

**FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
-UNICAMP-**

GETÚLIO DA ROCHA NOGUEIRA FILHO

Cirurgião - Dentista

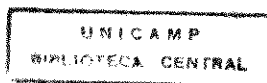
**EFEITO DO TRICLOSAN E ASSOCIAÇÕES NA ATIVIDADE DE
ENZIMAS TIPO TRIPSINA NA PLACA DENTAL E NA
FORMAÇÃO DE COMPOSTOS SULFURADOS VOLÁTEIS
DURANTE A GENGIVITE EXPERIMENTAL.**

ESTUDO COMPARATIVO EM HUMANOS.

Tese apresentada à
Faculdade de Odontologia de
Piracicaba - UNICAMP, como
parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutor
em Clínica Odontológica, área
de Periodontia.

PIRACICABA

-1999-



99/5034

**FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
-UNICAMP-**

GETÚLIO DA ROCHA NOGUEIRA FILHO

Cirurgião - Dentista

**EFEITO DO TRICLOSAN E ASSOCIAÇÕES NA ATIVIDADE DE
ENZIMAS TIPO TRIPSINA NA PLACA DENTAL E NA
FORMAÇÃO DE COMPOSTOS SULFURADOS VOLÁTEIS
DURANTE A GENGIVITE EXPERIMENTAL.**

ESTUDO COMPARATIVO EM HUMANOS.

ORIENTADOR: PROF.DR. SÉRGIO DE TOLEDO

CO-ORIENTADOR: PROF.DR. JAIME A. CURY

Este exemplar foi devidamente corrigido,
de acordo com a Resolução CCPG-036/83

CPG, 27/08/1999

Assinatura do Orientador

Tese apresentada à
Faculdade de Odontologia de
Piracicaba - UNICAMP, como
parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutor
em Clínica Odontológica, área
de Periodontia.

PIRACICABA

-1999-

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	
V.	Ex.
TOMBO BC/	38920
PROC.	229199
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	03/10/99
N.º CPD	

CM-00126405-0

Ficha Catalográfica

N689e

Nogueira Filho, Getúlio da Rocha.

Efeito do triclosan e associações na atividade de enzimas tipo tripsina na placa dental e na formação de compostos sulfurados voláteis durante a gengivite experimental : estudo comparativo em humanos. / Getúlio da Rocha Nogueira Filho. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 1999.

122p. : il.

Orientadores : Prof. Dr. Sérgio de Toledo, Prof. Dr. Jaime A. Cury.

Tese (Doutorado) -- Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Gengivite. 2. Dentifício. 3. Placas dentárias. I. Toledo, Sérgio de. II. Cury, Jaime A. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marilene Girello CRB / 8 - 6159, da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba / UNICAMP.



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de DOUTORADO, em sessão pública realizada em 02 de Julho de 1999, considerou o candidato GETÚLIO DA ROCHA NOGUEIRA FILHO aprovado.

1. Prof. Dr. SERGIO DE TOLEDO

2. Prof. Dr. FERNANDO RENÓ DE LIMA

3. Prof. Dr. JOSÉ EDUARDO CEZAR SAMPAIO

4. Prof. Dr. FRANCISCO HUMBERTO NOCITI JR

5. Prof. Dr. ANTONIO WILSON SALLUM

a DEUS.....

MY SYMPHONY

*" To live content with small means;
to seek elegance rather than luxury, and refinement rather than fashion;
to be worthy, not respectable, and wealthy, not rich;
to study hard,
think quietly,
talk gently,
act frankly;
to listen to stars and birds, with open heart;
to bear all cheerfully, do all bravely, await occasions, hurry never.
In a word, to let the spiritual, unbidden and unconscious,
Grow up through the common.
This is to be my symphony."*

A minha avó **NILZA**.

a minha mãe **JANE**.

a minha mãe **TONHA** (*"in memoriam"*).

as minhas irmãs **GEANE** e **LOÍSE**.

aos meus sobrinhos **RODRIGO** e **LUÍSA**,

dedico este trabalho.

Ao Professor

DR. SÉRGIO DE TOLEDO

Por sua orientação segura e dedicada, além do amizade integral durante a execução deste trabalho, e por seu exemplo de sabedoria e humildade.

Ao Professor

DR. JAIME A. CURY

Por sua amizade e por sua fonte inesgotável de ensinamentos acadêmicos e científicos, transmitidos durante a co-orientação deste trabalho.

Ao Professor

DR. ANTÔNIO WILSON SALLUM

Meu grande exemplo de vida acadêmica, pelo qual os primeiros passos da docência foram dados, e por sua inesgotável vontade de me fazer sentir grande.

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, na pessoa de seu diretor, Prof. Dr. ANTÔNIO WILSON SALLUM.

À FAPESP, pelo apoio financeiro e científico durante a execução deste trabalho.

À querida Prof.a. Dra. ALTAIR A. DEL BEL CURY, coordenadora geral dos cursos de pós-graduação da FOP-UNICAMP.

À querida Prof.a. Dra. MÔNICA CAMPOS SERRA, coordenadora do curso de pós-graduação em Clínica Odontológica da FOP-UNICAMP.

Aos meus amigos, professores doutores da disciplina de Periodontia: ENILSON ANTÔNIO SALLUM e FRANCISCO HUMBERTO NOCITI JR.

À Prof.a. Dra. CINTHIA TABCHOURY, área de Bioquímica da FOP-UNICAMP, por sua grande ajuda nos procedimentos bioquímicos desta tese.

Aos meus irmãos FERNANDO RENÓ, VINICIUS, MARIA ÂNGELA, CRIS, JOÃO BATISTA, JOÃO ARIOLI, ANDRÉ VAZ, MÁRCIO e CHICO por nosso companheirismo e amizade verdadeira.

À ELISA, pela correção ortográfica deste texto, e por seu imenso carinho e apoio durante a redação deste trabalho.

À minha grande amiga e parceira de laboratório POLIANA MENDES DUARTE, por sua perspicácia, dedicação e competência na fase laboratorial deste trabalho.

À nossa querida secretária da área de Periodontia, ELIETE, pela dedicação na agilização burocrática desta tese.

À VALDOMIRO e MARISA, funcionários da Bioquímica da FOP-UNICAMP, pelo auxílio na fase laboratorial desta pesquisa.

À HELOÍSA MARIA CECCOTTI , pela revisão das referências bibliográficas.

À Prof.a. ROSANA PARENTE pela análise estatística dos dados.

Mais uma vez, especialmente aos voluntários dessa pesquisa, pela dedicação e responsabilidade, sem os quais este trabalho não teria sido possível:

ADRIANE KIKI NISHIMURA

ANA KARINA MELGES

ANACRISTINA N. ALVES

ANDRÉA HUEY TSU WANG

DANIELA RUEDA

DÉBORA ANDRADE

EDUARDO SERPA

ÉRIKA G. PEDROSO

FLÁVIO BAGGIO

HELOÍSA KAKEGAWA

LÍRIA REGINA S. MOREIRA

PRISCILA L. CRUZ

REINALDO SAKAYEMURA

RENATO INOUE

RICARDO G. M. JACOB

SANDRA M. KOMATI

VINICIUS TRAMONTINA

TATIANA

A todos vocês, meu eterno obrigado.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

CAPÍTULOS	pág.
LISTAS	01
I. SIGLAS	02
II. TABELAS	02
III. FIGURAS	03
RESUMO E SUMMARY	04
INTRODUÇÃO	07
REVISÃO DE LITERATURA	12
I. TRICLOSAN	13
II. CITRATO DE ZINCO	15
III. GANTREZ	16
IV. PIROFOSFATO	17
V. DENTIFRÍCIOS MÚLTIPLA AÇÃO	18
VI. GENGIVITE EXPERIMENTAL	22
VII. ATIVIDADE ENZIMAS TIPO TRIPSINA	25
VIII. COMPOSTOS SULFURADOS VOLÁTEIS (CSV)	26
PROPOSIÇÃO	36
MATERIAL E MÉTODOS	38
I. SELEÇÃO DA AMOSTRA	39
II. CONFEÇÃO DA MATRIZ INDIVIDUAL	40
III. DENTIFRÍCIOS	42
IV. DELINEAMENTO DO ESTUDO	45
IV.1 - FASE CLÍNICA DA PESQUISA	45

IV.1.a. FASE PRÉ-EXPERIMENTAL	45
IV.1.b. FASE EXPERIMENTAL	46
IV.1.c. DIAGRAMA DO CRUZAMENTO DOS DENTIFRÍCIOS	47
IV.2 - FASE LABORATORIAL DA PESQUISA	49
IV.2.a. FLUXO SALIVAR	49
IV.2.b. AVALIAÇÃO DOS CSV	50
IV.2.c. ANÁLISE ENZIMÁTICA	52
V. COLETA DE DADOS	58
VI. FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS	59
RESULTADOS	60
I. OBSERVAÇÕES PESSOAIS DOS VOLUNTÁRIOS	61
II. OBSERVAÇÕES CLÍNICAS	61
III. RESULTADOS ESTATÍSTICOS	64
DISCUSSÃO	69
CONCLUSÃO	84
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86
ANEXOS	112
ANEXO A1- MODELO DE FICHA ANAMNÉSICA	113
ANEXO A2- MODELO DE TERMO DE CONSENTIMENTO	114
ANEXO A3 - MODELO DE FICHA CLÍNICA	115
ANEXO A4- MODELO DAS INSTRUÇÕES PARA PESQUISA	116
APÊNDICE	117
APÊNDICE 1- DADOS ORIGINAIS DOS IP, IG e IS no DIA 0	118
APÊNDICE 2- DADOS ORIGINAIS DO FLUXO SALIVAR	119
APÊNDICE 3- DADOS ORIGINAIS DO TESTE BAPNA	120
APÊNDICE 4- DADOS ORIGINAIS DOS CSV	121
APÊNDICE 5- DECLARAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	122

LISTAS

LISTAS

I- SIGLAS

SIGLA	SIGNIFICADO
colab.	colaboradores
fig.	figura
mm	milímetro
Ppm	partes por milhão
Ppb	partes por bilhão
Ipl	Índice de Placa
IG	Índice Gengival
IS	Índice de Sangramento
ml	mililitro
g	grama
µg	micrograma

II- TABELAS

NÚMERO	ASSUNTO	PÁGINA
1-	Médias do teste BAPNA no dia 21	65
2-	Médias dos CSV (ppb) nos dias 0 e 21	66
3-	Comparação entre as médias de CSV e BAPNA	67
4-	Correlações entre CSV e BAPNA no dia 21	68

IV- FIGURAS

NÚMERO	ASSUNTO	PÁGINA
1-	Estrutura química do Triclosan	13
2-	Etiologia da halitose- I	30
3-	Etiologia da halitose - II	30
4-	Matriz individual destacada do modelo de gesso	41
5-	Amostras padronizadas dos dentifrícios A, B, C, D e E	42
6-	Matriz na boca protegendo a região teste da escovação	49
7-	Monitor portátil de sulfetos - HALIMETER®	51
8-	Utilização do monitor portátil de sulfetos	51
9-	Coleta da placa dental supragengival	53
10-	Coleta da placa dental subgengival	54
11-	Amostra da placa acondicionada no tubo eppendorf	54
12-	Espectrofotômetro	57
13-	Amostras de placa mostrando reação BAPNA	57
14-	Aspecto clínico da região teste (dia 21) - placa	62
15-	Aspecto clínico da região teste (dia 21) - gengivite	63

RESUMO E SUMMARY

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de dentifrícios contendo triclosan-copolímero (E), triclosan-zinco (D), triclosan-copolímero-zinco-pirofosfato (C), triclosan-pirofosfato (B) quando comparados a um dentifrício placebo (A), na atividade de enzimas tipo tripsina (BAPNA) presente na placa dental e na formação de compostos sulfurados voláteis (CSV) com o uso de um monitor de sulfetos portátil (HALIMETER, Interscan-USA), através do modelo da gengivite experimental. Durante a *fase clínica*, foi realizado um estudo cruzado, duplo cego, de cinco períodos, onde a escovação dental foi suprimida por 21 dias, no quarto quadrante da boca de 19 voluntários. Em cada período, os voluntários aplicaram um dos dentifrícios na região teste, três vezes ao dia, com o auxílio de uma matriz, isolando esta da escovação, a qual foi realizada no restante da boca. Intervalos de 30 dias aconteceram entre os períodos. Para a *fase laboratorial*, foram coletados a placa dental e o hálito bucal dos voluntários quando estes completaram os 21 dias de cada período. Os resultados estatísticos ($p=0,05$) dos dados obtidos com o teste BAPNA (nmol do produto/mg de placa $\times$ min), para cada tratamento, foram os seguintes: A- $10,98a \pm 0,61$; B- $11,35a \pm 1,75$; C- $2,82b \pm 0,43$; D- $9,41a \pm 1,95$; E- $6,03c \pm 1,17$. Para a formação dos CSV (ppb): A- $81,84a \pm 4,22$; B- $48,79b \pm 1,98$; C- $40,21c \pm 2,67$; D- $71,16d \pm 2,98$; E- $44,53bc \pm 1,94$ (médias seguidas de letras diferentes, estatisticamente, diferem entre si). Concluiu-se que os dentifrícios contendo as formulações triclosan-copolímero-zinco-pirofosfato e triclosan-copolímero apresentaram os melhores resultados na redução da atividade tipo tripsina e da formação de CSV durante a gengivite experimental.

PALAVRAS CHAVE: *Triclosan, gengivite experimental, CSV, BAPNA.*

SUMMARY

The objective of this study was to compare the effect of dentifrices containing triclosan-copolymer (E), triclosan-zinc (D), triclosan-copolymer-zinc-pyrophosphate (C), triclosan-pyrophosphate (D), with that of a placebo dentifrice without triclosan (A), on the trypsin activity (BAPNA) in dental plaque and on volatile sulphide compounds (VSC) formation by a portable sulphide monitor (HALIMETER, Interscan-USA). A double blind, cross over, experimental gingivitis study was conducted on 19 dental students during a 21-day period without toothbrushing, by a partial mouth experimental model. Subjects were randomly assigned to one of five dentifrices using groups. Undiluted test or placebo dentifrices were applied to the experimental teeth via toothshield. Thirty-day-wash-out intervals happened among the experimental periods. The data from baseline were subjected to statistical analysis ($p=0,05$), according to the "Cross Over" design. The results for trypsin activity (nmolproduct/mgxmin) showed that at the day 21: A- $10,98a \pm 0,61$; B- $11,35a \pm 1,75$; C- $2,82b \pm 0,43$; D- $9,41a \pm 1,95$; E- $6,03c \pm 1,17$. For VSC (ppb) formation: A- $81,84a \pm 4,22$; B- $48,79b \pm 1,98$; C- $40,21c \pm 2,67$; D- $71,16d \pm 2,98$; E- $44,53bc \pm 1,94$ (means followed by different letters differs statistically). It was concluded that the dentifrices containing triclosan-copolymer-zinc-pyrophosphate and triclosan-copolymer presented the best results for VSC and trypsin activity reduction during experimental gingivitis.

KEY WORDS: *Triclosan, experimental gingivitis, VSC, BAPNA.*

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

Em Periodontia está estabelecido que a interação entre a infecção bacteriana da placa dental e o perfil bio-emocional do hospedeiro (GENCO, 1996; SALLUM et al., 1999) é a responsável pelo aparecimento e progressão da doença periodontal, sendo no entanto a placa dental o fator etiológico primordial e desencadeante de todo o processo inflamatório periodontal (LÖE et al., 1965). Estudos epidemiológicos demonstram que a gengivite tem diminuído nos países desenvolvidos em virtude da grande atenção que se tem dado à higiene bucal como requisito fundamental para a saúde geral do indivíduo (HUGOSON & RYLANDER, 1982; HAFFAJEE et al., 1988).

No Brasil a gengivite ainda é um achado constante entre crianças, adolescentes e adultos devido a higiene bucal deficiente e ao baixo padrão sócio-econômico da grande maioria da população.

A Organização Mundial de Saúde (W.H.O., 1981) sugeriu que a meta de "*saúde bucal para todos*" deverá ser alcançada teoricamente até o ano 2000. Foram estabelecidos os objetivos primordiais deste final de milênio, que incluem a redução de 50% no número de pessoas que têm perda dentária antes dos quarenta anos de idade e a redução de 25% de pessoas com mais de 65 anos de idade, que sofrem perda total dos dentes.

Assim como **LÖE et al.** (1965), através da gengivite experimental em humanos, demonstraram que o acúmulo de placa bacteriana supragengival induz à gengivite, **LINDHE et al.** (1975) demonstraram que a periodontite se desenvolvia a partir de gengivites localizadas. Essa perda de suporte periodontal seria o resultado não apenas de um crescimento a longo prazo da placa na margem gengival, mas também em virtude das mudanças ecológicas, quantitativas e qualitativas da microbiota subgengival e do próprio hospedeiro (**LOESCHE**, 1976; **KORNMAN**, 1985; **MARSH**, 1994).

Os fatores específicos bacterianos e do hospedeiro que determinam a conversão da gengivite localizada para a periodontite, ainda não foram totalmente estabelecidos, e, apesar do controle mecânico da placa dental ser o método mais efetivo e utilizado pela população em geral, existe evidência de que o grau de motivação e capacidade operacional requeridos estão muito aquém da habilidade da maioria dos pacientes (**MASSLER et al.**, 1957; **LINDHE & KOCH**, 1967). Por outro lado, os experimentos de **LOESCHE** (1992) e **WIKSTRÖM et al.** (1994) demonstraram a importância da presença de certos microorganismos anaeróbios Gram negativos na placa dental que sintetizam enzimas com atividade tipo tripsina, as quais estariam diretamente relacionadas ao processo de destruição dos tecidos periodontais. A detecção de níveis elevados destes microorganismos na placa removida de nichos clinicamente saudáveis indicaria

uma infecção pré-clínica considerada de risco em potencial à saúde periodontal (LOESCHE et al., 1987).

Tal situação tem motivado os pesquisadores a investigarem o controle químico da placa dental (HULL, 1980) através da utilização de agentes químicos antimicrobianos presentes em enxagüatórios bucais e em dentifrícios. De acordo com a literatura, tem se destacado o uso do triclosan e suas associações com o copolímero Gantrez®, o zinco e o pirofosfato, através da redução dos índices de placa e gengival dos indivíduos que utilizam tais produtos. Por outro lado, o modelo da gengivite experimental em humanos tem sido utilizado para a avaliação da efetividade de agentes antimicrobianos (SAXTON & van der OUDERAA, 1989). NOGUEIRA-FILHO et al. (1997), observaram a efetividade clínica da associação entre triclosan-copolímero-zinco-pirofosfato presente em dentifrícios comerciais brasileiros, quanto ao seu efeito na redução da formação da placa supragengival e da gengivite experimental.

