

IVAN TOSHIO MARUO

**EFEITOS DA CLOREXIDINA NOS ESTREPTOCOCOS TOTAIS FORMADORES
DE BIOFILME DO DISJUNTOR PALATAL**

**CURITIBA
2006**

IVAN TOSHIO MARUO

**EFEITOS DA CLOREXIDINA NOS ESTREPTOCOCOS TOTAIS FORMADORES
DE BIOFILME DO DISJUNTOR PALATAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Odontologia, Área de Concentração em Ortodontia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Elisa Souza Camargo

Co-orientador: Prof. Dr. Edvaldo Antonio Ribeiro Rosa

**CURITIBA
2006**

M389e
2006 Maruo, Ivan Toshio
Efeitos da clorexidina nos estreptococos totais formadores de biofilme do
disjuntor palatal / Ivan Toshio Maruo ; orientadora, Elisa Souza Camargo ;
co-orientador, Edvaldo Antonio Ribeiro Rosa. – 2006.
xi, 113 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná,
Curitiba, 2006
Inclui bibliografia

1. Clorexidina. 2. Streptococcus. 3. Ortodontia. I. Camargo, Elisa Souza.
II. Rosa, Edvaldo Antonio Ribeiro. III. Pontifícia Universidade Católica do
Paraná. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. IV. Título.

CDD 21. ed. – 617.643



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Curso de Odontologia
Programa de Pós-Graduação em Odontologia

TERMO DE APROVAÇÃO

IVAN TOSHIO MARUO

EFEITOS DA CLOREXIDINA NOS ESTREPTOCOCOS TOTAIS FORMADORES DE BIOFILME DO DISJUNTOR PALATAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como parte dos requisitos parciais para a obtenção do Título de Mestre em Odontologia, Área de Concentração em Ortodontia.

Orientador(a):

Prof.^a Dr.^a Elisa Souza Camargo
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR

Prof. Dr. Eduardo Franzotti Sant'Anna
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, UFRJ

Prof. Dr. Orlando Tanaka
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR

Curitiba, 18 de dezembro de 2006.

“O importante é não parar de questionar. A curiosidade tem sua própria razão de existir. Não se pode evitar ficar estupefato quando se contempla os mistérios da eternidade, da vida, da estrutura maravilhosa da realidade. É suficiente que pelo menos se tente compreender um pouco desse mistério todos os dias. Nunca perca a sagrada curiosidade.”

ALBERT EINSTEIN

A **Deus**, pela minha vida com saúde, pela minha ótima família e pelos bons amigos que colocou e vem colocando no meu caminho.

Aos meus queridos pais **Mitiko Ishimura Maruo** e **Hiroshi Maruo**, por me inspirarem a batalhar por meus objetivos e pelo seu constante estímulo. Sua dedicação incansável pelo meu bem-estar e pela minha boa formação como pessoa e profissional me estimulam a me tornar diariamente uma pessoa melhor. Vocês são as pessoas que inspiram minhas atitudes e meu caráter. Sem seu estímulo, carinho, apoio e amor, eu não seria nada.

Aos meus avós paternos **Tamae Yamamoto Maruo** e **Mikio Maruo** (*in memoriam*) e aos meus avós maternos **Tizue Ishimura** e **Yoshio Ishimura** (*in memoriam*) por acompanharem meu crescimento físico e intelectual, com muito carinho e amor.

DEDICO

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À **Prof.^a Dr.^a Elisa Souza Camargo**, por sua orientação segura, bem como por toda ajuda, paciência, apoio e estímulo durante a elaboração desta dissertação. Pelas oportunidades a mim concedidas de conduzir e auxiliar a orientação de trabalhos de pesquisa. Pelo apoio incondicional e, sobretudo, pela confiança em todos os momentos do curso. Por seu exemplo como docente, clínica e pesquisadora. Por sua amizade, sensibilidade e alto astral.

Ao **Prof. Dr. Edvaldo Antonio Ribeiro Rosa**, por sua co-orientação indispensável na condução desta dissertação. Pelo seu bom humor, paciência e ajuda nos momentos difíceis. Pela sua amizade, seus ensinamentos e sua competência como pesquisador e docente.

À **farmacêutica Rosimeire Takaki Rosa** por toda a sua dedicação e ajuda na parte laboratorial desta pesquisa.

MUITO OBRIGADO

AGRADECIMENTOS

À Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR) que me recebeu no Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Concentração em Ortodontia.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) que concedeu minha Bolsa de Estudo e Auxílio à Pesquisa.

Ao Diretor do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Prof. Dr. Sérgio Vieira, por sua constante luta em elevar o nome de nossa Instituição.

Ao Prof. Dr. Orlando Tanaka pela sua amizade, pelo exemplo diário de dedicação, organização e competência na condução de nossa Área de Concentração e pela preocupação constante com nossa boa formação pessoal e profissional. Pela aceitação imediata ao convite de compor minha banca de qualificação. Por ser um profissional que fala, faz e mostra.

Ao Prof. Dr. Hiroshi Maruo, pela sua amizade, confiança e preocupação incansável em desenvolver nosso bom senso como clínicos, pesquisadores e docentes. Seu exemplo de caráter, de clínico, de pesquisador e de professor me inspira a continuar sempre me aperfeiçoando.

Ao Prof. Dr. Odilon Guariza Filho, por todos os seus ensinamentos, por seu bom humor e pela sua amizade. Por estimular nossa organização e pela paciência em nos ensinar a técnica ortodôntica.

Ao Prof. José Henrique Gonzaga de Oliveira por todos seus ensinamentos, paciência e pela sua amizade. Por nos transmitir sua criatividade e dividir seus conhecimentos.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Nunes Rached pela constante disposição em discutir ciência e dividir seus conhecimentos. Pela sua amizade e por ter aceito de imediato o convite de compor minha banca de qualificação.

À colega de turma e amiga Ariana Pulido Guerrero, por me mostrar como é possível estudar e acompanhar um curso de Mestrado em um país estrangeiro, sem perder o bom humor e o coleguismo.

À colega de turma e amiga Betina do Rosário Pereira, por sempre manter seu alto astral, alegria, coleguismo e amizade nos momentos bons e difíceis do curso. É muito bom saber que, além de nosso país serem amigos, você também é minha amiga.

À colega de turma e amiga Camila Del Moro, pelo seu exemplo de sensibilidade e preocupação com os amigos e pela amizade em todos os momentos.

À colega de turma e amiga Karine Kimak Salmória Stevão pelo exemplo de dedicação e pela ajuda na realização e orientação de trabalhos de pesquisa, bem como pelo bom humor e alto astral constantes.

Ao colega de turma e amigo Leandro Teixeira de Souza pela sua amizade, bom humor e pela companhia nas festas. Pelas dicas de computador e de confecção de aparelhos.

Ao colega de turma e amigo Roger Thronicke Rodrigues por dividir conosco sua experiência clínica e profissional e por sempre manter o bom humor e a alegria da turma, durante todo o curso.

À colega de turma e amiga Thaís Gelatti Bortoly pela amizade e companheirismo, e por ter dividido comigo momentos bons e difíceis no curso e também no laboratório de Estomatologia.

A todos os colegas de turma pela convivência mais que agradável, nos bons e maus momentos, nestes dois anos de curso, bem como pela ajuda na obtenção da amostra da dissertação.

Aos colegas e amigos do Mestrado em Odontologia, Área de Concentração em Dentística Andréa Freire de Vasconcelos, Luciane Grochocki Resende, Marcos Kenzo Takahashi e Rafael Moura Jorge pelos bons momentos de convívio. A proximidade de nossas salas de permanência permitiu um maior contato e uma ótima companhia.

Aos colegas e amigos do Mestrado em Odontologia, Áreas de Concentração em Estomatologia e em Saúde Coletiva pelos bons momentos que passamos nas aulas que tivemos juntos e pelo convívio agradável.

Ao Mestre em Odontologia, Área de Concentração em Ortodontia pela PUCPR, Flávio André Ferraz Lara e ao Mestre em Odontologia, Área de Concentração em Estomatologia pela PUCPR Acir José Dirschnabel pela amizade e ajuda na formatação desta dissertação.

Ao Prof. Dr. Sérgio Aparecido Ignácio pela sua amizade e pelos ensinamentos, paciência e orientação da análise estatística dos resultados desta dissertação.

Aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da PUCPR pelos ensinamentos transmitidos.

Aos Mestres em Odontologia, Área de Concentração em Ortodontia pela PUCPR, Armando Yukio Saga e Claudio Vinícius Sabatoski pelas suas cartas de recomendação, por sua amizade e estímulo.

À secretária Neide Reis Borges e às estagiárias Lucinéia Furtado, Maria Cláudia Guimarães Lopes e Aline Cristine Machado Wiens, pela eficiência, paciência, alegria e estímulo.

À funcionária Silvana Casagrande Gabardo pelo auxílio prestado nas práticas clínicas de Ortodontia.

Aos alunos do 7º e 8º períodos do curso de Odontologia da PUCPR, pela oportunidade da prática da docência e da co-orientação em pesquisa.

Aos meus amigos, por estarem próximos em todos os momentos importantes de minha vida.

A todos que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desta dissertação.

MUITO OBRIGADO

SUMÁRIO

1 ARTIGO EM INGLÊS.....	1
TITLE PAGE.....	2
ABSTRACT.....	3
INTRODUCTION.....	4
MATERIAL AND METHODS.....	5
RESULTS.....	7
DISCUSSION.....	9
CONCLUSIONS.....	13
REFERENCES.....	14
TABLES LEGEND.....	19
TABLES.....	20
RESEARCH ETHICS COMMITTEE APPROVAL.....	21
COPYRIGHT RELEASE.....	22
 2 ARTIGO EM PORTUGUÊS.....	 23
PÁGINA TÍTULO.....	24
RESUMO.....	25
INTRODUÇÃO.....	26
MATERIAL E MÉTODOS.....	27
RESULTADOS.....	30
DISCUSSÃO.....	32
CONCLUSÕES.....	37
REFERÊNCIAS.....	38
LEGENDA DAS TABELAS.....	43
TABELAS.....	44
TERMO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	45
DIREITOS AUTORAIS.....	46
 3 ANEXOS.....	 47
ANEXO I – RESUMOS DOS ARTIGOS UTILIZADOS NA DISCUSSÃO.....	48
ANEXO II – METODOLOGIA.....	74

ANEXO III – ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	92
ANEXO IV – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – GRUPO CLOREXIDINA.....	101
ANEXO V – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – GRUPO CONTROLE.....	103
ANEXO VI – FICHA CADASTRAL DOS PACIENTES DA AMOSTRA.....	105
ANEXO VII – FICHA DE CONTROLE DOS BOCHECHOS.....	106
ANEXO VIII – NORMAS PARA PUBLICAÇÃO – <i>AMERICAN JOURNAL OF ORTHODONTICS AND DENTOFACIAL ORTHOPEDICS</i>	107

