23, Mar 2014. ISSN 1600-051X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24304168> >.

Haffajee, A. D. et al. Controlling the plaque biofilm. **Int Dent J**, v. 53 Suppl 3, p. 191-9, 2003. ISSN 0020-6539. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12875308> >.

Herrera, D. et al. Differences in antimicrobial activity of four commercial 0.12% chlorhexidine mouthrinse formulations: an in vitro contact test and salivary bacterial counts study. **J Clin Periodontol**, v. 30, n. 4, p. 307-14, Apr 2003. ISSN 0303-6979. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12694428> >.

Jakubovics, N. S.; Kolenbrander, P. E. The road to ruin: the formation of disease-associated oral biofilms. **Oral Dis**, v. 16, n. 8, p. 729-39, Nov 2010. ISSN 1601-0825. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20646235> >.

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**, v. 15, n. 7, p. 415-24, Aug 1988. ISSN 0303-6979. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3183067> >.

Jones, C. G. Chlorhexidine: is it still the gold standard? **Periodontol 2000**, v. 15, p. 55-62, Oct 1997. ISSN 0906-6713. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9643233> >.

La Vecchia, C. Mouthwash and oral cancer risk: an update. **Oral Oncol**, v. 45, n. 3, p. 198-200, Mar 2009. ISSN 1879-0593. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18952488> >.

LANG, N. P.; BRECX, M. Chlorhexidine digluconate: an agent for chemical plaque control and preventions. **Journal of Periodontal Research** v. 21, p. 74-89, 1986.

Leyes Borrajo, J. L. et al. Efficacy of chlorhexidine mouthrinses with and without alcohol: a clinical study. **J Periodontol**, v. 73, n. 3, p. 317-21, Mar 2002. ISSN 0022-3492. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11924590> >.

Lim, J. **Hedonic scale: A review of methods and theory**. Elsevier. 22: 733-747 p. 2011.

Lindhe J, H. S., Löe H. **Experimental periodontitis in the beagle dog**. J. Periodont. Res. Copenhagen. 8: 1-10 p. 1973.

LOE H, T. E., JENSEN SB. Experimental gingivitis in man. . **J Periodontol.** , v. 36, p. 177-87, 1965.

Löe H, A. A., Boysen H, Morrison E. **Natural history of periodontal disease** in man. Rapid, moderate and no loss of attachment in Sri Lankan laborers 14 to 46 years of age. **J Clin Periodontol.** , v. 13, p. 431-45, 1986.

Löe, H.; Schiott, C. R. The effect of mouthrinses and topical application of chlorhexidine on the development of dental plaque and gingivitis in man. **J Periodontol Res**, v. 5, n. 2, p. 79-83, 1970. ISSN 0022-3484. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4254172> >.

Maliska, A. N. et al. Measuring early plaque formation clinically. **Oral Health Prev Dent**, v. 4, n. 4, p. 273-8, 2006. ISSN 1602-1622. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17153649> >.

Marsh, P. D. Dental plaque as a microbial biofilm. **Caries Res**, v. 38, n. 3, p. 204-11, 2004 May-Jun 2004. ISSN 0008-6568. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15153690> >.

_____. Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style. **J Clin Periodontol**, v. 32 Suppl 6, p. 7-15, 2005. ISSN 0303-6979. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16128825> >.

Marsh, P. D.; Moter, A.; Devine, D. A. Dental plaque biofilms: communities, conflict and control. **Periodontol 2000**, v. 55, n. 1, p. 16-35, Feb 2011. ISSN 1600-0757. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21134226> >.

McCullough, M. J.; Farah, C. S. The role of alcohol in oral carcinogenesis with particular reference to alcohol-containing mouthwashes. **Aust Dent J**, v. 53, n. 4, p. 302-5, Dec 2008. ISSN 0045-0421. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19133944> >.

Okano, M. et al. Anaphylactic symptoms due to chlorhexidine gluconate. **Arch Dermatol**, v. 125, n. 1, p. 50-2, Jan 1989. ISSN 0003-987X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2910207> >.

Oppermann, R. V.; Rosing, C. K. ABOPREV - Promoção de saúde bucal. In: L, K. (Ed.). 2°. São Paulo: Artes Médicas, 1999. cap. Prevenção e tratamento das doenças periodontais., p.257-81.