Cada vez mais, verifica-se na literatura a correlação entre as doenças periodontais e os quadros de halitose, que afetam milhares de pessoas em todo o mundo. Sabe-se que os constituintes orgânicos voláteis da cavidade bucal humana oferecem uma fonte potencial de informações do quadro sistêmico do indivíduo, podendo servir até como marcadores diagnósticos em estados de saúde ou doença (KOSTELC et al., 1984). Com isso, os compostos voláteis sulfurados

(CSV) têm sido detectados em áreas específicas da cavidade bucal, observando-se uma maior quantidade em pacientes periodontais, caracterizando inclusive casos de halitose nestes pacientes. Por sua vez, o modelo da gengivite experimental permite examinar quantitativamente e até qualitativamente as mudanças na formação dos CSV, cujo monitoramento poderia indicar uma correlação positiva no que tange à indução da gengivite.

Logo, dada a importância do assunto exposto, e tendo em vista a escassez de trabalhos que avaliem a relação entre as associações entre triclosan-zincopolímero-pirofosfato, presentes em dentifrícios com a atividade de enzimas bacterianas do tipo tripsina, foi identificada neste trabalho esta atividade enzimática em uma placa dental submetida a estas associações para estabelecer-se parâmetros comparativos quanto à sua efetividade. Igualmente, os compostos sulfidrilos voláteis (metil mercaptano, sulfeto de hidrogênio, dimetil sulfeto e ácido sulfídrico), produzidos nos períodos experimentais foram também quantificados durante a indução da gengivite experimental, para observar-se comparativamente o possível efeito de tais dentifrícios com a redução do malodor bucal, o qual estaria geralmente associado à quadros de doença periodontal.

REVISÃO DA LITERATURA

REVISÃO DA LITERATURA

I. TRICLOSAN (2, 4,4'-triclora-2'- hidroxidifenil éter)

O triclosan (fig. 1) se apresenta como um agente antimicrobiano não iônico de amplo espectro (FURIA & SCHENKEL, 1968), classificado como um bisfenol lipossolúvel (BLACK et al., 1975), de baixa toxicidade (GAFFAR et al., 1997; MODÉER et al., 1996; ZUCKERBRAUN et al., 1998), que é usado há mais de duas décadas na composição de sabonetes, desodorantes, preparações dermatológicas, e mais recentemente em dentifrícios e enxagüatórios bucais.

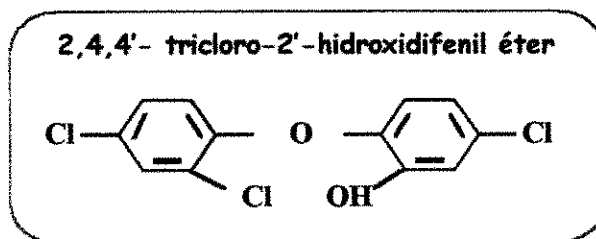


FIGURA 1- Estrutura química do Triclosan.

REGOS & HITZ (1989) asseguraram o amplo espectro desta droga, inibindo bactérias Gram positivas, Gram negativas e fungos. Seu modo de ação consiste no aumento da permeabilidade da parede celular bacteriana, por

adsorver-se na porção lipídica da membrana celular da bactéria, resultando na liberação do conteúdo citoplasmático da mesma, devido à sua natureza lipolítica, e por isto interferindo nos mecanismos vitais de transporte bacteriano (MEINCKE et al., 1980). O triclosan mostra-se eficaz na redução da formação de placa dental bacteriana, especialmente em superfícies livres de placa, sugerindo que ele pode estar adsorvido na superfície dental e prevenir, tanto a adesão bacteriana, quanto o seu crescimento e colonização (MARSH, 1991).

Quanto ao mecanismo de ação desta substância anti-placa, nota-se que seu mecanismo proposto de ação é na desorganização geral da membrana celular e na inibição específica de enzimas da membrana celular bacteriana, mostrando seu efeito antimicrobiano por inibir a captação e metabolismo de glicose por *Streptococcus mutans* e *Actinomyces naeslundii*, além de inibir a atividade de proteases do tipo tripsina de *Porphyromonas gingivalis* e *Capnocytophaga* (CURY, 1997). GILBERT et al. (1987) estudaram, por cromatografia, a retenção e a distribuição intra-oral do triclosan em humanos, após o uso de um dentifrício contendo triclosan a 0,5%. Os autores observaram que 38% desta substância contida em um grama de dentifrício, e 62% em três gramas, foram retidos na cavidade bucal. O triclosan inclusive foi detectado e medido na placa e na saliva. Níveis de aproximadamente 20-30 µg de triclosan / ml de saliva, puderam ser

detectados 5 minutos após o uso do dentifrício, caindo em 2 horas para 3-4 μ g / ml. Foi também observada uma inibição na produção de ácidos pelos *S. mutans* da placa bacteriana. Logo, a concentração de triclosan presente na placa, na saliva e na superfície do dente, mostrou-se como um dos fatores que determinam a atividade clínica do dentifrício que o contenha.

II. CITRATO DE ZINCO

O citrato de zinco é um sal metálico de propriedades antimicrobianas (SCHIMID et al., 1974; FISCHMANN et al., 1975; ADDY et al., 1980; HARRAP et al., 1984a; HARRAP et al., 1984b), que é utilizado na composição de dentifrícios e colutórios como auxiliar na redução do acúmulo de placa dental. O mecanismo de ação desta substância anti-placa, quanto ao seu local proposto de ação, é na inibição específica de enzimas de membrana e intracelulares (CURY, 1997).

Interessados na ação química dos sais de zinco, SAXTON et al. (1986) estudaram o efeito de dentifrícios contendo 0,5% de citrato de zinco no acúmulo de placa, numa série de cinco estudos duplo cegos, em 88 indivíduos. Os dados obtidos mostraram que o uso de dentifrícios contendo citrato de zinco reduzia o crescimento da placa bacteriana existente, similarmente ao efeito do uso de um dentifrício contendo 0,4% de fluoreto estanhoso. Também foi

possível, através da espectroscopia de absorção atômica, observar níveis elevados de zinco na placa e na saliva, 3-4 horas após a escovação, evidenciando sua ação anti-placa.

III. GANTREZ® (Copolímero do Ácido Maleico e do Polivinilmetil éter)

Este copolímero, tem sido incorporado ao triclosan presente na formulação dos dentífricos múltipla ação, com o objetivo de aumentar a permanência do mesmo nas estruturas bucais (URQUHART & ADDY, 1991).

A função do copolímero Gantrez® está baseada no aumento da biodisponibilidade do triclosan, através da sua habilidade de aumentar a concentração deste agente na "camada limite de difusão", encontrada na mucosa bucal e na superfície dental (GARCIA-GODOY et al., 1990). Apesar disso, vários estudos laboratoriais e clínicos continuam sendo executados no intuito de discutir qual associação é a mais favorável no controle da placa dental e da gengivite. (GAFFAR et al., 1990; GAFFAR et al., 1994).

AFFLITTO et al. (1989) estudaram a concentração do triclosan na saliva e na placa dental para avaliar a efetividade de um dentífrico contendo 0,3% de triclosan e Gantrez®. Os resultados indicaram que os níveis salivares variaram entre 19,7 µg/ml em cinco minutos e 1 µg/ml em 2 horas após o uso deste dentífrico. Após uma hora, foi encontrada uma concentração de 25 µg/g de

triclosan na placa e 6,2 μ g/ml na saliva. Concluíram que este dentifrício apresentava uma biodisponibilidade de triclosan aceitável, reduzindo a formação de placa dental durante o estudo.

Segundo LINDHE (1990), quando um dentifrício contendo 0,2% de triclosan, incorpora 2% do copolímero do ácido maleico e do polivinilmetil éter - Gantrez® - na sua formulação, ocorre elevação na retenção do triclosan na placa, na saliva e na superfície dos tecidos moles bucais.

IV. PIROFOSFATO

O pirofosfato de sódio é um sal que tem a capacidade de interagir com a hidroxiapatita de esmalte dental, inibindo a formação de cristais de cálcio e assim reduzindo a formação de cálculos dentais (CIANCIO et al., 1995). As formulações comerciais dos dentifrícios anti-tártaro têm mostrado um potencial significativo na prevenção da deposição de cálculos supragengivais (EMBERY & RÖLLA, 1992).

No entanto, a ação isolada do pirofosfato não tem mostrado qualquer ação anti-placa ou anti-gengivite, sendo necessária a associação a outras substâncias como o triclosan (BEISWANGER et al., 1991). Por outro lado, o estudo de JACKSON & Mc DONALD (1994) concluiu que o pirofosfato aumentaria a adsorção de triclosan em discos de hidroxiapatita, retardando o crescimento

bacteriano. Clinicamente, pode-se pressupor que a ação combinada do triclosan-pirofosfato poderia reduzir não apenas o crescimento bacteriano mas também a gengivite e a formação de cálculos.

V. DENTIFRÍCIOS MÚLTIPLA AÇÃO

A antiga visão dos dentifrícios como meros cosméticos foi totalmente reformulada desde a chegada dos dentifrícios múltipla ação, que além de proporcionarem uma proteção anti-cárie pelo flúor ativo, têm o papel de contribuir para a melhora na saúde gengival com suas propriedades anti-placa, anti-gengivite e anti-tártaro, conferidas pela inclusão nas suas formulações de agentes químicos antimicrobianos como o triclosan, um dos principais agentes no controle da gengivite e da placa dental bacteriana (THE ORAL CARE REPORT, 1996).

O primeiro estudo sobre o efeito de m dentifrício múltipla ação foi realizado por SAXTON et al. (1986) que investigou o efeito de um dentifrício contendo 0,5% de triclosan e 1% de citrato de zinco no controle da placa bacteriana e da gengivite. Duas avaliações foram realizadas. Na primeira, a atividade de um dentifrício contendo ambos os agentes foi comparada com a atividade individual de cada um deles e a um placebo, através da suspensão da escovação por 96 horas, com o uso concomitante dos dentifrícios diluídos em

água. Numa segunda fase, comparou-se a ação deste dentifrício a um placebo, através de um estudo duplo cego, cruzado, em 28 dias sob escovação normal. Os resultados obtidos com o levantamento dos Índices de Placa, Gengival e de Sangramento mostraram que o dentifrício teste reduzia em até 50% o acúmulo de placa, melhorando a saúde gengival.

A investigação da retenção do triclosan na cavidade bucal foi estudada por GILBERT (1987a) , que num estudo em humanos, mediu a retenção e liberação do triclosan a 0,2% e do citrato de zinco a 0,5%, após o uso de um dentifrício múltipla ação. Os resultados mostraram que aproximadamente 1/4 de ambos foi retido imediatamente após a escovação dental. Após duas horas da escovação, as concentrações salivares caíram de $7,5 \mu\text{g g}^{-1}$ (triclosan) e de $7,0 \mu\text{g g}^{-1}$ (zinco) , caindo então após cinco minutos para $0,5 \mu\text{g g}^{-1}$ e $1,2 \mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente. A eficácia destes agentes antimicrobianos estaria baseada na relação entre sua concentração e o tempo de exposição requeridos para reduzir o crescimento bacteriano. Já CREETH et al. (1993) estudaram o triclosan, quanto a sua liberação e permanência na cavidade bucal, usando três dentifrícios comerciais: o primeiro contendo 0,3% de triclosan e 2% de Gantrez[®]; outro contendo 0,3% de triclosan e 5% de pirofosfato e o terceiro contendo 0,3% de triclosan e 0,75% de citrato de zinco. O dentifrício contendo triclosan e citrato de zinco

liberou mais triclosan na saliva que os outros dois; o mesmo também produziu os maiores níveis de triclosan na placa dental, numa proporção de 109 *versus* 78µg /g de placa. Tais resultados demonstraram que uma melhor liberação de triclosan requer uma formulação altamente otimizada, sugerindo ainda que os efeitos clínicos do dentifrício contendo triclosan e zinco, foram mais expressivos por causa da maior liberação do triclosan deste dentifrício nos reservatórios bucais, seguido do efeito complementar antimicrobiano do zinco.

O estudo "in vitro" da ação antimicrobiana do dentifrício contendo triclosan e Gantrez® - *Colgate Gum Protection*, comparado a dentifrícios contendo triclosan e sem Gantrez® - *Crest Gum Health* e *Neo-Mentadent P*, foi realizado em cepas de bactéria bucais Gram positivas e Gram negativas semeadas em discos de hidroxiapatita com cobertura de saliva. Esta investigação bioquímica e microbiológica indicou que o "*Colgate Gum Protection*" foi significativamente mais efetivo na redução da placa bacteriana, das proteínas e dos carboidratos formados nos discos, que os dentifrícios sem o copolímero Gantrez®. Também notou-se que a presença do lauril sulfato de sódio, o surfactante aniônico mais utilizado nas formulações de dentifrícios, não alterou a efetividade antibacteriana do triclosan. (GAFFAR et al., 1990)

ZAMBON et al. (1990) , analisaram o efeito do triclosan a 0,3%

associado ao Gantrez® a 0,2% presentes num dentifrício, sobre a microbiota da placa dental, através de um estudo duplo cego de 28 semanas em 81 voluntários. Os resultados revelaram que o uso de tal dentifrício, por um longo período de tempo, não resultava em mudanças na microbiota da placa supragengival, nem favorecia o crescimento de espécies bacterianas oportunistas ou patogênicas, ao contrário, o uso deste dentifrício favorecia o crescimento de *S. sanguis*, que são compatíveis com a saúde gengival.

No estudo de **BRADSHAW et al.** (1993), foi confirmada a superioridade do uso individual do triclosan, quando comparado à ação associada ou individual do citrato de zinco, na inibição de *A. viscosus* e em cinco espécies de bactérias Gram negativas. Já **LINDHE et al.** (1993), verificaram a redução da placa bacteriana preexistente e da gengivite, numa amostra de 120 pessoas, mediante escovação com dentifrício contendo triclosan e Gantrez®, quando comparado a um dentifrício placebo. Através da avaliação dos índices de placa e gengival, os autores confirmaram a hipótese do triclosan poder reduzir a microbiota patogênica na placa dental.

WALKER et al. (1994) realizaram um estudo duplo cego, de seis meses de duração, em 144 voluntários para examinar o efeito de um dentifrício contendo 0,3% de triclosan e 2% de Gantrez®, na microbiota da placa dental

supragengival, quando comparado a um placebo. A placa foi coletada nas superfícies bucal e lingual dos quatro dentes teste no "baseline", no terceiro e no sexto mês, e analisada microbiologicamente através de microscopia de campo escuro, da coloração Gram, da imunofluorescência e de culturas seletivas e não seletivas. Concluíram que ambos dentifrícios reduziram o número de microorganismos cultiváveis em todos os períodos. Nenhum deles causou quaisquer mudanças negativas na composição da microbiota normal, nem levou ao aparecimento de patógenos periodontais ou de oportunistas.

SATHLER & FISCHER (1996) estudaram os efeitos anti-placa da associação triclosan-copolímero-zinco-pirofosfato, através de um estudo cruzado, duplo cego, por sete dias, em quatorze estudantes de odontologia. O dentifrício teste foi o *Kolynos Ação Total* e o controle foi o *Kolynos Super Branco*. Os resultados mostraram uma diferença estatisticamente significativa nos índices de placa apenas das superfícies proximais dos dentes, com o uso do dentifrício teste, apesar de não serem observadas diferenças no índice gengival entre o dentifrício teste e controle.

VI. GENGIVITE EXPERIMENTAL COM USO DE DENTIFRÍCIOS MÚLTIPLA AÇÃO

O estudo clássico de **LÖE et al.** estabeleceu em 1965 o modelo da gengivite experimental em humanos, mostrando o papel etiológico primordial da

placa bacteriana no aparecimento e progressão da gengivite. **PUTT et al.** (1993) demonstraram que o modelo de estudo da gengivite experimental em regiões parciais da boca, num período de 21 dias, permitia o desenvolvimento da placa e da gengivite nas regiões selecionadas e protegidas com a matriz acrílica individual, validando este modelo clínico na avaliação dos efeitos quimioterápicos dos dentífrícios.

SAXTON & van der OUDERAA (1989) utilizaram em 34 indivíduos, o modelo da gengivite experimental em regiões parciais da boca (**BOSMAN & POWEL** modificado) para estudar a eficácia de um dentífrício contendo citrato de zinco e triclosan em reduzir o desenvolvimento da gengivite por um período de 28 dias. Os autores constataram: (1) a viabilidade do modelo de investigação proposto em testar dentífrícios não diluídos; (2) o dentífrício contendo triclosan e citrato de zinco poderia reduzir o acúmulo de placa, retardando o estabelecimento da gengivite.

JONES et al. (1990) aplicaram o modelo da gengivite experimental em regiões parciais da boca em 53 voluntários, para estabelecer o efeito de um dentífrício contendo 0,2% de triclosan e 0,5 % de citrato de zinco no desenvolvimento da gengivite crônica, associando as mudanças na flora da placa dental correlacionadas à gengivite. Concluíram que além de reduzir a placa do

grupo teste, os agentes anti-placa testados reduziram o número de bactérias anaeróbicas, potencialmente periodontopatogênicas. Isto foi considerado particularmente significativo, pois tais bactérias estão geralmente associadas com a gengivite crônica.

SAXTON et al. (1993) investigaram a habilidade do triclosan, presente em dentifrícios, em retardar o desenvolvimento da gengivite através do modelo da gengivite experimental modificado, durante um período de 21 dias sem escovação. A combinação do triclosan com o citrato de zinco reduziu significativamente a formação da placa e da gengivite em relação ao controle e à associação do triclosan com o copolímero. Concluíram que o dentifrício contendo triclosan e zinco teria um maior potencial anti-gengivite que os outros dentifrícios testados.

NOGUEIRA-FILHO et al. verificaram a efetividade clínica das associações entre triclosan-copolímero-zinco-pirofosfato presentes em três dentifrícios do mercado brasileiro, através do modelo da gengivite experimental. Foi realizado um estudo cruzado, duplo cego, de quatro etapas, numa amostra de 25 voluntários, onde a escovação dental do quarto quadrante da boca foi suprimida por 21 dias. Os voluntários aplicaram um dos dentifrícios na região teste três vezes ao dia. Após 21 dias, foram avaliados, na região não escovada,

os índices de placa, de gengivite e de sangramento gengival. Os resultados obtidos após os tratamentos com os dentífrícios placebo, *Kolynos Ação Total*, *Colgate Total* e *Signal Global* permitiram afirmar que a associação triclosan-copolímero-zinco-pirofosfato contida no *Kolynos Ação Total* foi a mais eficiente na redução da formação da placa supragengival, da gengivite e do sangramento gengival.