1 ARTIGO EM INGLÊS

TITLE PAGE**CHLORHEXIDINE EFFECT ON TOTAL STREPTOCOCCI OF TOOTH-TISSUE-BORNE PALATAL EXPANDER BIOFILM****AUTHORS:**

IVAN TOSHIO MARUO, DDS
Graduate Student
Dental Master Program (Orthodontic area)
Pontifical Catholic University of Paraná, Curitiba, Brazil

ELISA SOUZA CAMARGO, DDS, MSD, PhD
Associate Professor
Dental Master Program (Orthodontic area)
Pontifical Catholic University of Paraná, Curitiba, Brazil

EDVALDO ANTONIO RIBEIRO ROSA, Pharm B, MSc and PhD
Associate Professor
Dental Master Program (Oral Microbiology, Immunology and Stomatology area)
Pontifical Catholic University of Paraná, Curitiba, Brazil

Corresponding author

ELISA SOUZA CAMARGO, DDS, MSD, PhD
Associate Professor
Dental Master Program (Orthodontic area)
Pontifical Catholic University of Paraná, Curitiba, Paraná
Address: Rua Imaculada Conceição, 1155 – Bairro Prado Velho
CEP 80215-901 Curitiba – Paraná
Brazil
Phone: 55-41-3271-1637
Fax number: 55-41-3271-1405
E-mail: elisa.camargo@pucpr.br

ABSTRACT

Introduction: The aim of this study was to assess the quantity of total streptococci, biofilm mass and their correlation in tooth-tissue-borne palatal expander (TTBPE), as well as the effect of chlorhexidine on these variables. **Methods:** Patients who had TTBPE removal indicated were divided into 2 groups: Chlorhexidine (CHX) (n=26), in which thrice daily 0.2% chlorhexidine digluconate mouthrinses were prescribed 7 days before TTBPE removal; and Control (CON) (n=25), in which no antimicrobial treatment was applied. "Gender", "Age" and "TTBPE wear time" were recorded. After TTBPE removal, biofilm mass was determined by the difference between [TTBPE+biofilm] and [TTBPE only] masses. Total streptococci counts were determined by biofilm suspension, followed by progressive dilutions and culture on Mitis Salivarius Agar, with incubation at 37°C for 72h. Colony Forming Units of total streptococci/mg of biofilm (CFU-TS/mg) were calculated. **Results:** Total streptococci mean values in CHX (6.77×10^6 CFU-TS/mg) were statistically lower ($p < 0.01$) than those in CON (3.82×10^7 CFU-TS/mg), but there was no statistical difference ($p > 0.05$) between CHX (168.88mg) and CON (182.04mg) masses nor statistical correlation ($p > 0.05$) between biofilm mass and total streptococci counts in the two groups. **Conclusions:** On TTBPE, biofilm presents 3.82×10^7 UFC-ST/mg, 182.04mg mass and there is no correlation between them. Chlorhexidine reduces the quantity of total streptococci in TTBPE, and has no effect either on biofilm mass or lack of correlation between biofilm mass and quantity of total streptococci.

INTRODUCTION

The tooth-tissue-borne palatal expander (TTBPE) presents greater orthopedic effect¹ and less reduced alveolar bone crest level of supporting teeth² than the tooth-borne expander. However, in a healthy oral cavity, microbiota coexist in a state of balance with their host, and the placement of orthodontic appliances unbalances this environment and disease may result.³ The most common side effects of fixed orthodontic appliances, namely decalcification⁴ and periodontal disease,⁵ are caused by bacteria. Both design and surface of orthodontic accessories and bonding material may influence biofilm formation.^{6,7,8,9,10}

Considering TTBPE, the importance of decalcification and periodontal disease risks are outweighed by the 50% prevalence of streptococcal bacteremia following the TTBPE removal procedure,¹¹ which is much higher than the 10%¹² and 7.5%¹³ bacteremia prevalence following banding, and the 6.6%¹⁴ following debanding. This greater prevalence could be explained not only by the presence of 4 bands in TTBPE, but also by the presence of a thick biofilm over the acrylic pad. The microbial composition of biofilms on these appliances is still unknown.¹¹ Moreover, since bacteremia is the result of bacterial presence and soft tissue aggression,¹² TTBPE acrylic pad microorganisms have mucosal inflammation as a suitable access to the bloodstream, which has been reported since the first TTBPE studies in pigs and humans¹⁵.

Thus, reduction in the quantity of TTBPE bacteria would not only diminish the risk of caries and periodontal disease, but also the occurrence of bacteremia. Chlorhexidine is known for its specificity, efficacy, substantivity, safety and stability,¹⁶ and its use by orthodontic patients has positive clinical¹⁷ and microbiological¹⁸ results. Moreover, Erverdi et al,¹⁹ assessing the application of chlorhexidine

mouthwash prior to orthodontic banding and debanding, noticed a 3-fold reduction in bacteremia .

The aim of this study was to assess the quantity of total streptococci, biofilm mass and their correlation in tooth-tissue-borne palatal expander (TTBPE), as well as the effect of chlorhexidine on these variables.

MATERIAL AND METHODS

Subjects

After the project was approved by the Pontifical Catholic University of Paraná Research Ethics Committee (Of. 011/06), patients of Dental Master's Program, 64 individuals in total, who had Tooth-Tissue-Borne Palatal Expander (TTBPE) removal indicated in accordance with their individual treatment planning, were examined.

Only healthy patients who presented no heart or valve diseases, immunosuppression, diabetes, antibiotic use 3 months before TTBPE removal or regular antiseptic use were selected. Factors such as gender, age and TTBPE wear time were recorded for statistical analyses.

Each TTBPE had a different design (related to patient's palate anatomy), quantity of activations (related to treatment planning) and operator. These potential confounding factors were solved by randomization.

Patients were randomly divided into 2 groups: Chlorhexidine Group (n=34) – in which 0.2% chlorhexidine digluconate was prescribed – and Control Group (n=30) – in which no antimicrobial treatment was prescribed. Informed consent was obtained from at least one guardian of all patients.

During research progress, 5 Control Group patients began antiseptic rinsing before the TTBPE removal session and 8 Chlorhexidine Group patients did not follow the rinsing protocol (described below), 1 due to mucosal desquamation and 7 due to negligence. Final sample demographics, with 51 subjects, are shown in Table I (page 20).

Chlorhexidine rinse protocol

The protocol consisted of three daily mouthrinses with 5mL of 0.2% chlorhexidine digluconate, 7 days before TTBPE removal. A thirty seconds rinsing period was recommended for each mouthrinse, as a result of a pilot study that tested 30, 45 and 60s mouthrinse periods, in 3 volunteers that wore TTBPE, were of a similar age as the sample subjects, but whose TTBPE was not evaluated.

Bacteriological assessment

In both groups, TTBPE was removed in a standardized procedure, avoiding any biofilm contamination. Subjects were instructed to not brush their teeth, neither to eat 2h before the TTBPE removal session. Only one patient from Chlorhexidine Group returned with yellow-brown stained teeth, but prophylaxis easily removed the stains. In both TTBPE groups, biofilm presented mineralization features and adhered firmly to the appliance.

Once removed, TTBPE mass was determined with analytical scale (Bel Mark U210A, Bel Engineering, Piracicaba, Brazil), on sterilized aluminum-foil. Next, it was immersed in 100mL of sterile distilled water in a screw-cap bottle. This bottle was put into an ultrasound tank (Thornton T7, Thornton Inpec Eletrônica Ltda, Ribeirão Preto,

Brazil) and the adhered biofilm mass was removed with continuous pulses (500W/15min).

After biofilm removal, TTBPE was maintained in dry heat at 37°C, for 48h and weighed again. Biofilm mass was considered the difference between TTBPE mass before and after biofilm collection.

The bottle with biofilm suspension was shaken in a vortex (AP56, Phoenix Ltda, São Paulo, Brazil) (2400rpm/30s) and opened in a class II biological security cabinet (VLFS 12, Veco do Brasil, São Paulo, Brazil). From each suspension, a 100µL aliquot was taken and processed by serial dilutions from 10 until 100,000 times in 10-fold increments. From each serial dilution tube, duplicate 10µL aliquots were placed on Mitis Salivarius Agar (BD, Diagnostic Systems, Sparks, MD). Plates were kept in jars (Permutation, Curitiba, Brazil) with 10% pCO₂ at 37°C, for 72h.

Only plates with 30-300 colonies were used for the bacterial count, since this count interval presents less experimental errors by operators. Results were expressed in Colony Forming Units of Total Streptococci per milliliter (CFU-TS/mL) and standardized to CFU-TS/mg of biofilm. Finally, log(CFU-TS/mg of biofilm) were also calculated.

RESULTS

In order to assess the effects of chlorhexidine, group homogeneity is necessary. Gender, age and tooth-tissue-borne palatal expander (TTBPE) wear time were considered to statistically compare the Chlorhexidine and Control Groups. The Chi-square test demonstrated that groups were not dependent on gender ($p>0.05$).

“Age” and “TTBPE wear time” did not present normality by the Kolmogorov-Smirnov and Shapiro-Wilk tests ($p>0.05$), although they presented variance homogeneity by the Levene test ($p>0.05$). Thus, groups were compared by the non-parametric Mann-Whitney “U” test, which showed that there was no difference between them considering “Age” and “TTBPE wear time” ($p>0.05$).

“TTBPE wear time” was assessed considering “Gender”, “Group” and considering both factors, through the two-way ANOVA. Results demonstrated that there was no difference between Chlorhexidine and Control Groups ($p>0.05$).

Confounding factors, such as the TTBPE design, patients’ treatment planning and operator were randomly divided into groups, therefore any difference in biofilm mass and total streptococci counts between groups was due to chlorhexidine mouthrinses.

Descriptives of “Biofilm Mass”, “CFU-TS/mg of Biofilm” and “log(CFU-TS/mg of Biofilm)” are presented at Table II (page 20) (Chlorhexidine Group) and Table III (page 20) (Control Group).

“Biofilm Mass”, “CFU-TS/mg of Biofilm” and “log(CFU-TS/mg of Biofilm)” were evaluated by the Kolmogorov-Smirnov and Shapiro-Wilk tests in order to verify their normality. Only the Control Group “Biofilm Mass” and Chlorhexidine Group “log(CFU-TS/mg of Biofilm)” presented normality ($p>0.05$). The Levene test was used to verify the variance homogeneity of variables and showed that “Biofilm Mass” and “CFU-TS/mg of Biofilm” did not present variance homogeneity ($p>0.05$).

Because of these features, the groups were compared by the non-parametric Mann-Whitney “U” test that showed that there was no statistical difference in “Biofilm Mass” between groups ($p=0.14$) and that 0.2% chlorhexidine digluconate statistically

reduced “CFU-TS/mg of Biofilm” and “log(CFU-TS/mg of Biofilm)” ($p < 0.01$) (Table IV, page 20). The Student “t” test showed the same results, although it is not indicated for variables that do not present normal distribution.