Overholser, C. D. et al. Comparative effects of 2 chemotherapeutic mouthrinses on the development of supragingival dental plaque and gingivitis. **J Clin Periodontol**, v. 17, n. 8, p. 575-9, Sep 1990. ISSN 0303-6979. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2212088> >.

Page, R. C. et al. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. **Periodontol 2000**, v. 14, p. 216-48, Jun 1997. ISSN 0906-6713. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9567973> >.

Penugonda, B. et al. Alcohol-containing mouthwashes: effect on composite hardness. **J Clin Dent**, v. 5, n. 2, p. 60-2, 1994. ISSN 0895-8831. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7999290> >.

Quirynen, M. et al. Effect of different chlorhexidine formulations in mouthrinses on de novo plaque formation. **J Clin Periodontol**, v. 28, n. 12, p. 1127-36, Dec 2001. ISSN 0303-6979. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11737510> >.

Ramberg, P. et al. A model for studying the effects of mouthrinses on de novo plaque formation. **J Clin Periodontol**, v. 19, n. 7, p. 509-20, Aug 1992. ISSN 0303-6979. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1331201> >.

Sbordone, L.; Bortolaia, C. Oral microbial biofilms and plaque-related diseases: microbial communities and their role in the shift from oral health to disease. **Clin Oral Investig**, v. 7, n. 4, p. 181-8, Dec 2003. ISSN 1432-6981. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14598129> >.

Shapiro, J. A. Thinking about bacterial populations as multicellular organisms. **Annu Rev Microbiol**, v. 52, p. 81-104, 1998. ISSN 0066-4227. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9891794> >.

Shapiro, S.; Castellana, J. V.; Sprafka, J. M. Alcohol-containing mouthwashes and oropharyngeal cancer: a spurious association due to underascertainment of confounders? **Am J Epidemiol**, v. 144, n. 12, p. 1091-5, Dec 1996. ISSN 0002-9262. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8956620> >.

Socransky, S. S.; Haffajee, A. D. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. **Periodontol 2000**, v. 28, p. 12-55, 2002. ISSN 0906-6713. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12013340> >.

Socransky, S. S. et al. Microbial complexes in subgingival plaque. **J Clin Periodontol**, v. 25, n. 2, p. 134-44, Feb 1998. ISSN 0303-6979. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9495612> >.

Solís, C. et al. 0.2% chlorhexidine mouthwash with an antidiscoloration system versus 0.2% chlorhexidine mouthwash: a prospective clinical comparative study. **J Periodontol**, v. 82, n. 1, p. 80-5, Jan 2011. ISSN 1943-3670. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20653433> >.

Susin, C. et al. Periodontal attachment loss in an urban population of Brazilian adults: effect of demographic, behavioral, and environmental risk indicators. **J Periodontol**, v. 75, n. 7, p. 1033-41, Jul 2004. ISSN 0022-3492. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15341364> >.

Van Strydonck, D. A. et al. Plaque inhibition of two commercially available chlorhexidine mouthrinses. **J Clin Periodontol**, v. 32, n. 3, p. 305-9, Mar 2005. ISSN 0303-6979. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15766375> >.

Vigeant, P. et al. An outbreak of *Serratia marcescens* infections related to contaminated chlorhexidine. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 19, n. 10, p. 791-4, Oct 1998. ISSN 0899-823X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9801292> >.

Weidlich, P.; Lopes de Souza, M. A.; Oppermann, R. V. Evaluation of the dentogingival area during early plaque formation. **J Periodontol**, v. 72, n. 7, p. 901-10, Jul 2001. ISSN 0022-3492. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11495139> >.

Winn, D. M. et al. Mouthwash use and oral conditions in the risk of oral and pharyngeal cancer. **Cancer Res**, v. 51, n. 11, p. 3044-7, Jun 1991. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2032242> >.

Ximénez-Fyvie, L. A.; Haffajee, A. D.; Socransky, S. S. Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis. **J Clin Periodontol**, v. 27, n. 9, p. 648-57, Sep 2000. ISSN 0303-6979. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10983598> >.

Zimmer, S. et al. Randomized controlled trial on the efficacy of new alcohol-free chlorhexidine mouthrinses after 8 weeks. **Int J Dent Hyg**, Nov 2014. ISSN 1601-5037. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25382448> >.