VII. ATIVIDADE DE ENZIMAS TIPO TRIPSINA

Estudos taxonômicos dos microorganismos da placa dental bacteriana têm demonstrado que espécies de *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis* e *Bacteroides forsythus* possuem uma enzima tipo tripsina (SLOTS et al., 1981 e LAUGHON et al., 1982). A atividade da enzima tipo tripsina poderia ser detectada laboratorialmente pela hidrólise do substrato colorimétrico N-benzoyl-DL-arginine-2-naphthylamide (BANA). Como estes microorganismos são considerados periodontopatogênicos, tornou-se interessante determinar sua presença e relacioná-la com a atividade de doença periodontal. (LOESCHE et al., 1987)

LOESCHE (1992) discutiu a importância dos testes de diagnóstico para bactérias específicas da doença periodontal, afirmando que as sondas de DNA e o teste BANA seriam os mais efetivos em detectar a presença de certos

periopatógenos na placa dental. Este procedimento poderia então facilitar o sucesso do tratamento periodontal.

WIKSTRÖM et al. (1994) determinaram as proporções de *P. gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum*, *Capnocytophaga spp*, *Camphylobacter rectus* e *Eikenella corrodens* utilizando o substrato N-benzoyl-L-arginine-*p*-nitroanilide (BAPNA) observando-se a atividade amidolítica no fluido crevicular durante três anos. Concluíram que *Porphyromonas gingivalis* estava fortemente relacionada com o teste BAPNA, o qual se mostrou rápido e de baixo custo. O substrato enzimático BAPNA, tem a mesma especificidade enzimática e sensibilidade similar ao substrato tipo tripsina BANA.

VIII. COMPOSTOS SULFURADOS VOLÁTEIS (CSV)

Histórico

Desde os tempos pré-bíblicos já existem registros da halitose como um problema de desaprovação social entre os indivíduos de uma sociedade. O odor do hálito também foi por séculos considerado um grande recurso diagnóstico, inclusive Hipócrates evidenciava que o nariz era "um guia diagnóstico confiável" para várias desordens sistêmicas, como o hálito cetônico dos diabéticos e o hálito urêmico dos insuficientes renais (**MASSLER et al., 1957**).

Porém, a halitose só foi considerada doença em 1898, quando **HOWE** descreveu esta condição como importante no diagnóstico de doenças sistêmicas.

Definição

Conhecida como mau hálito, malodor bucal, *fetor oris* ou *fetor ex ore*, a halitose (do Latim *halitus*- hálito e *osis*- condição) refere-se a uma alteração do hálito de origem local ou sistêmica caracterizada primordialmente pela emissão de odores fétidos pela boca, sendo portanto uma condição humana de grande interesse público que afeta uma larga proporção da população e pode conduzir ao desenvolvimento de neuroses, isolamento social, processos de divórcio e até suicídio daqueles que sofrem desta patologia (**ROSENBERG et al.**, 1992). No entanto, é um problema bastante ignorado no campo da pesquisa científica, em contraste com o grande interesse público a seu respeito.

Define-se a halitose usualmente pela formação de grupos químicos voláteis derivados do enxofre (-SH) que são exalados pela cavidade bucal denotando sempre um odor desagradável. Tais substâncias, chamadas de compostos sulfurados voláteis (CSV), são o sulfeto de hidrogênio (H_2S), metil mercaptano (CH_3SH) e dimetil sulfeto [$(CH_3)_2S$] (**TONZETICH**, 1977) , os quais são freqüentemente produzidos na cavidade bucal através da metabolização de substratos proteicos por microorganismos bucais (**SPOUGE**, 1964).

Sinteticamente, a produção dos CSV inicia-se pela hidrólise de proteínas em aminoácidos seguida da conversão de cadeias disulfídicas em grupos tióis. Estes aminoácidos são então catabolizados pelas bactérias que revestem os tecidos duros e moles da cavidade bucal, particularmente a língua, sendo então gerados os gases fétidos H_2S e CH_3SH . A principal transformação disulfeto-tiol é a da cistina em cisteína e do glutatiol oxidado em glutatiol (GRIGOR & ROBERTS, 1992).

Etiologia

O hálito normal é uma característica individual do ser humano e susceptível a variações locais ou sistêmicas, porém a halitose é uma condição que foge da normalidade podendo ter uma origem patológica ou fisiológica. Na condição fisiológica, sua natureza é temporária e existe quando os CSV são produzidos e liberados pela ingestão de certos alimentos como ervas, temperos, e por alguns vegetais como cebola, alho, nabo, rabanete e alho-poró; ou de bebidas aromáticas como café, chás, vinhos, uísque conhaque, licores e cerveja. Situações de fome, constipação, desidratação, xerostomia transitória noturna (hálito matinal) e tabagismo também podem caracterizar o mal hálito (RICHTER, 1996).

A condição patológica ocorre essencialmente pelos mesmos mecanismos da halitose fisiológica, sendo que nesta condição ocorre também a liberação pulmonar de substâncias voláteis de origem sangüínea. A halitose patológica não é facilmente reversível e tende a persistir quando não tratada (TONZETICH, 1978), e pode ser causada por alguns fatores intra e extra-orais (de origem local e/ou sistêmica) como gengivites, periodontites, inflamações nasais, sinusite crônica, diabetes mellitus, insuficiência hepática, cirrose biliar primária, uremia, carcinoma pulmonar, cirrose hepática descompensada, distúrbios neurológicos, dentre outras alterações sistêmicas (PRETI et al., 1995). Na maioria dos casos, o mau hálito se origina dentro da própria cavidade bucal, numa média de 87% dos casos (DELANGUE et al., 1997).

Também participam da etiologia da halitose alguns microorganismos periodontopatogênicos (p.ex. *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia/nigrescens*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Campylobacter rectus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Peptostreptococcus micros* e *Bacteroides forsythus*) pois são grandes produtores de voláteis sulfidrílicos, que são os precursores do mal odor bucal. As bactérias presentes em fissuras, vilosidades e irregularidades superficiais da língua, que compõem a "saburra", e das tonsilas estão também correlacionadas com a halitose, visto que estes microorganismos

proliferam-se intensamente, principalmente por estarem protegidos da ação salivar e colonizando sítios com baixa concentração de oxigênio (YAEKAKI & SANADA, 1992; BOSY et al., 1994).

Já o estudo de van STEENBERGUE (1997) reportou, em 260 pacientes, que 87% destes tinham na boca a causa da sua halitose, 8% por problemas otorrinolaringológicos e 5% outras causas (fig. 2). E, dentre as causas bucais estariam a saburra lingual (41%), a gengivite (31%) e a periodontite (28%), como está ilustrado na figura 3.

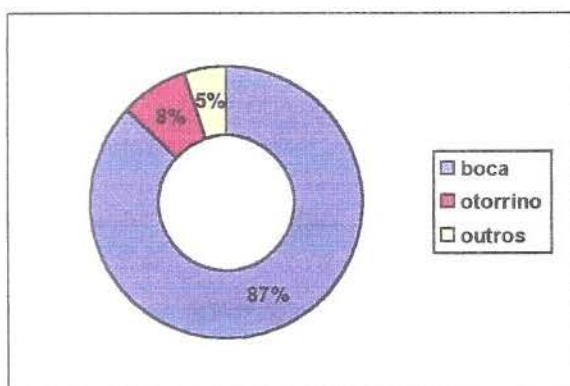


FIGURA 2- Etiologia geral da halitose

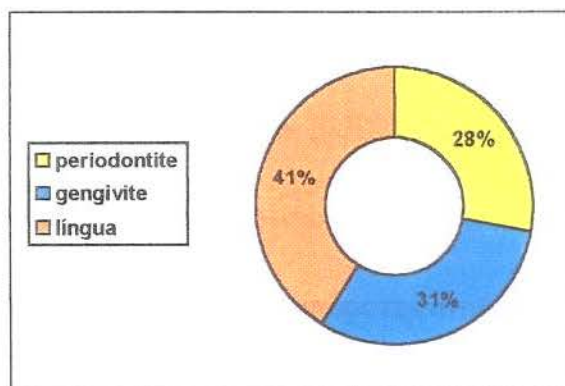


FIGURA 3- Etiologia bucal da halitose

Diagnóstico

Existem descritas na literatura algumas técnicas para a detecção dos CSV, como a análise organoléptica, a cromatografia gasosa e as análises bioquímicas de saliva total, porém são artifícios laboratoriais, às vezes de alto

custo, que se justificam para uso científico. O monitor de sulfidrilos portátil (ROSENBERG et al., 1991), HALIMETER RH-17E, Interscan Corporation-USA, é um aparelho que foi introduzido recentemente no mercado mundial e tem sido utilizado tanto em pesquisas clínicas quanto em ambiente de consultório. O método é de fácil utilização e detecta a produção real dos compostos voláteis CSV do indivíduo, diferindo do método salivar onde existe a indução da formação dos grupos sulfidrilos laboratorialmente (TONZETICH, 1978; SCHMIDT & TARBET, 1978; KOSTELC et al., 1984; ROSENBERG et al., 1991; ROSENBERG et al., 1991; YAEKAKI & SANADA, 1992; BOSY et al., 1994).

Aspectos Periodontais

A Periodontia ignorou por muito tempo o problema do mal odor bucal. Após a descrição das bases biológicas da halitose por TONZETICH et al. (1996), a comunidade científica tem mostrado interesse nesta área. Porém, recentemente este problema tem recebido uma atenção especial pelos periodontistas, visto que uma grande parte da população adulta portadora de doenças periodontais sofre de quadros de halitose e vai procurar o tratamento nos seus consultórios.

Alguns trabalhos tem merecido destaque na literatura que se refere aos aspectos periodontais e sua relação com a halitose. Utilizando o modelo da gengivite experimental, foi demonstrado, através da cromatografia gasosa, que a

produção de grupos sulfidrilos salivares estaria aumentada nos quadros de gengivite e diminuída em quadros de saúde gengival (KOSTELC et al., 1984). Já o trabalho de YAEAGAKI et al. (1992) demonstrou a produção de CSV em quadros de periodontite do adulto, e o efeito da remoção da saburra lingual na redução da halitose nestes pacientes. Os autores verificaram altas concentrações de CSV no hálito dos pacientes com bolsas maiores ou iguais a 4 mm de profundidade, quando comparados à pacientes que tinham bolsas menores que 4mm, concluindo que a presença de altas concentrações de CSV, especialmente o metilmercaptano, poderiam acelerar a progressão da perda de inserção periodontal.

KOZLOVSKY et al. (1994) investigaram a associação entre o teste BANA (utilizado para detecção de microorganismos produtores de enzimas tipo tripsina) e os parâmetros de malodor bucal. A partir de amostras obtidas da saliva e sulco gengival, os resultados deste trabalho sugeriram que os valores obtidos com o teste BANA estariam associados ao malodor bucal, indicando o seu uso na avaliação da formação de grupos sulfidrilos.

Tratamento

O objetivo do tratamento da halitose está direcionado na eliminação do malodor bucal do paciente afetado, de acordo com a sua etiologia. Para RICHTER

(1996) o tratamento consiste em três fases: eliminação da halitose; orientação do paciente no controle das variáveis etiológicas e monitoramento do paciente na sua evolução pessoal na superação da apreensão psicossocial e desconforto relacionados ao mau hálito.

Obviamente, tratando-se de problemas de etiologia sistêmica, local ou psicológica, a terapia indicada é a redução dos níveis de CSV bucais. Nos casos onde a higiene bucal está comprometida, os métodos de higiene bucal e a educação do paciente para saúde como um todo são os eleitos, onde devem ser previstas instruções de remoção mecânica de placa dental (escova dental, fio dental e dispositivos de limpeza da língua), prescrição de auxiliares químicos e remoção profissional de acúmulos de cálculo, bem como nos casos de periodontite o tratamento das bolsas periodontais existentes.

Porém, a grande dificuldade no tratamento da halitose reside na sua própria etiologia. **BEN-ARYEH et al.** (1998) através de suas experiências na clínica de halitose com a utilização de vários recursos diagnósticos, afirmaram que 26% dos pacientes sofrem de problemas otorrinolaringológicos, 23% sofrem de problemas odontológicos, 18% queixam-se de desconforto oral e 10% de patologias gastrointestinais. No entanto 31% daqueles que se queixam de halitose não apresentam um problema clínico detectável, indicando inclusive

casos de halitose psicológica.

Na área da Periodontia, os estudos indicam que a halitose pode ser controlada pela eliminação do acúmulo de placa dental e do tratamento de quadros de gengivite e periodontite, bem como a constante limpeza da língua e o uso da clorexidina (ROSENBERG et al., 1992; QUIRYNEN et al., 1998). Alguns estudos clínicos têm sido realizados com o objetivo de avaliar o efeito de dentifrícios contendo triclosan na formação dos compostos voláteis sulfurados.

HUNTINGTON et al. (1995) demonstraram que o uso regular de um dentifrício contendo triclosan-zinco reduzia significativamente os níveis de grupos sulfidrilos quando comparado ao uso de um dentifrício placebo. NILES et al. (1994) mostraram que o uso continuado de um dentifrício contendo triclosan-copolímero reduzia a formação dos sulfidrilos. Outro estudo desenvolvido por NILES (1994) indicou que o uso prolongado de um dentifrício contendo triclosan-copolímero reduzia significativamente o malodor bucal, oferecendo uma proteção inclusive durante o período da noite.

BRUNETTE & NELSON (1998) indicam a utilização de um dentifrício contendo a associação entre bicarbonato de sódio e zinco na redução dos VSC, que se manteria por até 3 horas após a escovação. Bochechos com cloridrato de zinco também têm sido indicados (CURTIS et al., 1998). O trabalho de

GREENSTEIN et al. (1997) demonstrou alguns benefícios com a utilização de bochechos comerciais oxidantes no tratamento da halitose, quando comparado à ineficiência do consumo de gomas de mascar e produtos comestíveis a base de menta (refrescantes bucais vendidos comercialmente, como o Tic Tac- Ferrero, Germany).

PROPOSIÇÃO

PROPOSIÇÃO

O presente trabalho, dentro das condições experimentais utilizadas, teve como objetivos:

(1) avaliar comparativamente a atividade das enzimas tipo tripsina presentes na placa dental bacteriana acumulada na presença de dentifrícios contendo triclosan e associações, após 21 dias de indução de gengivite experimental em humanos;

(2) avaliar comparativamente a formação dos compostos sulfurados voláteis (CSV) na presença de dentifrícios contendo triclosan e associações, antes e após os 21 dias de indução de gengivite experimental em humanos.

MATERIAL E MÉTODOS

M A T E R I A L E M É T O D O S

I. SELEÇÃO DA AMOSTRA

Para o presente estudo, foram selecionados 19 estudantes da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, que se apresentaram como voluntários, e que concordaram em participar desta pesquisa.

I.a. Critérios de Seleção

Foram selecionados entre os estudantes, 13 mulheres e 6 homens, com faixa etária entre 19-30 anos, após um exame clínico-anamnésico, os quais não apresentavam história médica de doenças sistêmicas ou uso permanente de drogas; não eram fumantes; as do sexo feminino não estavam em gestação; todos apresentando pelo menos vinte dentes na boca, e pelo menos quatro dentes mandibulares (entre canino e segundo molar), ausência de próteses dentárias e de profundidade de sondagem maior ou igual a três milímetros (ausência de bolsas periodontais), além de apresentarem Índice de Placa (SILNESS & LÖE, 1964) e Índice Gengival (LÖE, 1967) menores que 1. Os dados dos participantes da pesquisa foram anotados na ficha clínica periodontal e no questionário anamnésico (anexo A1).

I.b. Aspectos Éticos da Pesquisa

Os voluntários assinaram o Termo de Consentimento para Tratamento e Pesquisa, segundo o Código de Ética Profissional Odontológico (C.F.O. 179/93) e a Declaração de Helsinque II (anexo A2). A pesquisa teve a aprovação do Comitê de Ética da FOP-UNICAMP (apêndice 5).

II) CONFEÇÃO DA MATRIZ INDIVIDUAL

A partir da seleção da amostra dos voluntários, seguiu-se a execução da etapa laboratorial, com a confecção das 19 matrizes de polivinilacetato.

II. a. Confecção do Modelo

Os 19 voluntários foram atendidos na clínica de pós-graduação da área de Periodontia da FOP - UNICAMP, onde os quatro dentes mandibulares foram moldados com alginato* e com moldeira parcial#; o molde foi então vazado em gesso pedra^Ψ para obtenção do modelo de trabalho.

II. b. Confecção da Placa de Alívio

Sobre cada modelo, utilizando-se um plastificador à vácuo[∞], confeccionou-se previamente uma placa de alívio com uma lâmina de polivinilacetato[∞] do tipo cristal, com 1mm de espessura. Esta placa deveria recobrir toda a área

* JELTRATE (São Paulo, S.P. - Brasil)

TENAX (São Paulo, S.P. - Brasil)

Ψ HERODENT (São Paulo, S.P. - Brasil)

∞ BIOART (São Paulo, S.P.- Brasil)

dental, inclusive ultrapassando 2 mm a margem gengival, tanto na vestibular como na lingual. A placa assim recortada, serviria para criar um espaço que propiciaria o acúmulo de placa na porção cervical dos dentes teste, sob a matriz individual final a ser confeccionada.

II. c. Confeção da Matriz

Sobre a placa de alívio reposicionada no modelo, foi confeccionada uma matriz individual ("toothshield"), utilizando-se uma lâmina de polivinilacetato do tipo cristal, com 2 mm de espessura, igualmente preparada no plastificador à vácuo e recortada conforme foi a placa de alívio (fig. 4).



FIG. 4: Matriz individual de polivinilacetato de 2mm de espessura, confeccionada sobre a placa de alívio, destacada do modelo de gesso.

III. DENTIFRÍCIOS

As amostras dos dentifrícios Kolynos Ação Total (Kolynos do Brasil, S.P.), Colgate Total (Gessy Lever, S.P.), Signal Global (Gessy Lever, S.P.) e o placebo Sorriso (Kolynos do Brasil, S.P.) foram compradas no comércio brasileiro. As amostras do dentifrício Crest Complete (Procter & Gamble, England, U.K.) foram compradas no comércio de Londres (Inglaterra, U.K.). Todas as amostras foram reentubadas em tubos idênticos (fig. 5), e codificadas em laboratório especializado (Laboratório Proderma, Piracicaba, S.P.), para que nem o examinador nem o paciente soubessem identificar o conteúdo das mesmas.



FIG. 5: Amostras padronizadas dos dentifrícios utilizados na pesquisa, codificadas - A, B, C, D e E - para o estudo duplo cego.

O sigilo dos códigos foi revelado no final do estudo. Todos os participantes testaram os cinco dentifrícios, em períodos alternados, de acordo com o estudo cruzado proposto.

III.a. Dentifrício SORRISO - placebo

Composição:

- Monofluorofosfato de sódio MFP (1200 ppm);
- Carbonato de cálcio;
- Laurilsulfato de sódio;
- Carboximetilcelulose;
- Sacarina sódica, Sorbitol;
- Aroma;
- Água desmineralizada.
- Corante azul (adicionado à fórmula original para a pesquisa)

III.b. Dentifrício KOLYNOS AÇÃO TOTAL

Composição:

- Triclosan (0,3%);
- Citrato de zinco (0,75%);
- Gantrez® (2%);
- Pirofosfato de sódio (4%);
- Fluoreto de sódio NaF (1100 ppm);
- Dióxido de silício;
- Laurilsulfato de sódio;
- Sacarina sódica;
- Corante azul;
- Aroma;
- Água desmineralizada.