Spearman test demonstrated that there was no statistical correlation between “Biofilm Mass” and “CFU-TS/mg of Biofilm” in both the Control ($r = -0.1127$; $p > 0.05$) and Chlorhexidine Groups ($r = 0.3025$; $p > 0.05$). Furthermore, there was no correlation between “Biofilm Mass” and “log(CFU-TS/mg of Biofilm)” in both the Control ($r = -0.1127$; $p > 0.05$) and Chlorhexidine Groups ($r = 0.3025$; $p > 0.05$).

DISCUSSION

Subjects’ age in the Chlorhexidine ($10y3m \pm 2y3m$) and Control ($9y4m \pm 1y4m$) Groups showed prevalence of mixed dentition treatment. Rapid maxillary expansion in this phase provides sufficient increase in the upper dental arch width, corrects arch structure and attains adequate intercuspitation.^{20,21}

TTBPE wear time was also under control and was in conformity with the recommended active (2 to 3 weeks) and retention (at least 3 months) periods.²² This period in the oral cavity, associated with the difficulty of appliance cleaning and continuous saliva contact, lead to singular features in its biofilm, when compared with dental plaque and fixed orthodontic appliance biofilms.

Every biofilm follows a series of similar developmental stages: 1) adherence of cells to a conditioned surface; 2) rapid division and growth of adherent cells; and 3) a plateau of accumulation.²³ In environments that support a mixed planktonic flora, the final composition of the biofilm will reflect the outcome of bacterial succession, resulting from competition among adherent bacteria.²³ Beighton and Hayday²⁴,

assessing streptococcal growth rates on the molars of monkeys that were fed different diets in 6, 18, 24, 42 and 96h periods, found a stable population of these bacteria between 18 and 24h, irrespective of food type. They stated that interactions with other bacteria, the ability to compete for and assimilate nutrients from the immediate environment, maintenance of energy requirements and the specific and non-specific antibacterial systems of saliva, limit the natural flora doubling times in monkeys. As biofilms develop from single layers to multi-cell layers with intercellular matrices,²³ TTBPE biofilm, older than two hundred days and a difficult cleaning environment, should be an aggregate of live and dead cells of a stable bacteria population, as well as a large quantity of extracellular matrix.

In addition to these features, when removed, TTBPE biofilm was hardened, suggesting mineralization. In order to explain this phenomenon, one should understand how these biofilms are formed. Once installed, TTBPE are exposed to saliva. In the oral cavity, acquired pellicle adsorbs to all exposed surfaces to which bacteria will adhere.²³ Saliva is composed of proteins which, when immobilized on surfaces, behave as mineralization initiators, presumably by binding calcium ions.²⁵ Since salivary flow promotes greater supragingival calculus formation,²⁶ and as TTBPE are fixed for a prolonged period, biofilm mineralization may be assumed.

No studies concerning TTBPE biofilm bacteria were found and, therefore, direct result comparison cannot be made. The mean quantity of TTBPE total streptococci in the Control Group (7.30log) of the present study was greater than that present in the dental plaque of the 96h molar palatal grooves of monkeys that were fed a cariogenic high sucrose diet ($6.30 \pm 0.49 \log$).²⁴ This also occurred in the dental plaque of maxillary molars ($6.30 \pm 0.72 \log$) and incisors ($6.10 \pm 0.96 \log$) of adult humans before a 6 month protocol of daily 0.12% chlorhexidine mouthrinses began.²⁷

Whereas, in the Control Group the quantity of total streptococci per mg of biofilm (3.82×10^7 CFU/mg of biofilm) was far lower than that of patients 1 month after full fixed orthodontic appliance bonding (1.51×10^{14} CFU/mg of biofilm) and even lower than that of these same patients before appliance placement (5.20×10^7 CFU/mg of biofilm).²⁸ However, when comparing these results, the biofilm formation period, extracellular matrix and TTBPE cleaning difficulty must be considered.

By means of the present study protocol, chlorhexidine reduced total streptococci counts ($p < 0.01$). This reduction of almost 1 log in the Chlorhexidine Group (6.57log) in comparison with the Control (7.30log) is very close to the reduction perceived when the quantity of total streptococci was evaluated in the dental plaque of human molars (6.04 ± 1.00) and incisors (6.19 ± 1.10) after 6 months of daily rinses with 0.12% chlorhexidine.²⁷ In *Streptococcus sanguis* and microcosm biofilms, chlorhexidine may diminish streptococci counts by 1 log after the first administration and by 3 log in early forming biofilm.²⁹ However, bacteria re-initiate colonization.²⁹ Furthermore, this reduction may be jeopardized by regular carbohydrate intake.³⁰ One and five minute periods of mouthwash simulators do not alter biofilm viability; this is only achieved by a one-hour exposure to chlorhexidine.³¹

The biofilm masses of the Chlorhexidine (168.88mg) and Control Groups (182.04mg) were not statistically different ($p = 0.14$) and this is in accordance with the fact that dead microorganisms are only removed by mechanical plaque removal.¹⁸ The present study results suggest that the contiguous palatal mucosa/TTBPE acrylic pad interface hinders mechanical removal by mouthrinses of total streptococci which were killed by chlorhexidine.

The chlorhexidine mode of action is most likely related to the extensive intracellular damage rather than cell lysis.³² The pharmacological features of

chlorhexidine and TTBPE biofilm complexity explain why greater total streptococci reduction could not be accomplished. Chlorhexidine retention is diminished at a more acid pH.³³ Vroom et al³⁴ demonstrated that biofilm pH is more acid at greater depths. Moreover, it is known that chlorhexidine is much less effective for killing mutans streptococci and lactobacilli in a biofilm than in the laboratory, probably because it does not reach the microorganisms located at a deeper level.³⁵ Nevertheless, as previously mentioned, it is likely that TTBPE biofilm presents a considerable quantity of mineral ions. Positive ions, like calcium, may occupy the same binding sites as chlorhexidine and limit its retention.^{36,37,38}

Bacteria that are members of a biofilm community are generally less susceptible, even to antibiotics, than are their planktonic counterparts, probably due to: 1) modified nutrient environments and suppression of growth rate; 2) a glycocalyx that constitutes a physical barrier to environmental fluctuations; or 3) the development of biofilm/attachment-specific phenotypes, which have a modified susceptibility toward antimicrobials.^{39,40,41} More related to chlorhexidine, its diffusion in biofilm is limited, as it only reaches the deeper layers after five minutes.⁴² This demonstrates that one cannot expect a greater reduction in total streptococci counts with the exclusive use of chlorhexidine mouthrinses, even when used with greater frequency or for a longer period.

In both groups, there was no statistical correlation between biofilm mass and quantity of total streptococci ($p > 0.05$) and this demonstrates that TTBPE biofilm is a complex structure and needs further studies. It is expected that the biofilms of these appliances, such as dental plaque, consist of cells, extracellular matrix, empty spaces and substratum.⁴³ A better understanding of their three-dimensional structures is essential to develop more efficient therapeutic procedures.

More relevant than the risk of caries and periodontal disease development, TTBPE removal presents 50% prevalence of bacteremia.¹¹ It is not yet possible to know whether the quantity of TTBPE total streptococci reduction achieved in the present research may prevent the occurrence of bacteremia because, up to the present moment, there is no understanding about the correlation between bacteremia and the cellular density of oral environment microbiota. With regard to this issue, the American Heart Association guidelines⁴⁴ are not clear, for they do not include TTBPE removal as a procedure with a high risk for bacteremia .

It is expected that the present study results may be a potential base for developing protocols that minimize or hinder not only the risk of caries and periodontal disease, but also bacteremia. This information will be very useful in the treatment of moderate and high-risk infective endocarditis subjects, who need an enhanced orthopedic effect on their rapid maxillary expansion.

CONCLUSIONS

On tooth-tissue-borne palatal expander:

- a) Biofilm presents 3.82×10^7 CFU-TS/mg, 182.04mg mass and there is no correlation between them; and
- b) Chlorhexidine reduces the quantity of biofilm total streptococci (6.77×10^6 CFU-TS/mg); and has no effect either on biofilm mass (168.88mg) or the lack of relationship between the quantity of total streptococci and biofilm mass.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by CAPES, Brazil. We thank Dr. Rosimeire Takaki Rosa, Pharm B, for her technical expertise in microbial procedures and Professor Sérgio Aparecido Ignácio, PhD, for his assistance with the statistical analyses.

REFERENCES

1. Oliveira NL, Silveira AC, Kusnoto B, Viana G. Three-dimensional assessment of morphologic changes of the maxilla: a comparison of 2 kinds of palatal expanders. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2004;126:354-362.
2. Garib DG, Henriques JFC, Janson G, Freitas MR, Fernandes AY. Periodontal effects of rapid maxillary expansion with tooth-tissue-borne and tooth-borne expanders: a computed tomography evaluation. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2006;129:749-758.
3. Anhoury P, Nathanson D, Hughes CV, Socransky S, Feres M, Chou LL. Microbial profile on metallic and ceramic bracket materials. *Angle Orthod* 2002;72:338-343.
4. Millett DT, Nunn JH, Welbury RR, Gordon PH. Decalcification in relation to brackets bonded with glass ionomer cement or a resin adhesive. *Angle Orthod* 1999;69:65-70.
5. Knoernschild KL, Rogers HM, Lefebvre CA, Fortson WM, Schuster GS. Endotoxin affinity for orthodontic brackets. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1999;115:634-639.
6. Weitman RT, Eames WB. Plaque accumulation on composite surfaces after various finishing procedures. *J Am Dent Assoc* 1975;91:101-106.

7. Zachrisson BU, Brobakken B. O. Clinical comparison of direct versus indirect bonding with different brackets types and adhesives. *Am J Orthod* 1978;74:62-78.
8. Gwinnet AJ, Ceen RF. Plaque distribution on bonded brackets: a scanning microscope study. *Am J Orthod* 1979;75:667-677.
9. Svanberg M, Ljunglöf S, Thilander B. *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis* in plaque from orthodontic bands and brackets. *Eur J Orthod* 1984;6:132-136.
10. Sukontapatipark W, El-Agroudi MA, Selliseth NJ, Thunold K, Selvig KA. Bacterial colonization associated with fixed orthodontic appliances: a scanning electron microscopy study. *Eur J Orthod* 2001;23:475-484.
11. Rosa EAR, Rached RN, Tanaka O, Fronza F, Fronza F, Assad RA. Preliminary investigation of bacteremia incidence after removal of the Haas palatal expander. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2005;127:64-66.
12. McLaughing JO, Coulter WA, Coffey A, Burden DJ. The incidence of bacteremia after orthodontic banding. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1996;109:639-644.
13. Erverdi N, Biren S, Kadir T, Özkan H, Acar A. Investigation of bacteremia following orthodontic banding. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1999;116:687-690.
14. Erverdi N, Biren S, Kadir T, Acar A. Investigation of bacteremia following orthodontic debanding. *Angle Orthod* 2000;70:11-14.
15. Haas AJ. Rapid expansion of the maxillary dental arch and nasal cavity by opening the midpalatal suture. *Angle Orthod* 1961;31:73-90.
16. Lang NP, Brex MC. Chlorhexidine digluconate – an agent for chemical plaque control and prevention of gingival inflammation. *J Periodont Res* 1986;21: Suppl 16:74-89.

17. Gehlen I, Netuschil L, Berg R, Reich E, Katsaros C. The influence of a 0.2% chlorhexidine mouthrinse on plaque regrowth in orthodontic patients: a randomized prospective study – part I: clinical parameters. *J Orofac Orthop* 2000;61:54-62.
18. Gehlen I, Netuschil L, Georg T, Reich E, Berg R, Katsaros C. The influence of a 0.2% chlorhexidine mouthrinse on plaque regrowth in orthodontic patients: a randomized prospective study – part II: bacteriological parameters. *J Orofac Orthop* 2000;61:138-148.
19. Erverdi N, Acar A, Isgüden B, Kadir T. Investigation of bacteremia after orthodontic banding and debanding following chlorhexidine mouth wash application. *Angle Orthod* 2001;71:190-194.
20. Silva Filho OG., Villas Boas MC, Capelozza Filho L. Rapid maxillary expansion in the primary and mixed dentitions: a cephalometric evaluation. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1991; 100:171-181.
21. Silva Filho OG, Montes LAP, Torelly LF. Rapid maxillary expansion in the deciduous and mixed dentition evaluated through posteroanterior cephalometric analysis. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1995; 107:268-275.
22. Haas AJ. Andrew J. Haas: interview. *R Dental Press Ortodon Ortop Facial* 2001;6:1-10.
23. Bowden GHW, Li YH. Nutritional influences on biofilm development. *Adv Dent Res* 1997;11:81-99.
24. Beighton D, Hayday H. the influence of diet on the growth of streptococcal bacteria on the molar teeth of monkeys (*Macaca fascicularis*). *Archs Oral Biol* 1986;31:449-454.

25. Nancollas GH, Johnsson MAS. Calculus formation and inhibition. *Adv Dent Res* 1994;8:307-311.
26. Jin Y, Yip HK. Supragingival calculus: formation and control. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002;13:426-441.
27. Briner WW, Grossman E, Buckner RY, Rebitski GF, Sox TE, Setser RE, Ebert ML. Effect of chlorhexidine gluconate mouthrinse on plaque bacteria. *J Periodont Res* 1986;21: Suppl 16:44-52.
28. Balenseifen JW, Madonia JV. Study of dental plaque in orthodontic patients. *J Dent Res* 1970;49:320-324.
29. Pratten J, Smith AW, Wilson M. Response of single species biofilmes and microcosm dental plaques to pulsing with chlorhexidine. *J Antimicrob Chemother* 1998;42:453-459.
30. Pratten J, Wilson M. Antimicrobial susceptibility and composition of microcosm dental plaques supplemented with sucrose. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:1595-1599.
31. Pratten J, Barnett P, Wilson M. Composition and susceptibility to chlorhexidine of multispecies biofilms of oral bacteria. *Appl Environ Microbiol* 1998;64:3515-3519.
32. Hennessey TD. Antibacterial properties of Hibitane. *J Clin Periodontol* 1977;4:36-48.
33. Bonesvoll P, Lökken P, Rølla G. Influence of concentration, time, temperature and pH on the retention of chlorhexidine in the human oral cavity after mouth rinses. *Archs Oral Biol* 1974;19:1025-1029.

34. Vroom JM, Grauw KJ, Gerritsen HC, Bradshaw DJ, Marsh PD, Watson GK, Birmingham JJ, Allison C. Depth penetration and detection of pH gradients in biofilms by two-photon excitation microscopy. *Appl Environ Microbiol* 1999;65:3502-3511.
35. Featherstone JDB. Delivery challenges for fluoride, chlorhexidine and xylitol. *BMC Oral Health* 2006;6:S8.
36. Rølla G, Melsen B. On the mechanism of the plaque inhibition by chlorhexidine. *J Dent Res* 1975;54(Spec Iss):B57-B62.
37. Bonesvoll P. Oral Pharmacology of chlorhexidine. *J Clin Periodontol* 1977;4:49-65.
38. Cummins D, Creeth JE. Delivery of antiplaque agents form dentifrices, gels, and mouthwashes. *J Dent Res* 1992;71:1439-1449.
39. Brown MRW, Allison DG, Gilbert P. Resistance of bacterial biofilms to antibiotics: a growth-rate related effect. *J Antimicrob Chemother* 1988;22:777-783.
40. Gilbert P, Collier PJ, Brown MRW. Influence of growth rate on susceptibility to antimicrobial agents: biofilms, cell cycle, dormancy, and stringent response. *Antimicrob Agents Chemother* 1990;34:1865-1868.
41. Gilbert P, Das J, Foley I. Biofilm susceptibility to antimicrobials. *Adv Dent Res* 1997;11:160-167.
42. Stewart PS. Diffusion in biofilms. *J Bacteriol* 2003;185:1485-1491.
43. Wood SR, Kirkham J, Marsh PD, Shore RC, Nattress B, Robinson C. Architecture of intact natural human plaque biofilms studied by confocal laser scanning microscopy. *J Dent Res* 2000;79:21-27.

44. Dajani AS, Taubert KA, Wilson W, Bolger AF, Bayer A, Ferrieri P, Gewitz MH, Shulman ST, Nouri S, Newburger JW, Hutto C, Pallasch TJ, Gage TW, Levison ME, Peter G, Zuccaro Jr G. Prevention of bacterial endocarditis. *Circulation* 1997;96:358-366.

TABLES LEGEND

Table I. Demographics of sample

Table II. Chlorhexidine Group descriptives of "Biofilm Mass", "CFU-TS/mg of Biofilm" and "CFU-TS/mg of Biofilm"

Table III. Control Group descriptives of "Biofilm Mass", "CFU-TS/mg of Biofilm" and "CFU-TS/mg of Biofilm"

Table IV. Mann-Whitney "U" test comparing "Biofilm Mass", "CFU-TS/mg of Biofilm" and "CFU-TS/mg of Biofilm" between groups

TABLES

Table I. Demographics of sample

	<i>Chlorhexidine</i>	<i>Control</i>
n	26	25
Gender		
Male	11	8
Female	15	17
Age (years/months)		
Mean	10y03m	9y4m
Standard-Deviation (SD)	2y03m	1y4m
Median	9y05m	9y6m
Minimum	7y00m	7y5m
Maximum	15y10m	11y6m
Expander wear time (days)		
Mean	209,35	200,28
Standard-Deviation (SD)	86,06	106,30
Median	178,50	147,00
Minimum	119,00	77,00
Maximum	405,00	421,00

Table II. Chlorhexidine Group descriptives of "Biofilm Mass", "CFU-TS/mg of Biofilm" and "CFU-TS/mg of Biofilm"

<i>Variable</i>	<i>n</i>	<i>Mean</i>	<i>SD</i>	<i>Median</i>	<i>Minimum</i>	<i>Maximum</i>
Biofilm Mass (mg)	26	168.8846	89.2649	145.0500	33.9000	419.4000
CFU-TS/mg of Biofilm	26	6.7682×10^6	7.7680×10^6	4.1718×10^6	6.4277×10^5	3.1097×10^7
log(CFU-TS/mg of Biofilm)	26	6.5653	0.5075	6.6201	5.8081	7.4925

Table III. Control Group descriptives of "Biofilm Mass", "CFU-TS/mg of Biofilm" and "CFU-TS/mg of Biofilm"

<i>Variable</i>	<i>n</i>	<i>Mean</i>	<i>SD</i>	<i>Median</i>	<i>Minimum</i>	<i>Maximum</i>
Biofilm Mass (mg)	25	182.0360	49.4263	166.3000	113.4000	296.9000
CFU-TS/mg of Biofilm	25	3.8246×10^7	4.7056×10^7	1.4661×10^7	3.6541×10^7	1.5208×10^7
log(CFU-TS/mg of Biofilm)	25	7.3048	0.484	7.1662	6.5628	8.1821

Table IV. Mann-Whitney "U" test comparing "Biofilm Mass", "CFU-TS/mg of Biofilm" and "CFU-TS/mg of Biofilm" between groups

<i>Variable</i>	<i>Chlorhexidine (n=26)</i> <i>Mean Rank</i>	<i>Control (n=25)</i> <i>Mean Rank</i>	<i>Z</i>	<i>p</i>
Biofilm mass	23.0000	29.1200	-1.4697	0.1416
CFU-TS/mg of Biofilm	17.3462	35.0000	-4.2395	0.0000*
log(CFU-TS/mg of Biofilm)	17.3462	35.0000	-4.2395	0.0000*

*p<0.05 means statistical difference between groups.

RESEARCH ETHICS COMMITTEE APPROVAL

Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Curitiba, 08 de fevereiro de 2006

Of. 011/06/CEP-PUCPR

Ref. "Avaliação dos efeitos da clorexidina na população de estreptococos totais formadores de biofilme no disjuntor palatal".

Prezado (a) Pesquisador (es),

Venho por meio deste informar a Vossa Senhoria que o Comitê de Ética em Pesquisa da PUCPR, no dia 08 de fevereiro do corrente ano aprovou o Projeto Intitulado "Avaliação dos efeitos da clorexidina na população de estreptococos totais formadores de biofilme no disjuntor palatal", pertencente ao Grupo III, sob o registro no CEP nº 941, e será encaminhado a CONEP para o devido cadastro. Lembro ao senhor (a) pesquisador (a) que é obrigatório encaminhar relatório anual parcial e relatório final a este CEP.

Atenciosamente,


Profª M. Sc Ana Cristina Miguez Ribeiro
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa - PUCPR

Ilma Sra.
Elisa Souza Camargo

COPYRIGHT RELEASE

"The undersigned authors transfer all copyright ownership of the manuscript 'Evaluation of chlorhexidine effect over biofilm forming total streptococci population of tooth-tissue-borne rapid maxillary expanders' to the American Association of Orthodontists in the event the work is published. The undersigned authors warrant that the article is original, does not infringe upon any copyright or other proprietary right of any third party, is not under consideration by another journal, has not been previously published, and includes any product that may derive from the published journal, whether print or electronic media. We sign for and accept responsibility for releasing this material."