III.c. Dentifrício COLGATE TOTAL

Composição:

- Triclosan (0,3%);
- Gantrez® (2%);
- Fluoreto de sódio NaF (1100 ppm);

- Dióxido de silício;
- Laurilsulfato de sódio;
- Sacarina sódica;
- Corante azul;
- Aroma;
- Água desmineralizada.

III.d. Dentifrício SIGNAL GLOBAL

Composição:

- *Triclosan* (0,3%);
- *Citrato de zinco* (0,75%);
- Fluoreto de sódio NaF (1100 ppm);
- Dióxido de silício;
- Laurilsulfato de sódio;
- Sacarina sódica;
- Corante azul;
- Aroma;
- Água desmineralizada.

III.e. Dentifrício CREST COMPLETE

Composição:

- *Triclosan* (0,3%);
- *Pirofosfato tetrapotássico/tetrassódico/dissódico* (5%);
- Fluoreto de sódio NaF (0,32%);
- Sílica hidratada;
- Laurilsulfato de sódio;
- Sorbitol;
- Xanthan Gum;
- Glicerina
- Carbômero
- Fosfato dipotássico/sódico
- Aroma;
- Água.

IV. DELINEAMENTO DO ESTUDO

IV.1. FASE CLÍNICA DA PESQUISA

Um estudo cruzado, duplo cego, foi realizado com os 19 estudantes, de acordo com o modelo de gengivite experimental modificado (**SAXTON & van der OUDERAA**, 1989). Os voluntários foram divididos aleatoriamente em cinco grupos denominados de Grupos I, II, III, IV e V, após o sorteio de um nome para cada número preestabelecido. O experimento constou de uma fase inicial (pré-experimental) de trinta dias e subsequente de uma fase experimental composta de cinco períodos de 21 dias nos quais foram testados os dentifrícios, com intervalos entre eles de trinta dias.

IV.1. a. FASE PRÉ-EXPERIMENTAL

Os voluntários se submeteram a um exame bucal criterioso realizado pelo pesquisador, para levantar inicialmente o Índice de Placa de **SILNESS & LÖE** (1964) - **IPL** -, o Índice Gengival de **LÖE** (1967) - **IG** - e o Índice de Sangramento Gengival de **AINAMO & BAY** (1975) - **IS** de todos os dentes (apêndice 1), visando o balanceamento entre os grupos. Foi realizada, em seguida, a remoção profissional da placa dental bacteriana em todas as superfícies dentais de cada voluntário. Os dados foram anotados em fichas clínicas da disciplina de Periodontia da FOP - UNICAMP. Só após este exame inicial, os 19 voluntários foram divididos aleatoriamente nos cinco grupos, de acordo com o

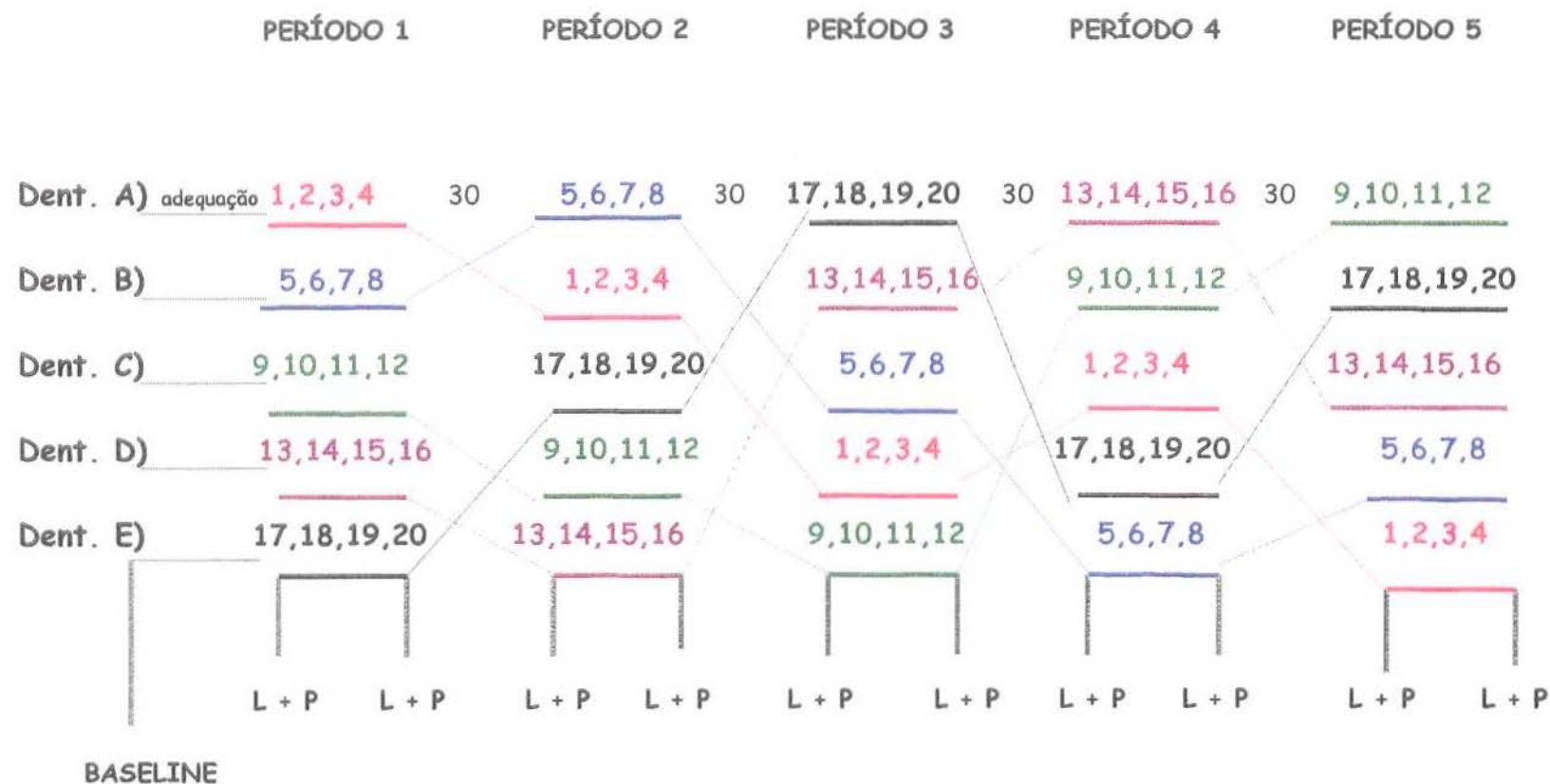
delineamento da pesquisa, passando por um período de trinta dias (adequação), para obter-se uma condição ecológica bacteriana equilibrada, onde todos eles escovaram seus dentes de maneira habitual, mas com o dentifrício controle e com a escova dental padronizada (*) de cerdas macias.

IV.1. b. FASE EXPERIMENTAL

Imediatamente após a fase pré-experimental foi iniciada a fase experimental, que constou de cinco períodos de 21 dias, com intervalos de trinta dias (período "wash out") conforme o diagrama proposto (pág. 47), onde os voluntários foram divididos por sorteio em cinco grupos de quatro indivíduos:

* JOHNSON'S (São Paulo, S.P. - Brasil)

IV.1.c. Diagrama do cruzamento dos dentifrícios nos 05 períodos experimentais.



LEGENDA

L= LEVANTAMENTO DE ÍNDICES P= PROFILAXIA 30 = INTERVALOS

Todos receberam no início de cada período um "kit" individual contendo: a matriz individual previamente confeccionada, acondicionada numa caixa plástica personalizada; uma escova dental nova padronizada (*), e uma bisnaga de dentifrício codificada de acordo com os respectivos grupos.

Durante os 21 dias de cada período experimental, três vezes por dia, os voluntários deveriam preencher a matriz individual com o dentifrício "codificado", levando-a à cavidade bucal para recobrir os dentes teste, permitindo assim a retenção e um íntimo contato do dentifrício com a superfície dental. A matriz permanecia no local durante o período habitual da escovação dental, a fim de eliminar uma provável ação mecânica involuntária da escova sobre essa região (fig. 6). Os outros dentes eram escovados da maneira usual, sem nenhuma alteração nos seus hábitos e com o mesmo dentifrício. Após a escovação, a matriz deveria ser removida, sendo sugerido o enxágüe bucal com água corrente e a não ingestão de alimentos por duas horas.

Todos receberam instruções, verbais e por escrito, para a utilização correta da matriz (anexo A4) e dos dentifrícios; no entanto, não foram dadas outras instruções de higiene bucal.

* JOHNSON'S (São Paulo, S.P. - Brasil)

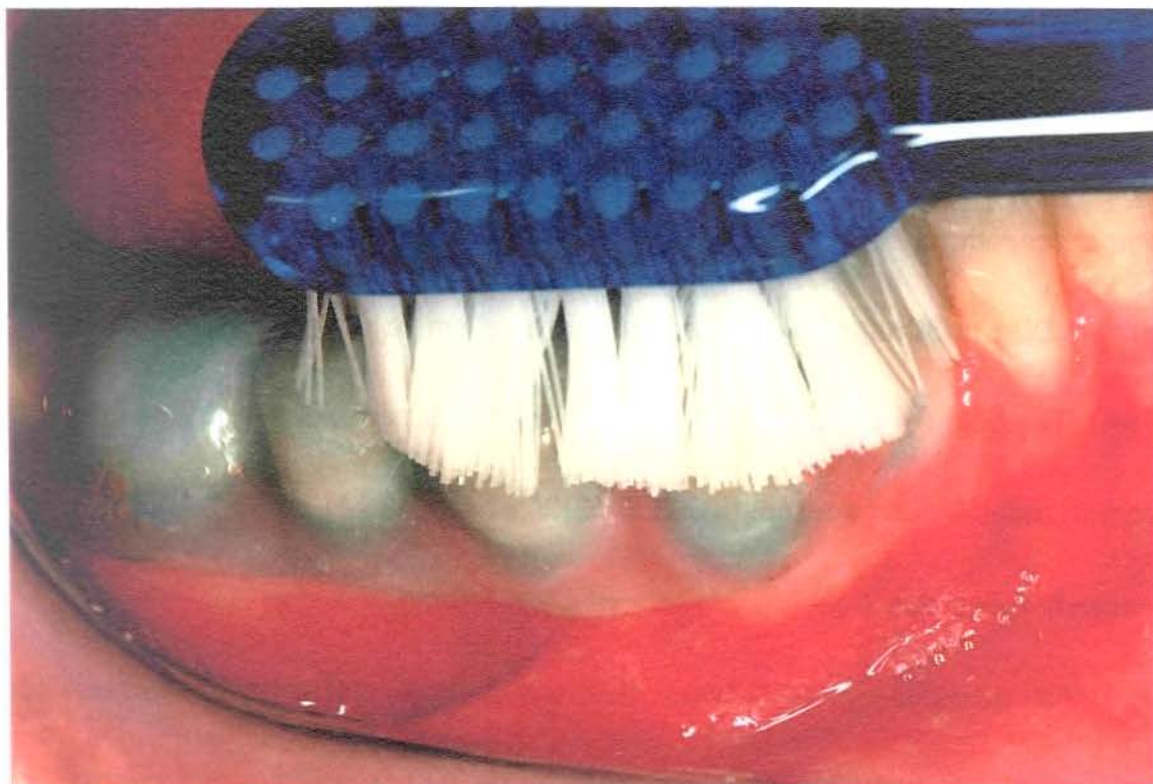


FIG.6: Matriz individual de polivinilacetato (2mm) preenchida com o dentifrício experimental, protegendo os dentes teste da ação mecânica da escova dental, durante a escovação habitual de um voluntário.

IV.2- FASE LABORATORIAL

IV.2. a. FLUXO SALIVAR

Coleta da saliva estimulada

Nos dias "0" e "21" de todos os períodos da fase clínica experimental, foram coletadas amostras salivares através da goma base (01 grama) mastigada por 5 minutos, onde toda a saliva produzida era expectorada num copo plástico de 50 ml devidamente codificado e pré-pesado. A saliva foi então pesada numa balança de precisão, e o valor obtido subtraído do peso dos copos plásticos, para que se obtivesse o fluxo salivar (ml/min) de cada voluntário.

IV.2.b. AVALIAÇÃO DOS COMPOSTOS SULFURADOS VOLÁTEIS (CSV)

Preparação dos voluntários

Nos dias 0 e 21 de cada período experimental, os voluntários compareceram na clínica de Periodontia da FOP-UNICAMP no período da manhã, entre 7:00 e 8:30hs, sem escovar os dentes e em jejum absoluto (BOSY et al., 1994). Também foi solicitado que fossem evitados perfumes e outros cosméticos aromatizados de uso pessoal (KOZLOVSKY et al., 1994).

Concentrações dos CSV

As medidas quantitativas dos compostos sulfurados voláteis foram realizadas com a utilização de um monitor de sulfetos industrial portátil* (fig. 7), o qual apresenta um visor digital que era sempre zerado no ar do ambiente anteriormente a cada medida, para que pudesse ser visualizado o pico máximo das concentrações dos CSV expressas em partes por bilhão (ppb).

Para as tomadas de hálito, cada voluntário deveria ficar em silêncio sem abrir a boca por 3 minutos, respirando pelo nariz (BOSY et al., 1994). Pedia-se então que o voluntário abrisse a boca para que fosse introduzido na cavidade bucal do mesmo um canudo de plástico, que estava conectado ao monitor através de uma mangueira de borracha, até aproximadamente 4 centímetros (fig. 8).

* HALIMETER RH-17E, Interscan Corporation (Chatsworth, USA)



FIG.7: Monitor de sulfetos industrial portátil utilizado para quantificação dos CSV no DIA 0 e DIA 21 de cada período experimental de 21 dias.



FIG.8: Quantificação da concentração dos CSV pelo monitor, mostrando um voluntário introduzindo o canudo de plástico na cavidade bucal até aproximadamente 4cm.

O voluntário então deveria respirar pelo nariz durante o processo, para que a bomba a vácuo do monitor sugasse o ar através do canudo numa proporção de aproximadamente 1500mL/min. A medida em que a amostra de ar passava através do sensor eletrolítico no interior do monitor, uma concentração de CSV era estimada. O pico máximo dos voláteis (PMCSV) de cada voluntário era então determinado em partes por bilhão (ppb) equivalentes aos compostos sulfurados, através da leitura direta da escala analógica do monitor.

IV.2. c. ANÁLISE DA PLACA DENTAL BACTERIANA

Para a análise da placa bacteriana dos voluntários da pesquisa, realizou-se inicialmente a coleta de um "pool" de placas de cada indivíduo.

Coleta da placa

No dia "21" de cada período, foram coletadas as placas bacterianas formadas na região-teste da pesquisa de cada voluntário, a qual compreendia quatro dentes mandibulares que ficaram protegidos da escovação habitual com a matriz individual. Para cada período foram utilizados: 19 tubos de microcentrifugação pré-pesados e codificados de acordo com o código individual e imutável de cada voluntário da pesquisa e 19 curetas periodontais do tipo Gracey devidamente esterilizadas. A área-teste foi secada e isolada com rolos

de algodão estéreis para então ser realizada a coleta da placa dental supra e subgingival acumuladas nos dentes-teste, com o uso do bordo não cortante da cureta, (figs. 9 e 10) a fim de evitar a remoção de raspas de esmalte dental. O "pool" de placa obtido de cada voluntários foi acondicionado individualmente em tubos pré-pesados (fig.11). Imediatamente após a coleta, os tubos foram então novamente pesados e os valores tabulados em uma ficha apropriada.

Congelamento

Os 19 tubos codificados de cada etapa foram congelados para a manutenção das placas coletadas, propiciando as futuras análises.



FIG.9: Coleta da placa dental supragengival acumulada no período clínico de 21 dias nos dentes-teste, através do uso do bordo não cortante da cureta de Gracey.



FIG.10: Coleta da placa dental subgengival acumulada no período clínico de 21 dias nos dentes-teste, através do uso do bordo não cortante da cureta de Gracey.



FIG.11: "Pool" de placa obtido nos quatro dentes-teste de um dos voluntários, acondicionado individualmente em tubo eppendorf.

Procedimentos enzimáticos

A avaliação da atividade enzimática da placa coletada foi realizada no Laboratório de Bioquímica da FOP-UNICAMP. Este teste consistiu em colocar a amostra em contato com um substrato (BAPNA), a fim de que as enzimas tipo tripsina presentes o degradasse, originando uma reação colorimétrica amarelada (fig.12), cuja intensidade seria proporcional à atividade enzimática da placa, sendo um indicativo da presença de periodontopatógenos. Após o período de incubação, foi realizada a leitura da coloração resultante por espectrofotometria em comprimento de onda de 405nm (fig. 13) e a absorbância resultante de cada amostra relacionada com a quantidade de placa e o período de incubação das amostras (resultados expressos em nmol de enzima que estaria sendo liberado por mg de placa por minuto, ou seja, nmol/ mg placa x min).

Para o preparo da placa bacteriana na determinação da atividade de enzima tipo tripsina acrescentou-se, em cada eppendorf (contendo as amostras de placa), 1ml de tampão Tris 0,05M pH 7,5 (com 5mM de CaCl_2) contendo 1mM de BAPNA, independente do peso da placa. Preparou-se também um eppendorf de "Blank" de enzima contendo apenas 1ml de Tris/BAPNA (sem placa). Os tubos foram agitados no Vortex e colocados, na presença de gelo, em um processador ultra-sônico de 100 watts por 10 minutos com ciclos de 2 segundos seguidos de 2 segundos de descanso.

Após estes procedimentos, as amostras foram incubadas em banho-maria, a 37°C, por 17 horas. A reação foi parada, em gelo, acrescentando-se 100µl de ácido acético, para então serem centrifugadas por 5 minutos. Finalmente, era realizada a leitura no espectrofotômetro a 405nm.