Ivan Toshio Maruo

Elisa Souza Camargo

Edvaldo Antonio Ribeiro Rosa

2 ARTIGO EM PORTUGUÊS

PÁGINA TÍTULO**EFEITOS DA CLOREXIDINA NOS ESTREPTOCOCOS TOTAIS FORMADORES
DE BIOFILME DO DISJUNTOR PALATAL****AUTORES:**

IVAN TOSHIO MARUO

Cirurgião-Dentista pela Universidade Federal do Paraná (UFPR)

Mestrando em Odontologia, Área de Concentração em Ortodontia, Pontifícia
Universidade Católica do Paraná (PUCPR)

ELISA SOUZA CAMARGO – Autor responsável pela correspondência

Mestre e Doutora em Ortodontia, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

Professora Adjunta do Programa de Pós-Graduação em Ortodontia, Área de
Concentração em Ortodontia, Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR)

EDVALDO ANTONIO RIBEIRO ROSA

Farmacêutico pela Universidade Metodista de Piracicaba

Mestre e Doutor em Biologia e Patologia Bucal, Universidade Estadual de Campinas
(UNICAMP)

Professor Assistente e Microbiologia e Imunologia Bucal e do Programa de Pós-
Graduação em Odontologia, Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR)

Autor responsável pela correspondência

ELISA SOUZA CAMARGO

Professora Assistente

Mestrado em Odontologia – Área de Concentração em Ortodontia

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

Endereço: Rua Imaculada Conceição, 1155 – Bairro Prado Velho

CEP 80215-901 Curitiba – Paraná

Brasil

Telefone: 55-41-3271-1637

Fax: 55-41-3271-1405

E-mail: elisa.camargo@pucpr.br

RESUMO

Introdução: Este estudo avaliou a quantidade de estreptococos totais, a massa de biofilme e sua correlação no disjuntor dento-muco-suportado (DDMS), bem como o efeito da clorexidina nestas variáveis. **Metodologia:** Pacientes com indicação para a remoção de seu DDMS foram divididos em grupos: Clorexidina (CHX) (n=26), em que foram indicados 3 bochechos diários de digluconato de clorexidina a 0,2%, 7 dias antes da remoção do DDMS; e Controle (CON) (n=25), em que não foi aplicado qualquer tratamento antimicrobiano. Variáveis “Gênero”, “Idade” e “Tempo de uso dos DDMS” foram registradas. Após sua remoção, as massas de biofilme dos DDMS foram determinadas pela diferença entre as massas de [DDMS+biofilme] e de [DDMS sem biofilme]. A quantificação dos estreptococos totais foi determinada a partir da suspensão de biofilme, seguida por diluições progressivas e cultura em Ágar Mitis Salivarius, com incubação por 72h, a 37°C. Unidades Formadoras de Colônia de estreptococos totais/mg de biofilme (UFC-ST/mg) foram calculadas. **Resultados:** A quantidade média de estreptococos totais do CHX ($6,77 \times 10^6$ UFC-ST/mg) foi estatisticamente menor ($p < 0,01$) em relação a do CON ($3,82 \times 10^7$ UFC-ST/mg), mas não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre as massas médias de biofilme de CHX (168,88mg) e de CON (182,04mg). Não houve correlação estatística ($p > 0,05$) entre a massa de biofilme e a quantidade de estreptococos totais em ambos os grupos. **Conclusão:** No DDMS, o biofilme apresenta $3,82 \times 10^7$ UFC-ST/mg, massa de 182,04mg e não há correlação entre estas variáveis. A clorexidina reduz a quantidade de estreptococos totais no DDMS e não tem efeito sobre a massa de biofilme nem sobre a falta de correlação entre massa de biofilme e quantidade de estreptococos totais.

INTRODUÇÃO

O disjuntor dento-muco-suportado (DDMS) quando comparado com o disjuntor dento-suportado apresenta maior efeito ortopédico¹ e menor redução da crista alveolar dos dentes suporte.² Porém, se num ambiente oral saudável, os microrganismos coexistem em um estado de equilíbrio com seu hospedeiro, a instalação de qualquer aparelho ortodôntico desequilibra este ecossistema e pode resultar em doenças.³ Os efeitos colaterais mais comuns dos aparelhos fixos são causados por bactérias, consistindo na descalcificação dentária⁴ e no surgimento ou piora de doenças periodontais.⁵ As características de *design* e de superfície tanto dos acessórios ortodônticos quanto do material de colagem podem influenciar na formação de biofilme.^{6,7,8,9,10}

No caso dos DDMS, mais importante que o risco da doença cárie e periodontal, é a prevalência de 50% de bacteremia de estreptococos na sua remoção,¹¹ que é muito mais alta que as de 10%¹² e 7,5%¹³ na instalação e a de 6,6%¹⁴ na remoção de bandas. A maior ocorrência de bacteremia poderia ser explicada pela presença de 4 bandas nos DDMS, mas também pelo biofilme aderido à sua parte acrílica. A população microbiana formada nestes aparelhos ainda permanece desconhecida.¹¹ Além disto, uma vez que a bacteremia é resultado da presença de bactérias e agressão ao tecido mole,¹² a irritação na mucosa palatal, já relatada nos primeiros estudos dos DDMS em suínos e em humanos,¹⁵ é um possível meio de acesso das bactérias da parte acrílica do DDMS à corrente sangüínea.

Neste contexto, a redução da quantidade de bactérias nos DDMS diminuiria os riscos de desenvolvimento de cáries e de doença periodontal, bem como da ocorrência de bacteremia. A clorexidina é conhecida pelo seu amplo espectro de

atividade antimicrobiana, alta toxicidade seletiva, especificidade, eficácia, substantividade, segurança e estabilidade,¹⁶ e sua utilização em pacientes sob tratamento ortodôntico traz resultados positivos do ponto de vista clínico¹⁷ e microbiológico.¹⁸ Além disso, Erverdi et al,¹⁹ ao avaliarem o uso da clorexidina antes da instalação e da remoção de bandas, constataram uma redução em quase três vezes na prevalência de bacteremia.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a quantidade de estreptococos totais, a quantidade de massa de biofilme e sua correlação no disjuntor dento-muco suportado, bem como o efeito da clorexidina nestas variáveis.

MATERIAL E MÉTODOS

Seleção da amostra

Após a aprovação do projeto pelo Of. 011/06/Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, todos os pacientes da clínica do Programa de Pós-Graduação em Odontologia que utilizavam disjuntor palatal dento-muco-suportado (DDMS) e tinham indicada a sua remoção em razão de cada plano individual de tratamento foram examinados, totalizando 64 indivíduos.

Foram selecionados pacientes que não apresentavam qualquer problema cardíaco ou vascular, imunossupressão, diabetes, consumo de antibióticos nos 3 meses anteriores à remoção do disjuntor e uso de qualquer produto bacteriostático ou bactericida. Os fatores gênero, idade e tempo de uso do disjuntor foram controlados por meio de uma ficha cadastral de maneira a serem analisados estatisticamente.

Os DDMS apresentavam diferenças quanto ao seu *design* (relacionado à anatomia da região palatina do paciente), à quantidade de ativações (relacionada ao plano de tratamento) e ao operador que o confeccionou. Além disso, os pacientes se diferenciavam entre si quanto à técnica utilizada para a higiene bucal. A solução encontrada para neutralizar os efeitos destas variáveis de confundimento foi a aleatorização de distribuição dos pacientes.

Os pacientes foram divididos em Grupo Experimental (n=34) – que recebeu a solução de digluconato de clorexidina a 0,2% – e Grupo Controle (n=30) – que não recebeu qualquer tratamento para reduzir a quantidade de bactérias e a massa de biofilme do disjuntor. Pelo menos um dos responsáveis pelos pacientes recebeu e assinou o Termo de Consentimento concordando com a participação na pesquisa.

Durante a realização do estudo, cinco pacientes do Grupo Controle iniciaram a utilização de outros antissépticos orais antes da sessão de remoção dos DDMS e oito pacientes no Grupo Clorexidina não realizaram os bochechos conforme o protocolo abaixo, um por sensibilidade na mucosa oral e sete outros por negligência. Ao final, a amostra apresentou 51 pacientes, com as características listadas na Tabela I (página 44).

Protocolo de utilização da clorexidina

Foi utilizada a solução de digluconato de clorexidina a 0,2% na forma de bochechos. O protocolo recomendado foi de 3 bochechos diários de 5mL, 7 dias antes da remoção dos DDMS. O tempo de cada bochecho foi determinado como sendo de 30 segundos, após um estudo piloto testando 30, 45 e 60 segundos de

bochecho com 3 voluntários que utilizavam DDMS e possuíam a mesma idade da amostra. Os voluntários não tiveram seus DDMS avaliados.

Avaliação microbiológica

Em ambos os grupos, a remoção dos DDMS foi feita com procedimentos padronizados, de maneira a não remover nem contaminar o biofilme destes aparelhos. Os pacientes foram instruídos a não escovarem os dentes nem se alimentarem, no mínimo, duas horas antes da remoção do aparelho. Apenas um paciente do Grupo Clorexidina retornou com todos os dentes escurecidos, sendo a coloração normal restabelecida por profilaxia após a remoção do aparelho. Nos DDMS de ambos os grupos, o biofilme apresentava-se com características de mineralização e estava fortemente aderido ao aparelho.

Os DDMS tiveram suas massas determinadas em balança analítica (Bel Mark U210A, Bel Engineering, Piracicaba, Brasil), sobre lâminas de papel-alumínio esterilizadas. Em seguida, cada disjuntor foi imerso em 100mL de água destilada contida em frasco com vedação hermética. Este frasco foi disposto no centro de uma cuba de ultra-som (Thornton T7, Thornton Inpec Eletrônica Ltda, Ribeirão Preto, Brasil) e os biofilmes aderidos foram removidos por exposição continuada (500W/15min).

Após a remoção do biofilme, o disjuntor foi seco em estufa de incubação a 37°C, por 48 horas, e novamente pesado. A diferença entre as massas do aparelho pré e pós-coleta de biofilme foi considerada como sendo a massa de biofilme.

O frasco com o biofilme suspenso foi agitado em vórtex (AP56, Phoenix Ltda, São Paulo, Brasil) (2400rpm/30s) e aberto em gabinete de segurança biológica

classe II (VLFS 12, Veco do Brasil, São Paulo, Brasil). A partir da suspensão, foram tomadas alíquotas de 100µL que foram processadas por diluição seriada de 10 até 100.000 vezes, em incrementos de 10 vezes. De cada tubo da série de diluição, alíquotas de 10µL foram aplicadas sobre Ágar Mitis Salivarius (BD, Diagnostic Systems, Sparks, MD), em duplicata. Por fim, todas as placas foram armazenadas em jaras de anaerobiose (Permution, Curitiba, Brasil) e incubadas em pCO₂ 10% e 37°C, por 72 horas.

As placas que apresentaram 30-300 colônias foram tomadas para quantificação das bactérias, pois contagens neste intervalo apresentam menores erros experimentais por parte do operador. Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônias de estreptococos totais por mililitro (UFC-ST/mL) e corrigidos para unidades formadoras de colônia de estreptococos totais por miligrama de biofilme (UFC-ST/mg biofilme). Além de UFC-ST/mg de biofilme, foi também calculado log(UFC-ST/mg biofilme).

RESULTADOS

De maneira a avaliar os efeitos da clorexidina, é necessário que os grupos sejam homogêneos. Por esta razão, os grupos experimental e controle foram comparados estatisticamente entre si, quanto ao gênero, quanto à idade e quanto ao tempo de uso do disjuntor dento-muco-suportado (DDMS). O teste Qui-Quadrado demonstrou não haver dependência entre os grupos e os gêneros ($p>0,05$).