Para o cálculo da atividade enzimática, foi estabelecido o seguinte cálculo:

A= Absorbância da amostra contendo a placa bacteriana - Absorbância do Blank de Tris/BAPNA sem placa bacteriana.

$$\begin{array}{rcl} 1\text{mol do produto} & \text{_____} & \text{Absorbância de 8800} \\ 1000\text{mmol do produto} & \text{_____} & 8800 \\ X & \text{_____} & A \\ X\text{mmol} \times 1000 = & X\mu\text{mol do produto} \end{array}$$

$$\begin{array}{rcl} X \mu\text{mol do produto} & \text{_____} & 1020 \text{ min (17 horas} \\ & & \text{de incubação)} \\ Y & \text{_____} & 1 \text{ min} \end{array}$$

$$\begin{array}{rcl} Y \mu\text{mol/ min} & \text{_____} & \text{peso de placa} \\ & & \text{coletada em mg} \\ Z & \text{_____} & 1 \text{ mg} \end{array}$$

$$\text{Logo } Z = \mu\text{mol/mg placa} \times \text{min} \times 1000 = \text{nmol/mg placa} \times \text{min}$$

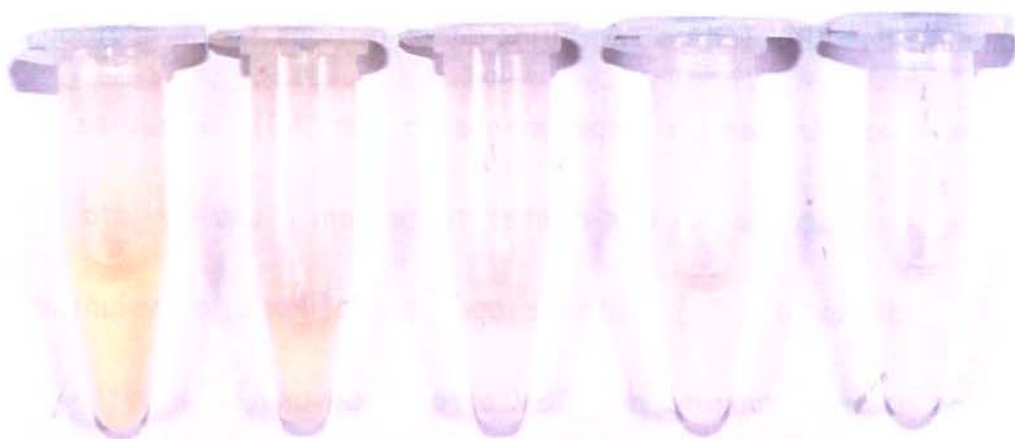


FIG.12: Amostras de placa após a incubação, apresentando as reações colorimétricas (tons de amarelo) proporcional à atividade de tripsina (teste BAPNA).



FIG.13: Espectrofotômetro utilizado para detecção da reação colorimétrica (OD 405) obtida com o substrato BAPNA nas amostras de placa dental dos voluntários.

V- COLETA DE DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS

No DIA 0 de cada período foi realizado, em todos voluntários, o levantamento dos **IPL**, **IG** e o **IS**, cujos dados obtidos foram anotados na ficha clínica desenvolvida para o experimento (anexo A3). Seguiu-se a remoção profissional da placa dental dos dentes teste com o uso do jato abrasivo de bicarbonato de sódio (*). Antes e após a profilaxia, os voluntários foram submetidos ao levantamento dos CSV através do uso do monitor portátil de sulfetos (**).

No último dia de cada período, DIA 21, foi realizada, em todos voluntários, a coleta da placa dental acumulada, e também o levantamento dos CSV dos mesmos. Seguiu-se, após a coleta da placa e da análise dos CSV, uma profilaxia profissional com jato abrasivo de bicarbonato de sódio. A bisnaga de dentifrício codificada foi devolvida junto à escova utilizada ao final de cada período, evitando a reutilização das mesmas. A matriz individual de cada voluntário era também devolvida para o pesquisador, sendo substituída para o próximo período experimental.

* GNATUS (São Paulo, S.P.)

** HALIMETER RH-17E, Interscan Corporation (Chatsworth,USA)

Nos intervalos (períodos "wash out") de trinta dias, entre os períodos experimentais, os voluntários voltavam a praticar sua higiene bucal convencional com o dentífrício placebo e uma escova dental nova, fornecidos pelo pesquisador.

VII- FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os dados obtidos da análise enzimática da placa dental e da concentração dos CSV, depois de tabulados, foram analisados estatisticamente pelo teste t de "Student", pelo teste de Kruskal Wallis e pela correlação de Pearson, de acordo com o parâmetro em questão.

RESULTADOS

RESULTADOS

I. OBSERVAÇÕES PESSOAIS DOS VOLUNTÁRIOS

Os grupos foram semelhantes em relação a idade. Houve uma boa aceitação entre os grupos quanto ao uso dos dentifrícios estabelecidos e da matriz individual durante todo o experimento. A concordância foi satisfatória quanto ao regime proposto de escovação a ser executada três vezes ao dia, com o uso concomitante da matriz. Os voluntários receberam da entidade financiadora do projeto (FAPESP) o valor de R\$150,00 (cento e cinquenta reais) para o ressarcimento de gastos pessoais de alimentação e transporte, durante o experimento. Dos 20 participantes que iniciaram a pesquisa, 19 completaram todas as etapas.

II. OBSERVAÇÕES CLÍNICAS

II. a. Placa Dental Bacteriana

Constatou-se visualmente que ocorreu a formação de placa dental em todos os voluntários em quantidades variáveis, de acordo com as características individuais de cada um, e do tipo de dentifrício - A, B, C, D ou E que estava

sendo empregado (fig. 14), o que confirmou clinicamente o modelo experimental utilizado. Foi realizado o levantamento do **IPL** no início de cada um dos cinco períodos da fase experimental (*DIA 0*), sempre antes da remoção profissional da placa dental (apêndice 1). Isto foi feito com o intuito de observar e acompanhar o balanceamento dos grupos, verificando a homogeneidade da amostra.



FIG.14. Aspecto clínico no final do período experimental (Dia 21), da região onde foi suprimida a escovação. Observa-se, após evidenciação com fuccina básica, a grande quantidade de placa dental formada.

II. b. Inflamação Gingival

Clinicamente pode-se observar no exame visual que, no decorrer dos cinco períodos experimentais, houve a ocorrência da inflamação da gengiva marginal, que agravou-se do início - *DIA 0* - para o final - *DIA 21* - (fig.15). No entanto, após a remoção profissional da placa dental, e durante o período de intervalo entre os períodos teste, havia a remissão deste quadro, o que caracterizou a volta dos tecidos gengivais aos aspectos clínicos da normalidade. Foi realizado o levantamento do **IG** no início de cada um dos cinco períodos da fase experimental (*DIA 0*), sempre antes da remoção profissional da placa dental (apêndice 1).



FIG.15. Aspecto clínico no final do período experimental (Dia 21) onde foi suprimida a escovação. Observa-se a gengivite marginal na região dos dentes 42, 43e 44.

III. RESULTADOS ESTATÍSTICOS

Na decodificação dos dentifrícios avaliados após a finalização dos períodos experimentais, de acordo com o delineamento duplo cego da pesquisa, foram identificadas as amostras como se segue:

AMOSTRA A - dentifrício placebo

AMOSTRA B - dentifrício CREST COMPLETE® (triclosan + pirofosfato)

AMOSTRA C- dentifrício KOLYNOS AÇÃO TOTAL®(triclosan + zinco + copolímero + pirofosfato)

AMOSTRA D- dentifrício SIGNAL GLOBAL®(triclosan + zinco)

AMOSTRA E - dentifrício COLGATE TOTAL®(triclosan + copolímero)

Para os tratamentos A, B, C, D e E foram avaliadas estatisticamente as variáveis: enzimas tipo tripsina (BAPNA), compostos sulfurados voláteis (CSV) e fluxo salivar. As avaliações estatísticas foram utilizadas de acordo com cada variável (nível de significância dos testes em 5% de significância):

- Fluxo salivar (na comparação entre períodos), foi realizada a análise de variância com um critério de classificação (teste de Kruskal-Wallis);
- BAPNA, CSV0, CSV21 e CSV foi utilizado o delineamento "cross-over" (Comparações de médias: teste *t*);
- CSV21 e BAPNA. (Coeficiente de Correlação de Pearson).

III.1. AVALIAÇÃO DO FLUXO SALIVAR

O teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis para comparação de fluxo salivar, nos dias 0 e 21, entre os 05 períodos experimentais não apresentou significância estatística ($P= 0,0905$).

III.2. AVALIAÇÃO ENZIMÁTICA

BAPNA: No dia 21, os tratamentos A, B e D não diferiram entre si e diferiram dos demais. O tratamento C diferiu significativamente dos demais, o mesmo ocorrendo com o tratamento E (tabela 1).

TABELA 1. Médias e seus desvios padrão da atividade específica de enzimas tipo tripsina (teste BAPNA) na placa dental após os tratamentos.

Tratamentos	Nmol produto/mgxmin
Placebo	10,98a $\pm$ 0,61
Tri+Ppi	11,35a $\pm$ 1,75
Tri+Zn+Ppi+G	2,82b $\pm$ 0,43
Tri+Zn	9,41a $\pm$ 1,95
Tri+G	6,03c $\pm$ 1,17

(médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de 5% de significância)

III.3. AVALIAÇÃO DOS CSV

CSV - dia 0: Os resultados da análise através do delineamento Cross-Over indicam que apenas a variável CSV no dia 0 não apresentou diferença significativa entre os tratamentos.

CSV - dia 21: A maior média foi observada com o tratamento A diferindo significativamente dos demais. A segunda maior média foi observada com o tratamento D, ocorrendo o mesmo que A. Os tratamentos C e E não diferiram entre si e este último não diferiu de B;

CSV - diferença entre o 21º dia e o dia 0: Os tratamentos A e D não diferiram entre si e diferiram dos demais. E os tratamentos B, C e E não diferiram entre si.

A tabela 2 apresenta os resultados numéricos da análise estatística:

TABELA 2. Médias e seus desvios padrão dos valores dos compostos sulfurados voláteis CSV (ppb) no hálito bucal dos voluntários antes e após os tratamentos.

Tratamentos	Condição	
	Antes	Depois
Placebo	28,53a $\pm$ 2,12	81,84a $\pm$ 4,22
Tri+Ppi	28,47a $\pm$ 2,62	48,79b $\pm$ 1,98
Tri+Zn+Ppi+G	25,53a $\pm$ 2,44	40,21c $\pm$ 2,67
Tri+Zn	27,16a $\pm$ 2,03	71,16e $\pm$ 2,98
Tri+G	27,05a $\pm$ 1,90	44,53bc $\pm$ 1,94

(médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de 5% de significância)

III.4. AVALIAÇÃO COMPARATIVA DAS VARIÁVEIS CSV E BAPNA

Na tentativa de correlacionar os níveis de CSV e a presença da atividade de enzimas tipo tripsina foram montadas duas tabelas (3 e 4) para a possível identificação desta correlação. Os valores numéricos de todas as variáveis nos períodos experimentais, bem como sua significância estatística estão igualmente apresentados.

TABELA 3- Comparação entre as médias das variáveis CSV e BAPNA e seus desvios padrão, nos períodos experimentais dos tratamentos A, B, C, D e E.

Variáveis	Tratamentos	Médias	DP
CSV dia 0	Placebo	28,53 a	2,12
	Tri+Ppi	28,47 a	2,62
	Tri+Zn+Ppi+G	25,53 a	2,44
	Tri+Zn	27,16 a	2,03
	Tri+G	27,05 a	1,90
CSV dia 21	Placebo	81,84 a	4,22
	Tri+Ppi	48,79 b	1,98
	Tri+Zn+Ppi+G	40,21 c	2,67
	Tri+Zn	71,16 e	2,98
	Tri+G	44,53 bc	1,94
BAPNA dia 21	Placebo	10,98 a	0,61
	Tri+Ppi	11,35 a	1,75
	Tri+Zn+Ppi+G	2,82 b	0,43
	Tri+Zn	9,41 a	1,95
	Tri+G	6,03 c	1,17

(médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de 5% de significância)

TABELA 4- Resultados das correlações entre as variáveis de interesse, em cada tratamento estudado:

Tratamento Placebo	BAPNA
CSV 21º DIA	-0,45197 (0,0520)
Tratamento Tri+Ppi	BAPNA
CSV 21º DIA	0,23477 (0,3333)
Tratamento Tri+Zn+Ppi+G	BAPNA
CSV 21º DIA	0,33526 (0,1606)
Tratamento Tri+Zn	BAPNA
CSV 21º DIA	-0,10102 (0,6807)
Tratamento Tri+G	BAPNA
CSV 21º DIA	0,55593 (0,0135) *

* coeficiente de correlação significativo 5%

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

Com a proximidade do ano 2000, inicia-se uma reflexão sobre os avanços na higiene bucal (FISCHMANN, 1997). A despeito dos novos estilos de vida e da dieta "junkie" do século XX, ainda reside no controle da placa dental bacteriana, quer seja por métodos mecânicos quer seja por métodos químicos auxiliares, o principal recurso na prevenção e combate da cárie dental e da doença periodontal.

Esta pesquisa teve por objetivos avaliar o efeito de dentifrícios contendo triclosan e associações na atividade de enzimas tipo tripsina e na formação de CSV durante a gengivite experimental. Dos 20 voluntários que iniciaram a pesquisa, 19 chegaram ao final dela. Logo considerou-se satisfatória a aceitação dos voluntários ao regime proposto, possivelmente em virtude do modelo experimental escolhido, que os privou da escovação de apenas quatro dentes. Outro dado relevante foi a escovação dental de três vezes ao dia; isto porque, apesar de alguns estudos internacionais usualmente implementarem um regime de duas escovações, os voluntários desta pesquisa optaram por este regime, fato este constatado quando do preenchimento do questionário anamnésico.

A gengivite experimental tem sido utilizada por vários autores, desde sua concepção por LÖE et al. (1965), com o intuito de estudar a inflamação gengival obtida pelo acúmulo de placa dental bacteriana através da supressão total da escovação dental. Neste presente estudo utilizou-se o modelo da gengivite experimental, mas em regiões parciais da boca (SAXTON & van der OUDERAA, 1989), para a avaliação da efetividade de dentifrícios contendo triclosan e associações na formação de compostos sulfurados voláteis CSV e na atividade de enzimas tipo tripsina da placa dental. O modelo da gengivite experimental também pode ser útil para o estudo da iniciação da doença periodontal em humanos. LAMSTER et al. (1985) estudaram os eventos histológicos que acontecem durante a gengivite experimental. O tecido conjuntivo subjacente ao epitélio sulcular inicia seu processo de perda de colágeno já no segundo dia de experimento; com uma semana a lesão formada no conjuntivo pode envolver de 5 a 15% do tecido periodontal marginal, e após 21 dias, nota-se a perda de porções de tecido conjuntivo. Os achados destes autores indicam que o mecanismo homeostático do hospedeiro é o responsável pelo equilíbrio entre agressores (enzimas microbianas) e agressão (inflamação), através da liberação de inibidores de proteases (SHENKEIN & GENCO, 1977), como as anti-tripsinas, anti-papaínas e α_2 -macroglobulinas no fluido gengival crevicular, produzidas

localmente por fibroblastos e macrófagos.

A fase pré-experimental de trinta dias, desta pesquisa, está de acordo com outros trabalhos (HULL, 1980; SAXTON & van der OUDERAA, 1989; SAXTON et al., 1993) que utilizaram períodos de três a quatro semanas. Uma preocupação metodológica importante foi a homogeneidade da amostra que se submeteu à esta pesquisa clínica, observada nos valores do CSV, fluxo salivar, IPL e IG nos dia 0 de cada período. Os critérios de seleção adotados, associados aos resultados obtidos, permitiram a assertiva de que todos os grupos experimentais eram homogêneos no *DIA 0* dos cinco períodos experimentais. Pode-se observar que tanto a quantidade de CSV quanto o fluxo salivar mantiveram-se homogêneos durante a pesquisa. Além disso, teve-se cuidado também na padronização da aplicação local dos dentifrícios propostos, obtida através da zona de alívio criada na matriz individual que padronizou a quantidade de dentifrício na região (LÖE, 1967). O estudo duplo cego tem sido utilizado para a avaliação de diferentes produtos, com o objetivo de evitar a tendenciosidade tanto dos voluntários quanto do pesquisador, o que levou à codificação das amostras dos dentifrícios desta pesquisa. Além disso, a abstenção da escovação eliminou um possível efeito de ênfase da escovação pela motivação tendenciosa ou efeito "Hawthorne" (OWENS et al., 1997).

Seguindo-se a fase experimental, observou-se a vantagem do estudo cruzado ("cross over") no equilíbrio da ação de possíveis variações inter-individuais dos voluntários nos resultados, visto que todos usaram os cinco dentifrícios (A, B, C, D e E) no decorrer dos cinco períodos experimentais. Logo, as variações intra-individuais foram sendo distribuídas entre os períodos, além de diminuir os possíveis efeitos residuais ou "carry over".

No estudo da formação de CSV e sua relação com a halitose, foi instituído o uso do monitor portátil de sulfetos (Halímetro) nesta pesquisa pois este consiste num aparelho compacto, de custo relativamente baixo, que foi desenvolvido por **ROSENBERG et al.** (1991). Apesar de não apresentar a sensibilidade da cromatografia gasosa, ele se aproxima das medidas organolépticas, apresentando uma alta reprodutibilidade clínica (**BOSY**, 1997).

As enzimas tipo tripsina são proteases encontradas aderidas externamente à membrana celular de certos microorganismos (**GRENIER & McBRIDE**, 1987), como as *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* e *Treponema denticola*, sendo um importante fator de virulência destas bactérias na destruição dos tecidos periodontais (**LAUGHON et al.**, 1982; **NIEMINEN et al.**, 1993), a qual acontece em virtude da degradação de fibras colágenas periodontais causada por radicais oxigenados livres e por proteases ativas

(FIGUEIREDO & GUSTAFSSON, 1998). A atividade desta enzima pode ser encontrada na placa dental, na saliva e no fluido crevicular, sendo medida basicamente por substratos cromogênicos, como o benzoyl-D,L-arginine- β -naphthylamide (BANA) e o N-benzoyl-L-arginine-*p*-nitroanilide (BAPNA). A hidrólise destes substratos determina a atividade enzimática por uma reação colorimétrica. No entanto, sabe-se que o reagente BAPNA é quatro vezes mais rapidamente hidrolisado que o BANA (YOSHIMURA et al., 1984), sendo esta uma das razões da escolha do teste BAPNA nesta pesquisa, além da possibilidade de realizar-se a mensuração espectrofotométrica das reações.

Quanto aos resultados da presente pesquisa, todos os dentifrícios que continham triclosan nas suas formulações (C, D e E) reduziram, de certa forma, a atividade de enzimas tipo tripsina da placa dental acumulada, após os 21 dias de gengivite experimental. Porém, o dentifrício C (triclosan-copolímero-zinco-pirofosfato) foi o que mais reduziu a atividade enzimática demonstrada pelos valores obtidos com o teste BAPNA, seguido do dentifrício E (triclosan-copolímero) e dos dentifrícios A, B e D os quais não diferiram entre si. Um fato incongruente foi a participação do dentifrício placebo na redução da atividade enzimática, haja visto que na sua formulação não havia agentes antimicrobianos. O que poderia justificar tal situação seria possivelmente a presença de outros

ingredientes, como o lauril sulfato de sódio (ADDY et al., 1990) ou agentes flavorizantes (EMBERY & RÖLLA, 1992) que poderiam estar modificando o padrão de formação da placa dental na área teste.