As variáveis “Tempo de Uso do Disjuntor” de ambos os grupos e “Idade” do grupo experimental não apresentaram normalidade, pelos testes de Kolmogorov-Smirnov e de Shapiro-Wilk ($p>0,05$) apresentando, porém, homogeneidade de

variância pelo teste de Levene ($p>0,05$). Devido a este comportamento das variáveis, os grupos foram comparados entre si pelo teste não-paramétrico “U” de Mann-Whitney, que demonstrou que os grupos não diferiram estatisticamente entre si quanto à “Idade” e quanto ao “Tempo de Uso do Disjuntor” ($p>0,05$).

O “Tempo de Uso do Disjuntor” também foi avaliado segundo “Gênero”, “Grupo” e estes dois fatores associados, por meio da ANOVA a dois critérios de classificação. Os resultados demonstraram não haver diferença entre os Grupos Clorexidina e Controle ($p>0,05$).

Como as variáveis de confundimento provenientes do tipo de aparelho, das características do paciente e do operador foram aleatoriamente divididas entre os grupos, qualquer diferença na massa de biofilme e na quantidade de estreptococos totais foi decorrente do efeito do uso ou não da clorexidina.

A estatística descritiva das variáveis “Massa de Biofilme”, “UFC-ST/mg de Biofilme” e “log(UFC-ST/mg de Biofilme)” são apresentadas na Tabela II (página 44) (Grupo Clorexidina) e Tabela III (página 44) (Grupo Controle).

As variáveis “Massa de Biofilme”, “UFC-ST/mg de Biofilme” e “log(UFC-ST/mg de Biofilme)” foram avaliadas segundo a normalidade, pelos testes de Kolmogorov-Smirnov e de Shapiro-Wilk. Somente “Massa de Biofilme” do Grupo Controle e “log(UFC-ST/mg de Biofilme)” do Grupo Clorexidina apresentaram normalidade ($p>0,05$).

Em seguida, as variáveis “Massa de Biofilme”, “UFC-ST/mg de Biofilme” e “log(UFC-ST/mg de Biofilme)” tiveram sua homogeneidade de variância avaliada pelo teste de Levene. Este teste demonstrou que “Massa de Biofilme” e “UFC-ST/mg de Biofilme” não apresentaram homogeneidade ($p>0,05$).

Devido a este comportamento, os grupos foram comparados pelo teste não-paramétrico “U” de Mann-Whitney, que demonstrou não haver diferença na “Massa de Biofilme” entre os grupos ($p=0,14$) e que o digluconato de clorexidina a 0,2% diminui estatisticamente os valores “UFC-ST/mg de Biofilme” e “log(UFC-ST/mg de Biofilme)” ($p<0,01$) (Tabela IV, página 44). O teste “t” de *Student* apresentou os mesmo resultados, apesar de não ser recomendado para as variáveis que não apresentem distribuição normal.

A Correlação de Spearman demonstrou que não há correlação estatística entre “Massa de Biofilme” e “UFC-ST/mg de Biofilme” tanto no Grupo Controle ($r= -0,1127$; $p>0,05$) quanto no Grupo Clorexidina ($r= 0,3025$; $p>0,05$). Da mesma forma, não há correlação entre “Massa de Biofilme” e “log(UFC-ST/mg de Biofilme)” tanto no Grupo Controle ($r= -0,1127$; $p>0,05$) quanto no Grupo Clorexidina ($r= 0,3025$; $p>0,05$).

DISCUSSÃO

A avaliação das idades dos indivíduos do Grupo Clorexidina ($10a3m\pm2a3m$) e do Grupo Controle ($9a4m\pm1a4m$) demonstrou uma predominância de tratamento na fase de dentição mista. A disjunção palatal, nesta fase, traz aumento no comprimento e melhora da forma da arcada superior e promove correta intercuspidação.^{20,21}

O tempo de uso do disjuntor dento-muco-suportado (DDMS) está em conformidade com as recomendações de duas ou três semanas de tratamento ativo, seguido por no mínimo três meses de contenção.²² Esse tempo em que os DDMS permanecem na cavidade bucal, associado à dificuldade de higienização e ao

contato constante com a saliva, fornece características distintas ao seu biofilme, quando comparado ao da placa bacteriana e ao dos aparelhos ortodônticos fixos.

Todos os biofilmes passam por estágios similares de desenvolvimento, quais sejam: 1) aderências das células à superfície; 2) rápida divisão celular e crescimento das células aderentes; e 3) um platô de acumulação.²³ Em ambientes que suportam microbiota multi-específica, a composição final do biofilme reflete a sucessão bacteriana resultante da competição entre as bactérias aderentes.²³ Beighton e Hayday,²⁴ avaliando o crescimento de estreptococos em molares de macacos que receberam diferentes dietas em um período de 6, 18, 24, 42 e 96 horas, observaram estabilização da quantidade destas bactérias entre 18 e 24 horas, independentemente da alimentação. Segundo estes autores, as interações com outras bactérias, a habilidade de competir e de assimilar nutrientes do ambiente, os requerimentos para manutenção de energia e o sistema antibacteriano não-específico da saliva limitam o tempo de multiplicação da microbiota normal de macacos. Uma vez que biofilmes evoluem de camadas únicas de células para camadas multicelulares com matriz intercelular,²³ os biofilmes dos DDMS, com idade superior a duzentos dias e em ambiente de difícil higienização, devem se apresentar como um agregado de células vivas e mortas de populações estáveis de bactérias, bem como grande quantidade de matriz extra-celular.

Além destas características, ao serem removidos, os biofilmes dos DDMS apresentavam-se endurecidos, sugerindo mineralização. Para explicar este fato, cabe entender como ocorre a formação deste biofilme. A partir do momento em que são cimentados, os DDMS são expostos à saliva. Na cavidade bucal, a película adquirida se adsorve a todas as superfícies expostas e sobre ela começa a adesão de bactérias.²³ A saliva contém proteínas que, quando imobilizadas em superfícies,

se comportam como iniciadores de mineralização, presumidamente por ligação a íons cálcio.²⁵ Uma vez que o fluxo salivar permite a maior formação de cálculo supra-gengival,²⁶ é de se esperar que o fato de os DDMS permanecerem fixos por tempo prolongado, favoreça a mineralização de seu biofilme.

Não foram encontrados na literatura estudos que relatassem as bactérias existentes nos biofilmes dos DDMS, dificultando comparação direta dos resultados deste trabalho. A quantidade média de estreptococos totais nos DDMS do Grupo Controle da presente pesquisa (7,30log) é superior àquela encontrada em biofilme dental de noventa e seis horas do sulco palatino de molares em macacos com alimentação rica em sacarose ($6,30 \pm 0,49 \log$),²⁴ e a de molares ($6,30 \pm 0,72 \log$) e incisivos ($6,10 \pm 0,96 \log$) superiores de humanos adultos antes de iniciarem um protocolo de seis meses de dois bochechos diários de clorexidina 0,12%.²⁷ Por outro lado, as contagens de estreptococos totais por miligrama de biofilme ($3,82 \times 10^7$ UFC/mg) foram muito inferiores às obtidas de pacientes um mês após a colocação de aparelho ortodôntico ($1,51 \times 10^{14}$ UFC/mg) e até mesmo às destes pacientes antes da montagem do aparelho ($5,20 \times 10^7$ UFC/mg).²⁸ Ao se compararem estes resultados, porém, deve-se considerar o tempo de formação do biofilme, a quantidade de matriz extra-celular e as dificuldades de higienização dos DDMS.

A clorexidina reduziu a contagem de estreptococos totais ($p < 0,01$). A diminuição em quase 1 log no Grupo Clorexidina (6,57log) em relação ao Grupo Controle (7,30log) é muito próxima da redução obtida, após 6 meses de utilização diária de dois bochechos de clorexidina 0,12%, na quantidade de estreptococos totais em molares ($6,04 \pm 1,00$) e incisivos ($6,19 \pm 1,10$).²⁷ Em biofilmes compostos por *Streptococcus sanguis* ou por várias espécies, a clorexidina pode reduzir a quantidade de estreptococos em 1 log já na primeira administração e em 3 log em

biofilmes em formação.²⁹ Contudo, as bactérias re-iniciam a colonização.²⁹ Essa redução pode ser menor ainda se, concomitantemente, houver consumo regular de carboidratos.³⁰ A realização de pulsos simuladores de bochecho por um ou cinco minutos não alteram a viabilidade do biofilme, que só é conseguida com uma hora de exposição à clorexidina.³¹

O fato de que divergências nos valores de massa de biofilmes do Grupo Clorexidina (168,88mg) e do Grupo Controle (182,03mg) foram ínfimas ($p=0,14$) parece concordar com o fato de que as bactérias mortas somente podem ser removidas por limpeza mecânica.¹⁸ Os resultados da presente pesquisa sugerem que a contigüidade da interface acrílico/mucosa palatal dos DDMS faz com que nem os bochechos sejam capazes de remover os estreptococos totais atingidos e os mortos pela clorexidina.

A clorexidina tem seu modo de ação relacionado com a adsorção à membrana celular das bactérias, causando danos à integridade intracelular, porém não sua lise.³² As características farmacológicas da clorexidina e a complexidade dos biofilmes dos DDMS explicam o fato de a redução das contagens dos estreptococos totais não ter sido maior. A retenção da clorexidina é diminuída com pH mais ácido.³³ Vroom et al³⁴ demonstraram que o pH de camadas mais profundas de biofilme é mais ácido que o das superficiais. Neste mesmo sentido, é sabido que a clorexidina possui ação limitada frente aos *S. mutans* e aos lactobacilos em biofilme, pois provavelmente não atinge aquelas células que se encontram mais profundamente.³⁵ Ainda, como já foi comentado, é muito provável que o biofilme dos DDMS possua quantidade considerável de íons minerais. Íons com carga positiva, como o cálcio, concorrem com sítios ativos para clorexidina e diminuem sua retenção.^{36,37,38}

As bactérias que se apresentam em biofilme tendem a se tornar mais resistentes que as mesmas na forma planctônica, provavelmente, devido a: 1) velocidade de crescimento celular mais lenta; 2) glicocálice que age como barreira física contra variações físico-químicas no meio circundante; ou 3) pela formação de um fenótipo que modifica a suscetibilidade a antimicrobianos.^{39,40,41} Mais especificamente em relação à clorexidina, sua difusão é prejudicada em biofilmes, somente atingindo camadas mais profundas após cinco minutos.⁴² Isso demonstra que provável redução na quantidade de estreptococos totais somente através de bochechos de clorexidina, mesmo com maior frequência ou mais tempo, não pode ser esperada.

A correlação não significativa entre a massa de biofilme e a quantidade de estreptococos totais, tanto no Grupo Clorexidina ($r=0,30$; $p>0,05$) quanto no Grupo Controle ($r=-0,11$; $p>0,05$), demonstra que os biofilmes dos DDMS são complexos e necessitam de estudos mais aprofundados. É esperado que os biofilmes desses aparelhos, da mesma forma que a placa bacteriana, sejam compostos por células, matriz extra-celular, espaços vazios e substrato.⁴³ O melhor entendimento de sua configuração tridimensional é essencial para desenvolver terapias mais eficientes.

Mais relevante que o risco de desenvolvimento de cárie e de doença periodontal, a remoção dos DDMS apresenta prevalência de 50% de bacteremia.¹¹ Não é possível afirmar se a redução estatisticamente significativa na contagens de estreptococos totais dos DDMS percebida no presente trabalho pode prevenir a ocorrência de bacteremia, pois ainda não há entendimento sobre a correlação entre bacteremia e densidade celular da microbiota presente no ambiente oral. A este respeito, as orientações da *American Heart Association*⁴⁴ não são claras, pois não incluem a remoção dos DDMS como procedimento com alto risco de bacteremia.

Espera-se que os resultados obtidos na presente pesquisa sirvam como base para a determinação de futuros protocolos que controlem o risco de cárie e doença periodontal, bem como previnam a bacteremia de maneira satisfatória. Esta informação será de grande valia para o tratamento de indivíduos com alto e moderado risco de endocardite infecciosa e que necessitem de maior efeito ortopédico em sua disjunção palatal.

CONCLUSÕES

No disjuntor dento-muco-suportado:

- a) O biofilme apresenta $3,82 \times 10^7$ UFC-ST/mg, massa de 182,04mg e não há correlação entre estas variáveis; e
- b) A clorexidina reduz a quantidade de estreptococos totais do biofilme ($6,77 \times 10^6$ UFC/mg) e não tem efeito sobre a massa de biofilme (168,88mg) nem sobre a falta de correlação entre quantidade de estreptococos totais e massa de biofilme.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho teve o apoio da CAPES, Brasil. Nós agradecemos à farmacêutica Rosimeire Takaki Rosa pela assistência na parte laboratorial e ao Prof. Dr. Sérgio Aparecido Ignácio pela assistência com a análise estatística.

REFERÊNCIAS

1. Oliveira NL, Silveira AC, Kusnoto B, Viana G. Three-dimensional assessment of morphologic changes of the maxilla: a comparison of 2 kinds of palatal expanders. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2004;126:354-362.
2. Garib DG, Henriques JFC, Janson G, Freitas MR, Fernandes AY. Periodontal effects of rapid maxillary expansion with tooth-tissue-borne and tooth-borne expanders: a computed tomography evaluation. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2006;129:749-758.
3. Anhoury P, Nathanson D, Hughes CV, Socransky S, Feres M, Chou LL. Microbial profile on metallic and ceramic bracket materials. *Angle Orthod* 2002;72:338-343.
4. Millett DT, Nunn JH, Welbury RR, Gordon PH. Decalcification in relation to brackets bonded with glass ionomer cement or a resin adhesive. *Angle Orthod* 1999;69:65-70.
5. Knoernschild KL, Rogers HM, Lefebvre CA, Fortson WM, Schuster GS. Endotoxin affinity for orthodontic brackets. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1999;115:634-639.
6. Weitman RT, Eames WB. Plaque accumulation on composite surfaces after various finishing procedures. *J Am Dent Assoc* 1975;91:101-106.
7. Zachrisson BU, Brobakken B. O. Clinical comparison of direct versus indirect bonding with different brackets types and adhesives. *Am J Orthod* 1978;74:62-78.
8. Gwinnet AJ, Ceen RF. Plaque distribution on bonded brackets: a scanning microscope study. *Am J Orthod* 1979;75:667-677.
9. Svanberg M, Ljunglöf S, Thilander B. *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis* in plaque from orthodontic bands and brackets. *Eur J Orthod* 1984;6:132-136.

10. Sukontapatipark W, El-Agroudi MA, Selliseth NJ, Thunold K, Selvig KA. Bacterial colonization associated with fixed orthodontic appliances: a scanning electron microscopy study. *Eur J Orthod* 2001;23:475-484.
11. Rosa EAR, Rached RN, Tanaka O, Fronza F, Fronza F, Assad RA. Preliminary investigation of bacteremia incidence after removal of the Haas palatal expander. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2005;127:64-66.
12. McLaughling JO, Coulter WA, Coffey A, Burden DJ. The incidence of bacteremia after orthodontic banding. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1996;109:639-644.
13. Erverdi N, Biren S, Kadir T, Özkan H, Acar A. Investigation of bacteremia following orthodontic banding. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1999;116:687-690.
14. Erverdi N, Biren S, Kadir T, Acar A. Investigation of bacteremia following orthodontic debanding. *Angle Orthod* 2000;70:11-14.
15. Haas AJ. Rapid expansion of the maxillary dental arch and nasal cavity by opening the midpalatal suture. *Angle Orthod* 1961;31:73-90.
16. Lang NP, Brex MC. Chlorhexidine digluconate – an agent for chemical plaque control and prevention of gingival inflammation. *J Periodont Res* 1986;21: Suppl 16:74-89.
17. Gehlen I, Netuschil L, Berg R, Reich E, Katsaros C. The influence of a 0.2% chlorhexidine mouthrinse on plaque regrowth in orthodontic patients: a randomized prospective study – part I: clinical parameters. *J Orofac Orthop* 2000;61:54-62.
18. Gehlen I, Netuschil L, Georg T, Reich E, Berg R, Katsaros C. The influence of a 0.2% chlorhexidine mouthrinse on plaque regrowth in orthodontic patients: a randomized prospective study – part II: bacteriological parameters. *J Orofac Orthop* 2000;61:138-148.

19. Erverdi N, Acar A, Isgüden B, Kadir T. Investigation of bacteremia after orthodontic banding and debanding following chlorhexidine mouth wash application. *Angle Orthod* 2001;71:190-194.
20. Silva Filho OG., Villas Boas MC, Capelozza Filho L. Rapid maxillary expansion in the primary and mixed dentitions: a cephalometric evaluation. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1991; 100:171-181.
21. Silva Filho OG, Montes LAP, Torelly LF. Rapid maxillary expansion in the deciduous and mixed dentition evaluated through posteroanterior cephalometric analysis. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1995; 107:268-275.
22. Haas AJ. Andrew J. Haas: interview. *R Dental Press Ortodon Ortop Facial* 2001;6:1-10.
23. Bowden GHW, Li YH. Nutritional influences on biofilm development. *Adv Dent Res* 1997;11:81-99.
24. Beighton D, Hayday H. the influence of diet on the growth of streptococcal bacteria on the molar teeth of monkeys (*Macaca fascicularis*). *Archs Oral Biol* 1986;31:449-454.
25. Nancollas GH, Johnsson MAS. Calculus formation and inhibition. *Adv Dent Res* 1994;8:307-311.
26. Jin Y, Yip HK. Supragingival calculus: formation and control. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002;13:426-441.
27. Briner WW, Grossman E, Buckner RY, Rebitski GF, Sox TE, Setser RE, Ebert ML. Effect of chlorhexidine gluconate mouthrinse on plaque bacteria. *J Periodont Res* 1986;21: Suppl 16:44-52.

28. Balenseifen JW, Madonia JV. Study of dental plaque in orthodontic patients. *J Dent Res* 1970;49:320-324.
29. Pratten J, Smith AW, Wilson M. Response of single species biofilmes and microcosm dental plaques to pulsing with chlorhexidine. *J Antimicrob Chemother* 1998;42:453-459.
30. Pratten J, Wilson M. Antimicrobial susceptibility and composition of microcosm dental plaques supplemented with sucrose. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:1595-1599.
31. Pratten J, Barnett P, Wilson M. Composition and susceptibility to chlorhexidine of multispecies biofilms of oral bacteria. *Appl Environ Microbiol* 1998;64:3515-3519.
32. Hennessey TD. Antibacterial properties of Hibitane. *J Clin Periodontol* 1977;4:36-48.
33. Bonesvoll P, Lökken P, Rølla G. Influence of concentration, time, temperature and pH on the retention of chlorhexidine in the human oral cavity after mouth rinses. *Archs Oral Biol* 1974;19:1025-1029.
34. Vroom JM, Grauw KJ, Gerritsen HC, Bradshaw DJ, Marsh PD, Watson GK, Birmingham JJ, Allison C. Depth penetration and detection of pH gradients in biofilms by two-photon excitation microscopy. *Appl Environ Microbiol* 1999;65:3502-3511.
35. Featherstone JDB. Delivery challenges for fluoride, chlorhexidine and xylitol. *BMC Oral Health* 2006;6:S8.
36. Rølla G, Melsen B. On the mechanism of the plaque inhibition by chlorhexidine. *J Dent Res* 1975;54(Spec Iss):B57-B62.
37. Bonesvoll P. Oral Pharmacology of chlorhexidine. *J Clin Periodontol* 1977;4:49-65.

38. Cummins D, Creeth JE. Delivery of antiplaque agents form dentifrices, gels, and mouthwashes. *J Dent Res* 1992;71:1439-1449.
39. Brown MRW, Allison DG, Gilbert P. Resistance of bacterial biofilms to antibiotics: a growth-rate related effect. *J Antimicrob Chemother* 1988;22:777-783.
40. Gilbert P, Collier PJ, Brown MRW. Influence of growth rate on susceptibility to antimicrobial agents: biofilms, cell cycle, dormancy, and stringent response. *Antimicrob Agents Chemother* 1990;34:1865-1868.
41. Gilbert P, Das J, Foley I. Biofilm susceptibility to antimicrobials. *Adv Dent Res* 1997;11:160-167.
42. Stewart PS. Diffusion in biofilms. *J Bacteriol* 2003;185:1485-1491.
43. Wood SR, Kirkham J, Marsh PD, Shore RC, Nattress B, Robinson C. Architecture of intact natural human plaque biofilms studied by confocal laser scanning microscopy. *J Dent Res* 2000;79:21-27.
44. Dajani AS, Taubert KA, Wilson W, Bolger AF, Bayer A, Ferrieri P, Gewitz MH, Shulman ST, Nouri S, Newburger JW, Hutto C, Pallasch TJ, Gage TW, Levison ME, Peter G, Zuccaro Jr G. Prevention of bacterial endocarditis. *Circulation* 1997;96:358-366.