A discussão sobre a efetividade do dentifrício C (triclosan-copolímero-zinco-pirofosfato) na redução da atividade de enzimas tipo tripsina fica limitada pela inobservância de outros estudos que avaliem tal situação. O trabalho clínico de SATHLER & FISCHER (1996) avaliou esta associação comparando-a com um placebo, porém devido às diferenças metodológicas pouco poderia inferir-se deste trabalho; já o trabalho de NOGUEIRA-FILHO et al. (1997) indicou a maior efetividade clínica dessa associação na redução dos índices de placa, gengival e de sangramento, quando comparada às associações triclosan-zinco e triclosan-copolímero. Extrapolando, então, para a situação dentifrício C testado nesta pesquisa, poderia ser suposto que o Gantrez®, quando associado ao zinco e ao triclosan, estaria teoricamente aumentando a efetividade deste dentifrício pelo aumento da retenção de triclosan na placa, o qual teria também a contribuição do sinergismo com o zinco. Isto poderia explicar a redução da atividade enzimática da placa dental.

Trabalhos clínicos, no entanto, têm demonstrado a efetividade da associação triclosan-zinco no controle da placa dental (ADDY et al., 1990;

LINDHE et al., 1993; SAXTON et al., 1993; SVATUN et al., 1993; TAHMASSEBI et al., 1994; BINNEY et al., 1995; WALER, 1997), apesar de alguns trabalhos questionarem a efetividade de tal associação (BRADSHAW et al., 1993; WALKER et al., 1994; SKAARE et al., 1997). Existem muitos trabalhos indicando que a associação triclosan-copolímero traria significativos benefícios à saúde gengival e ao controle da placa dental (GARCIA-GODOY et al., 1990; GAFFAR et al., 1990; DENEPTIVA et al., 1992; PALOMO et al., 1994; KANCHANAKAMOL et al., 1995; ROSLING et al., 1997a; ROSLING et al., 1997b; ELLWOOD et al., 1998), mostrando inclusive a superioridade desta associação quando comparada à ação de dentifrícios formulados com triclosan-zinco (GAFFAR et al., 1994; RENVERT & BIRKHED, 1995). Outros estudos porém, ainda divergiram quanto ao seu real benefício (JENKINS et al., 1989; ADDY et al., 1990; BINNEY et al., 1995; BINNEY et al., 1997).

Como os resultados desta pesquisa mostraram diferenças significativas entre os dentifrícios contendo triclosan-copolímero (E) e triclosan-zinco (D), tornou-se discutível a afirmação (CREETH et al., 1993) de que a associação triclosan-zinco liberaria mais triclosan na saliva e na placa do que a associação triclosan-copolímero, visto que a literatura descreve o papel do copolímero Gantrez® no aumento da retenção do triclosan (AFFLITTO et al., 1989;

GAFFAR et al., 1994) e que o zinco ofereceria apenas um sinergismo antimicrobiano à esta associação (**MARSH, 1991; CURY, 1997**). No entanto, não foram observados trabalhos que relacionassem a atividade enzimática da placa dental e dentifrícios contendo triclosan. No caso da associação entre triclosan-pirofosfato, a literatura tem indicado sua eficácia no que se refere à maior adsorção do triclosan às estruturas dentais, reduzindo a formação de placa dental (**JACKSON & McDONALD, 1994; FAIRBROTHER et al., 1997; BARTIZEK et al., 1999; CAO et al., 1999**).

Ainda sobre os resultados do teste BAPNA e na tentativa de justificar a efetividade do dentifrício E (triclosan-copolímero) vale ressaltar o aspecto da retenção do triclosan na mucosa bucal, nos dentes, na película adquirida, na saliva e na própria placa, que tem sido advogado pela literatura às propriedades físico-químicas independentes de adsorção lipofílica do triclosan (**GILBERT, 1987a; GILBERT et al., 1987b; CREETH et al., 1993**). Porém, tem sido notada a importância do copolímero do ácido maleico e do polivinilmetil éter, o Gantrez®, descrito como um coadjuvante no aumento da retenção e da biodisponibilidade do triclosan presente em dentifrícios às estruturas bucais (**ZAMBON et al., 1990; PALOMO et al., 1994; HAWLEY et al., 1995**).

Outra possível explicação para a efetividade do dentifrício E quanto à atividade enzimática, seria o efeito anti-inflamatório do triclosan presente nessa formulação, já destacado na literatura (LINDHE et al., 1993; SAXTON et al., 1993; MODÉER et al., 1996; MUSTAFA et al., 1999) demonstrando que este agente químico age não só como um antimicrobiano de amplo espectro, mas também diretamente no processo inflamatório. A ação anti-flogística do triclosan seria primordialmente advinda da sua ação na redução da formação de importantes mediadores da inflamação, interferindo no ciclo da cicloxagenase e da lipoxagenase e conseqüentemente na produção de prostaglandinas E_2 e de leucotrienos (GAFFAR et al., 1997), podendo inclusive alterar a produção de interferon- γ pelos fibroblastos (MUSTAFA et al., 1999). As alterações microbiológicas advindas da utilização por longos períodos de tempo das associações entre triclosan-copolímero-zinco-pirofosfato presentes em dentifrícios têm sido descritas na literatura como não preocupantes. Ao contrário, tem sido notada uma redução da microbiota oportunista e possivelmente periodontopatogênica (JENKINS et al., 1989; GAFFAR et al., 1990), tendo alguns trabalhos constatado o favorecimento do crescimento de uma microbiota bacteriana compatível com a saúde dos tecidos dentais e gengivais (HAWLEY et al., 1995; TEN CATE, 1996).

Quanto a redução da formação de CSV, na presente pesquisa, todos os dentifrícios que continham triclosan nas suas formulações (B, C, D e E) foram efetivos após os 21 dias de gengivite experimental, quando comparados ao dentifrício A (placebo), o qual apresentou o resultado mais desfavorável, seguido do dentifrício D. Os dentifrícios B, C e E foram os que mais reduziram os níveis de CSV, não havendo diferenças estatísticas entre estes produtos. A literatura mostra que muitos dentifrícios e colutórios são efetivos na redução dos CSV (van STEENBERGUE, 1997). Apesar da similaridade de efeitos entre as formulações B, C e E encontradas nesta pesquisa, alguns trabalhos indicam a utilização de dentifrícios contendo triclosan e sais de zinco (HUNTINGTON et al., 1995; BRUNETTE & NELSON, 1998), cuja justificativa se baseia no fato do zinco inibir a produção de CSV pela sua afinidade com os grupos sulfidrilos e tióis, o que levaria à inibição dos precursores da própria halitose. Porém, o estudo de WALER (1997) não indicou uma correlação clínica do zinco com a inibição dos CSV e da suposta afinidade por grupos sulfidrilos. Por outro lado, outros estudos têm indicado a utilização da associação triclosan-copolímero no combate à formação de CSV e da minimização dos quadros clínicos de halitose (NILES et al., 1994; NILES, 1994; SHARMA et al., 1999). Contudo, não observou-se avaliações comparativas na literatura, como o presente estudo,

entre dentifrícios contendo triclosan-zinco e triclosan-copolímero, dificultando a discussão sobre os resultados alcançados.

De qualquer sorte, sabe-se que a halitose tem sido correlacionada com a concentração de CSV produzidos na cavidade bucal através da atividade metabólica de periodontopatógenos em 87% dos casos (van STEENBERGUE, 1997), o que foi confirmado nos estudos sobre a gengivite experimental (KOSTELC et al., 1984; KO et al., 1996). Indivíduos acometidos de doença periodontal freqüentemente sofrem de halitose (TONZETICH, 1996), e uma correlação positiva tem sido encontrada entre a severidade da periodontite e os níveis de CSV (YAEGAKI & SANADA, 1992; SALVADOR et al., 1999). Neste presente trabalho, foi observada a correlação positiva entre o teste BAPNA e a formação de CSV, demonstrada no tratamento E (tabela 4, no capítulo dos resultados), existindo uma forte correlação entre a presença da atividade da enzima tipo tripsina e a formação de CSV ($r=0,56$, $p<0,01$), o que viria a constatar a relação direta entre a possível presença de periodontopatógenos e a formação de compostos sulfurados. Outros trabalhos, como o de KOZLOVSKY et al. (1994) também já havia indicado a correlação positiva ($r=0,50$, $p<0,001$) entre o teste BANA e a formação de CSV; e por SALVADOR et al. (1999), confirmou-se uma forte correlação ($r=0,55$, $p<0,01$) entre a presença de

periodontopatógenos pelo teste BANA e a halitose.

Contudo, apesar de muitos fabricantes de produtos denominados de "anti-halitose" afirmarem que estes contém os elementos antimicrobianos necessários para promover a sua cura, oferecendo ainda uma proteção adicional por longos períodos de tempo estarem disponíveis no mercado, sabe-se que nenhum deles elimina problema, funcionando muitas vezes como paliativos que induzem os pacientes doentes a falsas sensações de cura (BOSY, 1997). Estudos mais recentes têm mostrado novos produtos com forte potencial anti-halitose, como os extratos dos chá verde e preto tailandeses, os quais iniciam um novo capítulo em busca da cura da halitose.

No que se referem ao triclosan, motivo deste atual trabalho, as pesquisas tendem à procura de novos sistemas de liberação e retenção do triclosan na cavidade bucal, como o trabalho de RÖLLA et al. (1993), onde se ponderou a adição do silicone em dentifrícios, ou de novas formas químicas de utilização do próprio triclosan (GREENMAN & NELSON, 1996), buscando o aumento de sua biodisponibilidade e ação prolongada no controle da placa dental bacteriana, da gengivite marginal e da halitose. Os estudos mais recentes discutem a possibilidade dos dentifrícios contendo triclosan poderem ser coadjuvantes na manutenção da saúde periodontal durante a terapia de suporte, mesmo em

pacientes susceptíveis à recorrência da doença periodontal (ROSLING et al., 1997a; ROSLING et al., 1997b; ELLWOOD et al., 1998).

Finalmente, este estudo experimental representa a mais um passo no controle químico da placa dental bacteriana supragengival, da gengivite marginal e seus reflexos na formação de compostos sulfurados voláteis, na atividade de proteases bacterianas, através da utilização de dentifrícios contendo triclosan e associações. No entanto, mais estudos são necessários para se estabelecer a efetividade preventiva e terapêutica deste sistema de controle químico de placa dental, via dentifrícios, sobre a halitose e a destruição dos tecidos periodontais.

Na realidade, os estudos epidemiológicos mais recentes indicam que as pessoas estão mantendo seus dentes por mais tempo que antigamente. Agentes químicos e outros dispositivos têm emergido, culturalmente ou por pesquisas, no intuito de habilitar os indivíduos a manter sua saúde bucal, a despeito das inúmeras influências ambientais do mundo moderno. A profissão odontológica, no geral, tem o desafio de desenvolver e aperfeiçoar a miríade de dispositivos e agentes para combater e superar estes novos fatores "patogênicos". A motivação do paciente e a odontologia preventivista, no entanto, constituem os maiores desafios. As pessoas certamente continuam comendo, falando e vestindo-se bem, dentro de suas próprias condições, porém estas mesmas

pessoas têm placa dental, gengivite, periodontite e mau hálito, o que vem a demonstrar a eterna busca pela homeostasia do corpo e por conseguinte da mente.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

A comparação do efeito das associações entre triclosan-copolímero-zinco-pirofosfato presentes em dentifrícios múltipla ação, através do modelo da gengivite experimental em regiões parciais da boca, permite afirmar que:

1-) A associação **triclosan-copolímero-zinco-pirofosfato** (dentifrício C), apresentou a maior redução da atividade tripsina da placa dental, seguida da associação **triclosan-copolímero** (E), podendo ser úteis no controle da gengivite marginal;

2-) As associações **triclosan-copolímero-zinco-pirofosfato** (C), **triclosan-copolímero** (E) e **triclosan-pirofosfato** (B) reduziram similarmente os níveis de compostos sulfurados voláteis no hálito dos voluntários que os utilizaram, podendo ser indicadas como coadjuvantes no tratamento da halitose de origem periodontal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. ADDY, M.; JENKINS, S.; NEWCOMBE, R. The effect of Triclosan, stannous fluoride and chlorhexidine products on: (I) Plaque regrowth over a 4-day period. *J. clin. Periodont., Copenhagen*, 17(10): 693-7, Nov. 1990.
2. _____; RICHARDS, J.; WILLIAMS, G. Effect of a zinc citrate mouthwash on dental plaque and salivary bacteria. *J. clin. Periodont., Copenhagen*, 7(4): 309-15, Aug. 1980.
3. AFFLITTO, J.; FAKHRY-SMITH, S.; GAFFAR, A. Salivary and plaque triclosan levels after brushing with a 0.3% triclosan/copolymer/NaF dentifrice. *Am. J. Dent., San Antonio*, 2 (Spec.): 207-10, Sept. 1989.

* De acordo com a NB-66, de 1978, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). Abreviatura dos periódicos de conformidade com o "World List of Scientific Periodicals".

4. AINAMO, J. & BAY, I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int. dent. J.*, Guilford, 25(4): 229-35, Dec. 1975.
5. BARKVOLL, P. & RÖLLA, G. Triclosan protects the skin against dermatitis caused by sodium lauryl sulphate exposure. *J. clin. Periodont.*, Copenhagen, 21(10): 717-719, Nov. 1994.
6. _____ et al. Triclosan reduces the clinical symptoms of the allergic patch test reaction elicited with 1% nickel sulfate in sensitive patients. *J. clin. Periodont.*, Copenhagen, 22(6): 485-7, June 1995.
7. BARTIZEK, R.D. et al. Anti-gingivitis efficacy of a triclosan dentifrice versus placebo. *J. Dent. Res.*, Washington, 78: 135, 1999. [Abstract, 240].
8. BEISWANGER, B.B. et al. The relative anti-calculus effect of a Triclosan-pyrophosphate dentifrice. *J. dent. Res.*, Washington, 70: 327, 1991.
9. BEN-ARYEH, R. et al. Halitosis: an interdisciplinary approach. *Am J Otolaryngol*, Philadelphia, 19(1): 8-11, 1998.

10. BINNEY, A. et al. A comparison of triclosan and stannous fluoride toothpastes for inhibition of plaque regrowth. *J. clin. Periodont.*, Copenhagen, 24: 166-70, 1997.
11. _____. et al. The effect of a commercially available triclosan-containing toothpaste compared to a sodium-fluoride-containing toothpaste and a chlorhexidine rinse on 4-day plaque regrowth. *J. clin. Periodont.*, Copenhagen, 22(11): 830-4, Nov. 1995.
12. BLACK, J.G.; HOWES, D.; RUTHERFORD, T. Percutaneous absorption and metabolism of Irgasan DP 300. *Toxicology*, Limerick, 3(1): 33-47. Jan. 1975.
13. BOSY, A. Oral malodor: philosophical and practical aspects. *J. Can. dent. Ass.*, Ottawa, 63(3): 196-201, Mar. 1997.
14. _____. et al. Relationship of oral malodor to Periodontitis: evidence of independence in discrete subpopulations. *J. Periodont.*, Chicago, 65(1): 37-46, 1994.
15. BRADSHAW, D.J. et al. The effects of triclosan and zinc citrate, alone and in combination, on a community of oral bacteria grown in vitro. *J. dent. Res.*, Washington, 72(1): 25-30, Jan. 1993.

16. BRUNETTE, D.M. & NELSON, B. Effects of toothpastes containing baking soda and zinc on oral malodor. *J. dent. Res.*, Washington, 77: 144, 1998. [Abstract, 310].
17. CAO, C.F. et al. Reduction of gingivitis in a Chinese population. *J. dent. Res.*, Washington, 78: 135, 1999. [Abstract, 239].
18. CIANCIO, S. et al. Chemical agents. *Periodontology 2000*, 8: 75-86. 1995.
19. CREETH, J.E. et al. Effect of zinc citrate-triclosan dentifrices on plaque regrowth. *J. dent. Res.*, Washington, 78: 356, 1999. [Abstract, 2001].
20. _____ et al. Oral delivery and clearance of antiplaque agents from triclosan-containing dentifrices. *Int. dent. J.*, Bristol, 43: 387-97. Aug. 1993. [Supplement, 1]
21. CURTIS, J.P. et al. Effect of oral products on mouth odor. *J. dent. Res.*, Washington, 77: 175, 1998. [Abstract, 557].

22. CURY, J.A. Controle Químico da Placa Dental. In: *PROMOÇÃO de Saúde Bucal da ABOPREV*. São Paulo, Artes Médicas, 1997. p.131-40.
23. DELANGUE, G. et al. Experiences of a Belgian multidisciplinary breath odor clinic. *Acta Otorhinolaryngol Belg*, 51(1): 43-8, 1997.
24. DENEPIITIYA, J.L. et al. Effect upon plaque formation and gingivitis of a triclosan/copolymer/fluoride dentifrice: a 6-month clinical study. *Am. J. Dent.*, San Antonio, 5(6): 307-11. Dec. 1992.
25. ELLWOOD, R.P. et al. Effect of a triclosan/copolymer dentifrice on the incidence of periodontal attachment loss in adolescents. *J. clin. Periodont.*, Copenhagen, 25(5): 363-7, 1998.
26. EMBERY, G. & RÖLLA, G. The significance of toothpaste in oral hygiene. In: *CLINICAL and biological aspects of dentifrices*. New York, Oxford Univ. Press, 1992. p.9-12.
27. FAIRBROTHER, K.J. et al. The comparative clinical efficacy of pyrophosphate/ triclosan, copolymer/triclosan and zinc citrate dentifrices for the reduction of supragingival calculus. *J. clin. Dent.*, Copenhagen, 8(2): 62-6, 1997.

28. FIGUEIREDO, C.M.S. & GUSTAFSSON, A. Protease activity in gingival crevicular fluid. *J. clin. Periodont.*, Copenhagen, 25: 306-10, 1998.
29. FISCHMANN, S.L. The history of oral hygiene products: how far have we come in 6000 years. *Periodontology 2000*, 15:7-14, 1997.
30. _____ *et al.* The inhibition of plaque in humans by two experimental oral rinses. *J. Periodont.*, Chicago, 44(2): 100-2, Feb. 1975.
31. FURIA, J.E. & SCHENKEL, A.G. Broad spectrum bacteriostat. *Chem Spec*, New York, 44: 47-122, 1968. *Apud*: SAXTON, C.A. The effects of a dentifrice containing zinc citrate and 2,4,4'-trichloro-2'-hidroxydiphenyl ether. *J. periodont.*, Chicago, 57(9): 555-61. 1986.
32. GAFFAR, A. *et al.* Anti plaque effects of dentifrices containing triclosan / copolymer/NaF system versus triclosan dentifrices without the copolymer. *Am. J. Dent.*, San Antonio, 3: S7-S14, 1990. [Special issue].

33. GAFFAR, A. *et al.* Chemical agents for the control of plaque and plaque microflora: an overview. *Eur. J. Oral Sci.*, Copenhagen, 105(5): 502-7, 1997.
34. _____. *et al.* The effect of triclosan on mediators of gingival inflammation. *J. clin. Periodont.*, Copenhagen, 22(6): 480-4, June 1995.
35. _____. *et al.* Recent advances in plaque, gingivitis, tartar and caries prevention technology. *Int. dent. J.*, Bristol, 44: 63-70. Feb, 1994. [Special issue].
36. GARCIA-GODOY, F. *et al.* Effect of a triclosan / copolymer / fluoride dentifrice on plaque formation and gingivitis: A 7-month clinical study. *Am. J. Dent.*, San Antonio, 3: S15-S26, Sept. 1990. [Special issue].
37. GENCO, R.J. Current view of risk factors for periodontal diseases. *J. Periodont.*, Chicago, 67(10): 1041-9. 1996.
38. GILBERT, R.J. The oral clearance of zinc and triclosan after delivery from a dentifrice. *J. Pharm. Pharmac.*, London, 39: 480-3, Nov. 1987.

39. GILBERT, R.J.; FRASER, S.B.; VAN DER OUDER, A.A. Oral disposition of triclosan (2,4,4'- trichloroo-2'-hydroxydiphenil ether) delivered from a dentifrice. *Caries Res.*, Basel, 21(1): 29-36. 1987.
40. GREENMAN, J.; NELSON, D.G.A. Hydrolysis of Triclosan Monophosphate by Dental Plaque and Selected Species of Oral Micro-organisms. *J. dent. Res.*, Washington, 75(8): 1578-84. Aug. 1996.
41. GREENSTEIN, R.B.N. et al. Reduction of oral malodor by oxidizing Lozenges. *J. Periodont.*, Chicago, 68(12): 1176, 1997.
42. GRENIER, D.; MC BRIDE, B.C. Isolation of a membrane-associated *Bacteroides gingivalis* glycyprolyl protease. *Infect. Immun.*, Bethesda, 55(12): 3131-6, Dec. 1987.
43. GRIGOR, J. & ROBERTS, A.J. Reduction in the levels of oral malodor precursors by hydrogen peroxide: in vitro and in vivo assessments. *J. clin. Dent.*, 3(4): 111-5, 1992.
44. HAFFAJEE, A.D. et al. Clinical, microbiological and immunological features of subjects with destructive periodontal diseases. *J. clin. Periodont.*, Copenhagen, 15(4): 240-6, Apr. 1988.

45. HARRAP, G.J.; BEST, J.S.; SAXTON, C.A. Human oral retention of zinc from mouthwashes containing zinc salts and its relevance to dental plaque control. *Archs oral Biol.*, Oxford, 29(2): 87-91. 1984.
46. _____; SAXTON, C.A.; BEST, J.S. Inhibition of plaque growth by zinc salts. *J. Periodont.*, Chicago, 18(6): 634-42, Nov. 1984.
47. HAWLEY, G.M. et al. A 30-month study investigating the effect of adding triclosan/copolymer to a fluoride dentifrice. *Caries Res.*, Basel, 29(3): 163-7. 1995.
48. HOWE, J.W. *The breath and the diseases which give it a fetid odor*. 4. ed., New York, D. Appleton and Co., 1898.
49. HUGOSON, A. & RYLANDER, H. Longitudinal study of periodontal status in individuals aged 15 years in 1973 and 20 years in 1978 in jonkoping, Sweden. *Community Dent. oral Epidemiol.*, Copenhagen, 10(1):37-42, Feb. 1982.
50. HULL, P.S. Chemical inhibition of plaque. *J. clin. Periodont.*, Copenhagen, 7(6): 431-42, Dec. 1980.

51. HUNTINGTON, E. et al. Oral malodor reduction by dentifrice containing Zinc citrate and Triclosan. *J. dent. Res.*, Washington, 74: 511. 1995. [Abstract, 287].
52. JACKSON, R. J. & MC DONALD, F.E. The effect of pyrophosphate on triclosan activity. *J. dent. Res.*, Washington, 73(4):, 1994.
53. JENKINS, S.; ADDY, M.; NEWCOMBE, R. Studies on the effect of toothpaste rinses on plaque regrowth. (II). Triclosan with and without zinc citrate formulations. *J. clin. Periodont.*, Copenhagen, 16(6): 385-7, July 1989.
54. _____.: _____.: _____. Toothpastes containing 0.3% and 0.5% triclosan.(I). Effects on 4-day plaque regrowth. *Am. J. Dent.*, San Antonio, 2 (Spec.): 211-4, Sept. 1989.
55. JONES, C.L.; SAXTON, C.A.; RITCHIE, J.A. Microbiological and clinical effects of a dentifrice containing zinc citrate and Triclosan in the human experimental gingivitis model. *J. clin. Periodont.*, Copenhagen, 17(8): 570-4, Sept. 1990.

56. KANCHANAKAMOL, U. et al. Reduction of plaque formation and gingivitis by a dentifrice containing triclosan and copolymer. *J. Periodont.*, Chicago, 66(2): 109-12, Feb. 1995.
57. KJAERHEIM, V. et al. Effects of triclosan on the rat phrenic nerve-diaphragm preparation. *J. clin. Periodont.*, Copenhagen, 22(6): 488-93, June 1995.
58. _____. et al. Organic solvent oils as vehicles for triclosan in mouthrinses: a clinical study. *Scand. J. dent. Res.*, 102(5): 306-8, Oct. 1994.
59. _____. et al. Triclosan inhibits histamine-induced inflammation in human skin. *J. clin. Periodont.*, Copenhagen, 22(6): 423-6, June 1995.
60. KO, Y.K. et al. Methyl mercaptan concentration during experimental gingivitis in man. *J. dent. Res.*, Washington, 75: 1423, 1996. [Abstract].

61. KORNMAN, K.S. Antimicrobial agents. In: *STATUS of the science of dental plaque control measures and oral hygiene practices*. Bethesda, National Institute of Dental Research Workshop, 1985. p.150-194.
62. KOSTELC, J.G. et al. Oral odors in early experimental gingivitis. *J. periodont. Res.*, Copenhagen, 19: 303-12, 1984.
63. KOZLOVSKY, A. et al. Correlation between the BANA test and oral malodor parameters. *J. dent. Res.*, Washington, 73(5): 1036-42, 1994.
64. LAMSTER, I.B. et al. Lactate dehydrogenase, β -glucuronidase and arylsulfatase activity in gingival crevicular fluid associated with experimental gingivitis in man. *J. Periodont.*, Chicago, 56(3): 139-47, Mar. 1985.
65. LAUGHON, B.E. et al. API-ZYM system for identification of *Bacteroides sp.*, *Capnocytophaga sp.* and spirochetes of oral origin. *J. clin. Microbiol.*, Washington, 15: 97, 1982.

66. LINDHE, J. Triclosan/Copolymer/Fluoride dentifrices: A new technology for the prevention of plaque, calculus, gingivitis and caries. *Am. J. Dent.*, San Antonio, 3: 53-54, Sept. 1990. [Special Issue].
67. _____. & KOCH, G. The effect of supervised oral hygiene on the gingivae of children. *J. periodont. Res.*, Copenhagen, 2(3): 215-20, 1967.
68. _____.; HAMP, S.E.; LÖE, H. Plaque induced periodontal disease in beagle dogs. *J. periodont. Res.*, Copenhagen, 10(5): 243-55, Nov. 1975.
69. _____. et al. The effect of a triclosan-containing dentifrice on established plaque and gingivitis. *J. clin. Periodont.*, Copenhagen, 20(5): 327-34, May 1993.
70. LÖE, H. The Gingival Index, the Plaque Index and the Retention Index systems. *J. Periodont.*, Chicago, 38(6): 610-6, Nov./Dec. 1967.
71. _____.; THEILADE, E.; JENSEN, S.E. Experimental gingivitis in man. *J. Periodont.*, Chicago, 36 :177-87, 1965.

72. LOESCHE, W.J. Chemotherapy of dental plaque infections. *Oral. Sci. Rev.*, Kobenhavn, 9: 65-107. 1976.
73. _____. DNA probe and Enzyme analysis in Periodontal diagnostics. *J. Periodont.*, Chicago, 63: 1102-9, 1992.
74. _____. et al. Trypsin-Like activity in subgingival plaque: a diagnosis marker for spirochetes and periodontal disease. *J. Periodont.*, Chicago, 58: 266-73, Apr. 1987.
75. MARSH, P.D. Dentifrices containing new agents for the control of plaque and gingivitis: microbiological aspects. *J. clin. Periodont.*, Copenhagen, 18(6): 462-7. July 1991.
76. _____. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv. dent. Res.*, Washington, 8: 263-71, 1994.
77. MASSLER, M. et al. Gingivitis in young adult males. *J. Periodont.*, Chicago, 28: 111-24. 1957.
78. MMEINCKE, B.E.; KRANZ, R.G.; LINCH, D.L. Effect of Irgasan on bacterial growth and adsorption into cell wall. *Microbios.*, Cambridge, 28(113/114): 133-47, 1980.

79. MODÉER, T.; BEGTSSON, A.; RÖLLA, F. Triclosan reduces prostaglandin biosynthesis in human gingival fibroblasts challenged with interleukin-1 in vitro. *J. clin. Periodont.*, Copenhagen, 23(10): 927-33, 1996.
80. MUSTAFA, M. et al. Effect of triclosan on interferon- γ -production and MHC class II expression in human gingival fibroblasts. *J. dent. Res.*, Washington, 78: 428, 1999. [Abstract, 2587].
81. NIEMINEN, A. et al. The effect of treatment on the activity of salivary proteases and glycosidases in adult with advanced periodontitis. *J. Periodont.*, Chicago, 64: 297-301, Apr. 1993.
82. NILES, N.P. Long lasting breath protection with a Triclosan/Copolymer/NaF dentifrice. *J. dent. Res.*, Washington, 74: 209, 1994. [Abstract, 1579].
83. _____ et al. Breath freshening effects of Triclosan/Copolymer/NaF dentifrice. *J. dent. Res.*, Washington, 73: 165, 1994. [Abstract, 510].

84. NOGUEIRA-FILHO, G.R.; CURY, J.A.; TOLEDO, S. Effect of three dentifrices containing Triclosan and associations: An experimental gingivitis study. *J. clin. Periodont.* [submitted in 1998].
85. _____; TOLEDO, S.; CURY, J.A. Avaliação clínica do efeito de um dentifrício contendo Triclosan-Gantrez-Zinco-Pirofosfato na gengivite experimental em humanos. *Periodontia*, Fortaleza, 6(2): 20-3, 1997.
86. OWENS, J. et al. An 18-week home-use study comparing the oral hygiene and gingival health benefits of triclosan and fluoride toothpastes. *J. clin. Periodont.*, Copenhagen, 24(9): 626-31, Sept. 1997.
87. THE ORAL CARE REPORT. *Colgate news*. 1996. p.3-6.
88. PALOMO, F. et al. The effect of three commercially available dentifrices containing triclosan on supragingival plaque formation and gingivitis: a six month clinical study. *Int. dent. J.*, Bristol, 44(1 Suppl. 1):75-81. Feb. 1994.

89. PRETI, G et al. Non-oral and oral aspects of oral malodor. In: ROSEMBERG, M. *Bad Breath: Research Perspectives*. Tel Aviv, Romot Publishing, 1995. p.149-73.
90. PUTT, M.S. et al. Validation of a 21-day, partial-mouth gingivitis model for evaluating chemotherapeutic dentifrices. *J. periodont. Res.*, Copenhagen, 28(4): 301-7, July 1993.
91. QUIRYNEN, M. et al. The effect of a 1-stage full-mouth disinfection on oral malodor and microbial colonization of the tongue in periodontitis patients. A pilot study. *J. Periodont.*, Chicago, 69(3): 374-82, 1998.
92. REGOS, J. & HITZ, H.R. Investigation of mode of action of triclosan, a broad spectrum antimicrobial agent. *Apud* SCREIE, A.A. Modes of action of currently known chemical antiplaque agents other than chlorhexidine. *J. dent. Res.*, Washington, 68: 1609-16, 1989.
93. RENVERT, S. & BIRKHED, D. Comparison between 3 triclosan dentifrices on plaque, gingivitis and salivary microflora. *J. clin. Periodont.*, Copenhagen, 22(1): 63-70, Jan. 1995.

94. RICHTER, J. Diagnosis and treatment of halitosis. *Compendium, Lawrenceville*, 17(4): 370-86, Apr. 1996.
95. RÖLLA, G.; GAARE, D.; ELLINGSEN, J.E. Experiments with a toothpaste containing polydimethylsiloxan/triclosan. *Scand. J. dent. Res., Copenhagen*, 101(3): 130-2, June 1993.
96. ROSENBERG, M. et al. Halitosis measurement by an industrial sulfide monitor. *J. Periodont., Chicago*, 62: 487-9, 1991.
97. _____. et al. Measurement of oral malodor: current methods and future prospects. *J. Periodont., Chicago*, 63(1): 776-82, 1992.
98. _____. et al. Reproducibility and sensitivity of oral malodor measurements with a portable sulfide monitor. *J. dent. Res., Washington*, 70: 1436-40, 1991.
99. ROSLING, B. et al. Effect of triclosan on the subgingival microbiota of periodontitis-susceptible subjects. *J. clin. Periodontol*, 24(12): 881-7, 1997.

100. _____. et al. The use of triclosan/copolymer dentifrice may retard the progression of periodontitis. *J. clin. Periodont.*, Chicago, 24(12): 873-80, 1997.
101. SALLUM, A.W. et al. Perfil bio-emocional do paciente periodontal. In: *ATUALIZAÇÃO em periodontia da SOBRAPE. São Paulo, Artes Médicas, 1999.*
102. SALVADOR, S.L. et al. Correlation between halitosis and periodontal pathogens detected by BANA test. *J. dent. Res.*, Washington, 78: 426, 1999. [Abstract, 2568].
103. SATHLER, L.W.L. & FISCHER, R.G. O efeito antiplaca do Triclosan contido em dentifrícios. *Periodontia*, Fortaleza, 5(3): 267-72, jan./jun., 1996.
104. SAXTON, C.A. & VAN DER OUDERAA, F.J.G. The effect of a dentifrice containing zinc citrate and triclosan on developing gingivitis. *J. periodont. Res.*, Copenhagen, 24(1): 75-80, Jan. 1989.
105. _____.: HUNTINGTON, E.; CUMMINS, D. The effect of dentifrices containing Triclosan on the development of gingivitis in a 21-day experimental gingivitis study. *Int. dent. J.*, Bristol, 43(4 Suppl. 1): 423-9. Aug. 1993.

106. SAXTON, C.A.; HARRAP, G.J.; LLOYD, A.M. The effect of dentifrices containing zinc citrate on plaque growth and oral zinc levels. *J. clin. Periodont.*, Copenhagen, 13(4): 301-6, Apr. 1986.
107. _____; LANE, R.M.; VAN DER OUDERAA, F. The effects of a dentifrice containing a zinc salt and a non-cationic antimicrobial agent on plaque and gingivitis. *J. clin. Periodont.*, Copenhagen, 14(3): 144-8, Mar. 1987.
108. _____; SVATUN, B.; LLOYD, A.M. Antiplate effects and mode of action of a combination of zinc citrate and a nonionic antimicrobial agent. *Scand. J. dent. Res.*, Copenhagen, 96(3): 212-7, June 1988.
109. SCHIFF, T. et al. Effect of two fluoride dentifrices containing triclosan and a copolymer on calculus formation. *Am. J. Dent.*, San Antonio, 3(spec. issue): S43-S45, Sept. 1990.
110. SCHIMID, M.L.; SCHAIT, A.; MÜHLEMANN, N.R. Effect of a zinc chloride mouthrinse on calculus deposits formed on foils. *Helv. Odont. Acta*, Zurich, 11: 22, 1974.

111. SCHMIDT, N.F. & TARBET, W.J. The effect of oral rinses on organoleptic mouth odour ratings and levels of volatile sulfur compounds. *Oral Surg*, Saint Louis, 45: 560-7, 1978.
112. SHARMA, N.C. et al. Comparative anti-plaque/anti-gingivitis efficacy: Listerine Antiseptic Mouthrinse and Colgate Total dentifrice. *J. dent. Res.*, Washington, 78: 498, 1999. [Abstract, 3138].
113. SHENKEIN, H.A. & GENCO, R.J. Gingival fluid and serum in periodontal disease. I. Quantitative study of immunoglobulins, complement components, and other plasma proteins. *J. Periodontol.*, Chicago, 48: 772, 1977.
114. SILNESS, J.; LÖE, H. Periodontal disease in pregnancy II. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta odont. Scand.*, Oslo, 22: 121-35, 1964.
115. SKAARE, A.B. et al. Does the nature of the solvent affect the anti-inflammatory capacity of triclosan? An experimental study. *J. clin. Periodont.*, Copenhagen, 24(2): 124-8, 1997.

116. SLOTS, J. Enzymatic characterization of some oral and nonoral gram negative bacteria with the API-zym system. *J. clin. Microbiol.*, Bethesda, 14: 288, 1981.
117. SPOUGE, J.D. Halitosis: a review of its cause and treatment. *Dent. Practnr dent. Rec.*, Bristol, 14: 309-19, 1964.
118. STEPHEN, K.W. et al. Control of gingivitis and calculus by a dentifrice containing a zinc salt and triclosan. *J. Periodont.*, Chicago, 61(11): 674-9. Nov. 1990.
119. SVATUN, B.; SAXTON, C.A.; RÖLLA, G. Six month study of the effect of a dentifrice containing zinc citrate and triclosan on plaque, gingival health and calculus. *Scand. J. dent. Res.*, Copenhagen, 98(4): 301-4, May 1990.
120. _____. et al. The effects of a silica dentifrice containing Triclosan and zinc citrate on supragingival plaque and calculus formation and the control of gingivitis. *Int. dent. J.*, Bristol, 43(4 Suppl. 1): 431-9, Aug. 1993.

121. SVATUN, B. et al. The effects of three silica dentifrices containing Triclosan on supragingival plaque and calculus formation and gingivitis. *Int. dent. J.*, Bristol, 43(4 Suppl. 1): 441-52, Aug. 1993.
122. _____. et al. The influence of a dentifrice containing a zinc salt and a nonionic antimicrobial agent on the maintenance of gingival health. *J. clin. Periodont.*, Copenhagen, 14(8): 457-61, Sept. 1987.
123. _____. et al. One-year study of the efficacy of a dentifrice containing zinc citrate and triclosan to maintain gingival health. *Scand. J. dent. Res.*, Copenhagen, 97(3): 242-6. June 1989.
124. TAHMASSEBI, J.; DUGGAL, M.S.; CURZON, M.E.J. Effect of a calcium carbonate-based toothpaste with 0.3% triclosan on pH changes in dental plaque in vivo. *Caries Res.*, Basel, 28(4): 272-6. 1994.
125. TEN CATE, J.M. The caries preventive effect of a fluoride dentifrice containing triclosan and zinc citrate, a compilation of in vitro and in situ studies. *Int. dent. J.*, Guilford, 43(4 Suppl. 1): 407-13. Aug. 1993.

126. TONZETICH, J. Effect of volatile sulfur compounds on periodontal tissues and cellular metabolism: an overview. In: VAN STEENBERGUE, D. *Bad Breath: a multidisciplinary approach*. Leuven University Press, 1996. p.85-98.
127. _____. Oral malodor: an indicator of health status and oral cleanliness. *Int. dent. J*, Bristol, 28: 308-19, 1978.
128. _____. Production and origin of oral malodor: a review of mechanisms and methods of analysis. *J. Periodont.*, Chicago, 48: 13-20, 1977.
129. TURNER, G.A.; SAXTON, C.A.; SVATUN, B. Concentration of antimicrobial proteins in human saliva. The effect of six months use of an antiplaque dentifrice on levels of antimicrobial proteins in unstimulated saliva from 102 adults. *J. Biol. buccale*, Paris, 19(4): 267-70. Dec. 1991.
130. URQUHART, E. & ADDY, M. The chemical control of plaque. *Dent. Health*, London, 30(4): 8, 10, 12-3, Aug.-Sept. 1991.

131. VAN STEENBERGUE, D. V. Breath malodor. *Current Opin. Periodontol*, Philadelphia, 4: 137-43, 1997.
132. WADE, W.G. & ADDY, M. Antibacterial activity of some triclosan-containing toothpastes and their ingredients. *J. Periodont.*, Chicago, 63: 280-2, Apr. 1992.
133. WALER, S.M. The effect of some metal ions on volatile sulfur-containing compounds originating from oral cavity. *Acta Odontol. Scand.*, Oslo, 55(4): 261-4, Aug. 1997.
134. WALKER, C. et al. The effects of a 0.3% triclosan-containing dentifrice on the microbial composition of supragingival plaque. *J. clin. Periodont.*, Copenhagen, 21(5): 334-41, May 1994.
135. WIKSTRÖM, M. Detection of *Porphyromonas gingivalis* in gingival exsudate by dipeptide-enhanced trypsin-like activity. *J Periodont.*, Chicago, 65: 47-55. 1994.
136. WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Health for All. Series 3*, 1981.

137. YAEKAKI, K. & SANADA, K. Volatile sulfur compounds in mouth air from clinically healthy subjects and patients with periodontal disease. *J periodont. Res.*, Copenhagen, 27: 233-8, 1992.
138. YOSHIMURA, F. et al. Characterization of a trypsin-like protease from bacterium *Bacteroides gingivalis* isolated from human dental plaque. *Archs oral Biol*, Oxford, 29(7): 559-64, 1984.
139. ZAMBON, J.J. et al. Effect of a triclosan/copolymer/ fluoride dentifrice on the oral microflora. *Am. J. Dent.*, San Antonio, 3 (spec. issue): S27-S34, Sept. 1990.
140. ZUCKERBRAUN, H.L. et al. Triclosan: cytotoxicity, mode of action, and induction of apoptosis in human gingival cells in vitro. *Eur. J. oral Sci.*, Copenhagen, 106(2): 628-36, 1998.

ANEXOS

ANEXO A1. Modelo de Ficha Anamnésica usada na seleção da amostra de voluntários.

PERIODONTIA

ANAMNESE INDIVIDUAL

NOME: _____

ENDEREÇO: _____

TELEFONE: (____) _____

DATA NASCIMENTO: ____/____/____ IDADE: _____

ESTADO CIVIL: _____

PERÍODO LETIVO: _____ IDENTIFICAÇÃO: _____

1- Você é portador de alguma alteração sistêmica? *sim*() *não*()

Qual (is) ? _____

2- Está em tratamento médico? *sim*() *não*()

3- Faz uso de algum medicamento? *sim*() *não*()

Qual (is) ? _____

4- É alérgico à algum medicamento? *sim*() *não*()

Qual (is) ? _____

5- É fumante? *sim*() *não*()

6- Está grávida? *sim*() *não*()

7- Você usa aparelho ortodôntico? *sim*() *não*() *fixo*() *móvel*()

8- Qual dentifrício você está usando? _____

9- Faz uso de bochechos? *sim*() *não*()

Qual (is) substância(s) ? _____

10- Quantas vezes escova seus dentes por dia? *1x*() *2x*() *3x*() *+3x*()

11- Faz uso de fio/fita dental? *sim*() *não*() *Frequência: 1x*() *2x*() *3x*() *+3x*()

ANEXO A2. Modelo do termo de consentimento ético para pesquisa em humanos.

TERMO DE CONSENTIMENTO PARA TRATAMENTO E PESQUISA

Por esse instrumento particular declaro, para efeitos éticos e legais, que eu
(nome) _____,
(nacionalidade) _____, (profissão) _____, portador(a)
do R.G. _____ C.I.C. _____, residente e domiciliado(a) à
Rua _____, na cidade de _____, Estado
_____, concordo com absoluta consciência dos procedimentos a que vou me
submeter para a realização da fase experimental da tese de Doutorado do curso de
Clínica Odontológica - área de Periodontia, nos termos abaixo relacionados:

1) Esclareço que recebi todas as informações sobre minha participação nesse
experimento, possuindo plena liberdade para me abster em participar da referida
pesquisa a qualquer momento;

2) Esclareço também, que fui amplamente informado por um profissional que não
está envolvido na presente pesquisa, sobre os possíveis benefícios e riscos aos quais
estou me submetendo durante este experimento, tomando conhecimento de que o meu
consentimento não exime a responsabilidade do profissional que está executando esta
pesquisa;

3) Todas essas normas estão de acordo com o Código de ética Profissional
Odontológico, segundo a resolução C.F.O. 179/93, e com a declaração de Helsinque II.

Por estar de pleno acordo com o teor do presente termo, assino abaixo o mesmo.

Piracicaba, ____ de _____ de 1998.

Assinatura do Paciente

Pesquisador

Assinatura do

Assinatura do profissional que
efetuou o esclarecimento ao paciente

ANEXO A3. Modelo de Ficha Clínica Periodontal usada para o levantamento de dados.

PERIODONTIA

IDENT.: _____

PERÍODO: _____

DATA: _____

DENTIFRÍCIO: _____

DIA: _____

FICHA CLÍNICA - ÁREA TESTE

DENTE

BOLSA D V M
L

RETR.
MOBILIDADE

47

46

45

44

43

MÉDIA

--

ÍNDICE PLACA - IP

47

DV	V	MV
DL	L	ML

46

45

44

43

MÉDIA

--

ÍNDICE GENGIVAL - IG

47

DV	V	MV
DL	L	ML

46

45

44

43

MÉDIA

--

ÍNDICE SANGRAMENTO - IS

47

D	V	M
L		

--

46

--

45

--

44

--

43

--

MÉDIA

--

ANEXO A4. Modelo da listagem de instruções escritas fornecidas aos voluntários.

INSTRUÇÕES PARA O USO DO DENTIFRÍCIO EXPERIMENTAL

(período de 21 dias)

- 1- Use o dentifrício após o café da manhã, no almoço e antes de dormir (3 X DIA);
- 2- Aplique o dentifrício na matriz, numa linha única que a preencha;
- 3- Coloque a matriz protegendo os dentes teste, pressionando-a até encaixar;
- 4- Coloque dentifrício na escova e escove os outros dentes normalmente;
- 5- Enxágüe a boca com água corrente;
- 6- Não coma nada por 2 horas.

Atenção: Não use outro dentifrício ou qualquer tipo de enxaguatório bucal durante o experimento.

Atenção: Não faça limpeza interproximal na região teste.

Atenção: No caso de antibióticos, avise-nos da sua utilização durante a pesquisa.

OBS: É IMPRESCINDÍVEL SEU COMPARECIMENTO NO DEPARTAMENTO DE PERIODONTIA DA FOP, NO DIA ____ E NO DIA ____, ÀS ____ HORAS.

O TUBO DE DENTIFRÍCIO VAZIO E A ESCOVA DENTAL DEVERÃO SER DEVOLVIDOS NO FINAL DA PESQUISA.

APÊNDICES

APÊNDICE 1. Valores do Índice de Placa (IP), Gengival (IG) e de Sangramento Gengival (IS) dos períodos 1, 2, 3, 4 e 5 no DIA 0.

Dentifício		Período 1			Período 2			Período 3			Período 4			Período 5		
	voluntário	IP	IG	IS	IP	IG	IS	IP	IG	IS	IP	IG	IS	IP	IG	IS
	1	0,090	0,286	0,125	0,083	0,291	0	0,090	0,286	0,125	0,083	0,291	0	0,083	0,291	0
	2	0,416	0,166	0	0,416	0,166	0	0,333	0,416	0,063	0,416	0,166	0	0,416	0,166	0
A	3	0,416	0,416	0,063	0,333	0,416	0,063	0,416	0,416	0,063	0,333	0,416	0,063	0,333	0,416	0,063
	4	0,125	0,375	0,187	0,250	0,375	0,250	0,125	0,375	0,187	0,250	0,375	0,250	0,250	0,375	0,250
	5	0,250	0,333	0,250	0,125	0,417	0,188	0,250	0,333	0,250	0,125	0,417	0,188	0,125	0,417	0,188
	6	0,083	0,583	0,233	0,083	0,500	0,313	0,083	0,583	0,233	0,250	0,333	0,250	0,125	0,417	0,188
B	7	0,051	0,083	0,080	0,042	0,083	0	0,083	0,583	0,233	0,083	0,583	0,233	0,083	0,500	0,313
	8	0,051	0,292	0,321	0,042	0,292	0,125	0,051	0,083	0,080	0,051	0,083	0,080	0,042	0,083	0
	9	0,735	0,167	0,067	0,735	0,167	0,313	0,735	0,167	0,313	0,333	0,333	0,125	0,735	0,167	0,067
	10	0,333	0,333	0,065	0,333	0,333	0,125	0,333	0,333	0,125	0,333	0,333	0,125	0,735	0,167	0,313
C	11	0,042	0,083	0,250	0,042	0,083	0,250	0,042	0,083	0,250	0,042	0,083	0,250	0,333	0,333	0,125
	12	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
	13	0,083	0,208	0,125	0,223	0,208	0,250	0,083	0,313	0	0,128	0,167	0,125	0,073	0,083	0
	14	0,073	0,083	0	0,125	0,167	0	0,073	0,083	0	0,128	0,167	0,125	0,128	0,167	0,089
D	15	0,128	0,167	0,089	0,128	0,167	0,125	0,128	0,167	0,089	0,128	0,167	0,125	0,280	0,083	0
	16	0,280	0,083	0	0,083	0,313	0	0,280	0,083	0	0,128	0,167	0,089	0,128	0,167	0,125
	17	0,208	0,417	0,250	0,083	0,417	0,250	0,120	0,250	0,435	0,083	0,313	0,500	0,125	0,250	0
	18	0,458	0,417	0,250	0,089	0,313	0,250	0,458	0,417	0,250	0,125	0,250	0	0,083	0,313	0,500
E	19	0,167	0,125	0	0,125	0,250	0	0,089	0,313	0,250	0,208	0,417	0,250	0,125	0,250	0
	20	0,120	0,250	0,435	0,083	0,313	0,500	0,125	0,250	0	0,458	0,417	0,250	0,083	0,313	0,500

APÊNDICE 2. Valores do fluxo salivar nos dias 0 e 21 nos PERÍODOS 1, 2, 3, 4 e 5.

ID	PERÍODO 1		PERÍODO 2		PERÍODO 3		PERÍODO 4		PERÍODO 5	
	Dia 0	dia 21	Dia 0	dia 21	Dia 0	dia 21	Dia 0	dia 21	Dia 0	dia 21
	FLUXO ml/min	FLUXO ml/min	FLUXO ml/min	FLUXO ml/min	FLUXO ml/min	FLUXO ml/min	FLUXO ml/min	FLUXO ml/min	FLUXO ml/min	FLUXO ml/min
1	1,81	1,83	1,85	1,99	1,95	2,00	1,84	1,88	1,81	1,95
2	1,05	1,10	1,09	1,21	1,23	1,39	1,48	2,02	1,05	1,10
3	2,51	2,51	2,40	2,54	1,52	1,71	1,90	2,51	2,40	2,56
4	2,19	2,87	2,15	2,15	2,12	2,55	2,58	2,67	2,19	2,77
5	1,36	1,49	1,46	1,58	1,60	1,65	1,39	1,49	1,36	1,49
6	1,10	1,14	1,84	2,00	1,18	1,22	1,20	1,34	1,09	1,19
7	1,60	1,61	1,48	2,30	1,51	1,61	1,60	1,86	1,83	1,95
8	1,70	1,73	1,90	1,91	1,70	1,73	1,70	1,95	1,10	1,55
9	1,33	1,35	1,33	1,55	1,33	1,42	1,33	1,51	1,50	1,61
10	2,23	2,47	2,63	2,89	2,60	2,67	2,56	2,69	2,47	2,69
11	1,16	1,25	1,16	1,30	1,20	1,36	1,22	1,36	1,39	1,56
12	X	x	x	x	x	x	x	x	x	X
13	2,09	2,25	2,00	2,55	2,00	2,00	2,08	2,19	2,15	2,15
14	1,47	1,62	1,47	1,71	1,44	1,59	1,39	1,60	1,45	1,65
15	1,46	1,27	1,40	1,40	1,38	1,25	1,33	1,35	1,27	1,36
16	1,84	2,00	1,80	2,00	1,95	2,05	2,01	2,23	1,84	2,51
17	1,48	2,30	1,48	1,99	1,54	1,66	1,55	2,33	1,51	2,16
18	1,90	1,71	1,87	1,76	1,89	1,78	1,67	1,71	1,74	1,71
19	2,58	2,55	2,66	2,75	2,42	2,59	2,22	2,56	2,61	2,58
20	2,34	2,13	2,14	2,25	1,99	2,13	2,32	2,36	2,51	2,49

APÊNDICE 3. Valores da atividade enzimática BAPNA (nmolxmgxmin) nas amostras de placa dental coletadas no DIA 21 dos PERÍODOS 1, 2, 3, 4 e 5.

	1		2		3		4		5	
ID	1º	Dia 21	2º	Dia 21	3º	Dia 21	4º	Dia 21	5º	Dia 21
1	A	7,25	B	21,17	D	6,19	C	2,17	E	1,18
2	A	8,00	B	11,42	D	10,81	C	4,81	E	2,26
3	A	14,84	B	16,13	D	7,68	C	1,88	E	8,13
4	A	13,17	B	5,17	D	8,14	C	1,23	E	1,20
5	B	5,44	A	14,29	C	1,25	E	23,40	D	3,82
6	B	15,00	A	8,31	C	5,12	E	4,73	D	3,01
7	B	11,75	A	11,69	C	1,78	E	7,08	D	3,02
8	B	34,65	A	14,65	C	4,20	E	1,79	D	5,29
9	C	5,36	D	21,58	E	6,45	B	6,72	A	9,63
10	C	0,57	D	5,14	E	11,75	B	10,30	A	6,68
11	C	7,38	D	33,40	E	6,48	B	12,65	A	7,09
12	C	X	D	X	E	X	B	X	A	X
13	D	3,89	E	7,95	B	6,54	A	11,77	C	2,24
14	D	6,37	E	7,50	B	18,34	A	11,62	C	2,73
15	D	21,05	E	3,38	B	11,11	A	11,71	C	2,23
16	D	1,33	E	2,79	B	11,92	A	13,37	C	0,38
17	E	3,29	C	2,57	A	12,73	D	3,46	B	5,49
18	E	6,73	C	4,77	A	10,50	D	7,20	B	4,38
19	E	2,22	C	1,89	A	12,13	D	20,50	B	3,52
20	E	6,24	C	1,09	A	9,15	D	6,86	B	4,03

APÊNDICE 4. Valores quantitativos dos CVS (ppb) no hálito dos voluntários nos PERÍODOS 1,2,3,4 e 5 nos dias 0 e 21.

	Período 1			Período 2			Período 3			Período 4			Período 5		
ID	1º	Dia 0	Dia 21	2º	Dia 0	Dia 21	3º	Dia 0	Dia 21	4º	Dia 0	Dia 21	5º	Dia 0	Dia 21
1	A	38	78	B	44	45	D	23	84	C	32	33	E	30	40
2	A	42	135	B	32	45	D	32	52	C	30	35	E	34	45
3	A	38	62	B	34	46	D	35	65	C	25	31	E	22	39
4	A	14	36	B	17	32	D	18	50	C	15	31	E	19	37
5	B	55	53	A	45	78	C	48	49	E	44	55	D	41	74
6	B	13	58	A	33	82	C	10	45	E	14	59	D	16	68
7	B	22	52	A	25	81	C	23	45	E	21	39	D	19	51
8	B	31	59	A	30	75	C	33	36	E	35	31	D	32	70
9	C	31	42	D	33	70	E	28	50	B	29	55	A	26	89
10	C	26	40	D	22	68	E	22	55	B	23	57	A	18	87
11	C	43	55	D	35	61	E	37	44	B	40	50	A	38	92
12	C	x	X	D	x	X	E	X	X	B	X	X	A	X	x
13	D	38	93	E	39	59	B	33	55	A	36	79	C	35	31
14	D	39	68	E	28	55	B	36	49	A	24	95	C	26	29
15	D	23	87	E	19	44	B	25	43	A	16	88	C	15	19
16	D	18	79	E	17	37	B	15	36	A	16	89	C	14	24
17	E	23	39	C	20	51	A	25	85	D	22	95	B	21	60
18	E	26	39	C	21	59	A	24	68	D	29	64	B	30	45
19	E	22	37	C	08	58	A	24	76	D	10	77	B	08	32
20	E	34	42	C	30	51	A	30	80	D	31	76	B	33	55



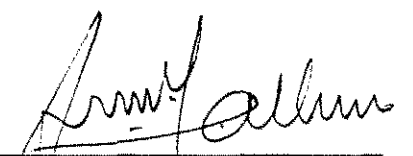
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que a Comissão de Ética para Experimentos em Humanos se encontra em fase de implantação. O Departamento de Prótese e Periodontia aprovou o projeto **"Avaliação Bioquímica do Efeito da Associação Triclosan-Gantrez-Zinco-Pirofostato na Atividade de Enzimas Tipo Tripsina e na Formação de Grupos Sulfidrilos na Placa Dental e na Saliva Durante a Gengivite Experimental"**, de autoria do Cirurgião Dentista Getúlio da Rocha Nogueira Filho e sobre e a orientação do Prof. Dr. Sérgio de Toledo.

Piracicaba, 13 de agosto de 1997.



Prof. Dr. ANTONIO WILSON SALLUM
Chefe do DEPTO. DE PRÓT. E PERIODONTIA
FOP - UNICAMP

De acordo:



Prof. Dr. JOSÉ RANALI
Diretor