LEGENDA DAS TABELAS

Tabela I. Características demográficas da amostra

Tabela II. Estatística descritiva de "Massa de Biofilme", "UFC-ST/mg de Biofilme" e "UFC-ST/mg de Biofilme" no Grupo Clorexidina

Tabela III. Estatística descritiva de "Massa de Biofilme", "UFC-ST/mg de Biofilme" e "UFC-ST/mg de Biofilme" no Grupo Controle

Tabela IV. Teste "U" de Mann-Whitney para comparação de "Massa de Biofilme", "UFC-ST/mg de Biofilme" e "UFC-ST/mg de Biofilme" entre grupos

TABELAS

Tabela I. Características demográficas da amostra

	<i>Clorexidina</i>	<i>Controle</i>
n	26	25
Gênero		
Masculino	11	8
Feminino	15	17
Idade (anos/meses)		
Média	10a03m	9a4m
Desvio-Padrão	2a03m	1a4m
Mediana	9a05m	9a6m
Mínimo	7a00m	7a5m
Máximo	15a10m	11a6m
Tempo de uso do disjuntor (dias)		
Média	209,35	200,28
Desvio-Padrão	86,06	106,30
Mediana	178,50	147,00
Mínimo	119,00	77,00
Máximo	405,00	421,00

Tabela II. Estatística descritiva de "Massa de Biofilme", "UFC-ST/mg de Biofilme" e "UFC-ST/mg de Biofilme" no Grupo Clorexidina

<i>Variáveis</i>	<i>n</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio-Padrão</i>	<i>Mediana</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>
Massa de Biofilme (mg)	26	168,8846	89,2649	145,0500	33,9000	419,4000
UFC-ST/mg de Biofilme	26	$6,7682 \times 10^6$	$7,7680 \times 10^6$	$4,1718 \times 10^6$	$6,4277 \times 10^5$	$3,1097 \times 10^7$
log(UFC-ST/mg de Biofilme)	26	6,5653	0,5075	6,6201	5,8081	7,4925

Tabela III. Estatística descritiva de "Massa de Biofilme", "UFC-ST/mg de Biofilme" e "UFC-ST/mg de Biofilme" no Grupo Controle

<i>Variáveis</i>	<i>n</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio-Padrão</i>	<i>Mediana</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>
Massa de Biofilme (mg)	25	182,0360	49,4263	166,3000	113,4000	296,9000
UFC-ST/mg de Biofilme	25	$3,8246 \times 10^7$	$4,7056 \times 10^7$	$1,4661 \times 10^7$	$3,6541 \times 10^7$	$1,5208 \times 10^7$
log(UFC-ST/mg de Biofilme)	25	7,3048	0,4840	7,1662	6,5628	8,1821

Tabela IV. Teste "U" de Mann-Whitney para comparação de "Massa de Biofilme", "UFC-ST/mg de Biofilme" e "UFC-ST/mg de Biofilme" entre grupos

<i>Variáveis</i>	<i>Clorexidina (n=26)</i>	<i>Controle (n=25)</i>	<i>Z</i>	<i>p</i>
	<i>Média dos Ranks</i>	<i>Média dos Ranks</i>		
Massa de Biofilme	23,0000	29,1200	-1,4697	0,1416
UFC-ST/mg de Biofilme	17,3462	35,0000	-4,2395	0,0000*
log(UFC-ST/mg de Biofilme)	17,3462	35,0000	-4,2395	0,0000*

NOTA: *Valores de $p < 0,05$ significam que há diferença estatística entre os grupos.

TERMO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Curitiba, 08 de fevereiro de 2006

Of. 011/06/CEP-PUCPR

Ref. "Avaliação dos efeitos da clorexidina na população de estreptococos totais formadores de biofilme no disjuntor palatal".

Prezado (a) Pesquisador (es),

Venho por meio deste informar a Vossa Senhoria que o Comitê de Ética em Pesquisa da PUCPR, no dia 08 de fevereiro do corrente ano aprovou o Projeto Intitulado "Avaliação dos efeitos da clorexidina na população de estreptococos totais formadores de biofilme no disjuntor palatal", pertencente ao Grupo III, sob o registro no CEP nº 941, e será encaminhado a CONEP para o devido cadastro. Lembro ao senhor (a) pesquisador (a) que é obrigatório encaminhar relatório anual parcial e relatório final a este CEP.

Atenciosamente,


Profª M. Sc Ana Cristina Miguez Ribeiro
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa - PUCPR

Ilma Sra.
Elisa Souza Camargo

DIREITOS AUTORAIS**TERMO DE CESSÃO DE DIREITOS AUTORAIS**

"Os autores abaixo-assinados transferem todos seus direitos autorais do trabalho 'Efeitos da clorexidina nos estreptococos totais formadores de biofilme do disjuntor palatal' à *American Association of Orthodontists* na hipótese do trabalho ser publicado. Os autores abaixo-assinados garantem que o artigo é original, não viola qualquer direito autoral ou outro direito de propriedade de qualquer terceiro, não foi submetido à avaliação de outro periódico, não foi publicado anteriormente, e inclui qualquer produto que possa derivar do periódico em que foi publicado, seja impresso ou em meio eletrônico. Nós assinamos e aceitamos a responsabilidade por ceder este material."

Ivan Toshio Maruo

Elisa Souza Camargo

Edvaldo Antonio Ribeiro Rosa

3 ANEXOS

ANEXO I – RESUMOS DOS ARTIGOS UTILIZADOS NA DISCUSSÃO

Disjunção palatal

Silva Filho *et al.*²⁰ avaliaram as alterações cefalométricas induzidas pelo aparelho tipo Haas, quando utilizado na dentição decídua e mista. A amostra foi composta por 30 crianças com idades entre 5 anos e 10 anos e 11 meses (média de 8 anos), com mordidas cruzadas posteriores de origem esquelética. Todos os casos foram tratados com expansão rápida da maxila com o aparelho tipo Haas com ativação de meia volta de manhã e meia volta à noite. O período de ativações foi de uma a duas semanas, dependendo do grau de constrição maxilar, até que a expansão atingisse uma sobrecorreção de 2 a 3mm nos molares. Concluíram que, em dentições decídua e mista: não se pode esperar que a expansão rápida da maxila cause deslocamento da maxila no sentido ântero-posterior; a maxila sempre se desloca para baixo, causando rotação para baixo e para trás do plano palatino; a mandíbula sofre uma rotação no sentido horário; as alturas faciais aumentam; e os molares de ancoragem acompanham o movimento da maxila.

O trabalho de Silva Filho *et al.*²¹ teve o propósito de avaliar as alterações cefalométricas, por meio de radiografias pósterio-anteriores, induzidas pelo aparelho tipo Haas, quando utilizado na dentição decídua e mista. A amostra foi composta por 32 crianças com idades entre 5 até 11 anos (média de 8 anos), com mordidas cruzadas posteriores de origem esquelética. Todos os casos foram tratados com expansão rápida da maxila com o aparelho tipo Haas modificado, com eliminação da conexão metálica por vestibular e substituição de bandas em caninos por uma extensão em forma de “C” da barra de conexão interna até a face vestibular deste dente. O protocolo de ativações foi de meia volta de manhã e meia volta à noite. O período de ativações foi de uma a 2 semanas, dependendo do grau de constrição

maxilar, até que a expansão atingisse sobrecorreção de 2 a 3mm nos molares. Concluiu-se que, em dentições decídua e mista: o efeito da expansão rápida da maxila é tanto ortopédico quanto ortodôntico; os incisivos centrais superiores refletem o efeito ortopédico, com as coroas respondendo menos que os ápices radiculares; a maxila se disjunta de maneira triangular com a abertura máxima ao nível de IP; e o aumento máximo conseguido na cavidade nasal corresponde a 43% do aumento obtido na região alveolar.

Em entrevista, Haas²² explica as vantagens da expansão rápida da maxila (ERM) com seu aparelho de máxima ancoragem, sua importância na estabilidade do tratamento, indicações e analisa as tendências da Ortodontia desde Angle até a atualidade, incluindo uma projeção para os 15 anos seguintes. Dentre os vários pontos abordados, afirma que as indicações para a ERM são: deficiências maxilares reais e relativas; estenose nasal grave; pseudo-Classe III e Classe III cirúrgica e não-cirúrgica; fissura de palato madura; problemas de comprimento de arcada em caso de bom padrão; onde o deslocamento anterior da maxila é desejável em casos de boa largura; e caso de mordida esquelética profunda para aumento vertical. Os protocolos de ajuste são: idade de 14 anos ou menos – 2 voltas ao dia, observação semanal, duração aproximada de 3 semanas, parafuso aberto de 12 a 16mm na estabilização, contenção por no mínimo 3 meses; idade de 15 a 18 anos – 1 volta ao dia, observação a cada 2 semanas, duração aproximada de 6 semanas, parafuso aberto de 12 a 16mm na estabilização, contenção por no mínimo 3 meses; idade de 18 a 25 anos – 1 volta por dia, observação cada 4 semanas, duração aproximada de 12 a 14 semanas, parafuso aberto de 12 a 14mm na estabilização, contenção por no mínimo 3 meses; idade de 25 anos até à senilidade – iniciar com uma volta todos os dias, mas ajustar a taxa de ativação conforme o conforto, ativação dia sim dia não,

observação a cada 6-8 semanas, duração aproximada de 28 a 40 semanas, parafuso aberto 12 a 14mm na estabilização, contenção por no mínimo 3 meses. Haas afirma que seu protocolo não se alterou desde seus trabalhos de 1961 e 1970 e, após a remoção do disjuntor, utiliza uma placa acrílica sem grampos por pelo menos um ano para a correção dos dentes de ancoragem. A mucosa palatal tolera bem se cuidados forem tomados para manter os blocos acrílicos confinados aos tecidos mais isquêmicos, localizados entre a região distal dos primeiros molares e a mesial dos primeiros pré-molares. A magnitude das forças utilizadas para ERM evitam a movimentação dentária fisiológica. Além disso, a maioria dos artigos na literatura que mostram recidiva após a ERM, utilizaram o disjuntor Hyrax e apresentaram ativação menor do que 8mm.

Microbiologia de biofilmes dentários

Balenseifen e Madonia²⁸ avaliaram as mudanças na placa bacteriana de pacientes ortodônticos através do estudo do pH, da quantidade de carboidrato e da população microbiana de estreptococos e lactobacilos. A amostra foi composta de 12 pacientes, entre 10 e 16 anos, da faculdade dos pesquisadores. A placa dental foi colhida antes da montagem e um mês depois da instalação de bandas e do arco. A placa inicial foi colhida após cinco minutos de escovação e sem que os pacientes se alimentassem no intervalo entre a escovação e a coleta. Os pacientes foram orientados a continuarem a realizar uma boa higiene oral por 5 minutos após as refeições. A placa foi removida utilizando-se uma cureta e, 5 minutos após, foi colocada em uma cápsula de gelatina pré-pesada. A massa de placa era obtida pela diferença entre a massa de gelatina antes e após a coleta. A placa e a cápsula de gelatina foram homogeneizadas e diluídas serialmente até 10^{-15} . Para contagem de

estreptococos, utilizou-se Ágar Mitis Salivarius, que foi incubado por 48h a 37°C. Os resultados foram comparados pelo teste “t” pareado. Dentre os seus resultados, constatou-se que os estreptococos, que foram os membros aeróbios em maior quantidade na placa inicial ($5,20 \times 10^7$ UFC/mg de placa), continuaram a ser os mais numerosos após a inserção do aparelho ($1,51 \times 10^{14}$ UFC/mg de placa). O aumento foi estatisticamente significativo ($p < 0,01$). Concluiu-se que, após a instalação do aparelho, o pH cai em 0,4 unidade, há um aumento de 0,01mg de carboidrato/mg de placa, um aumento de $9,8 \times 10^4$ lactobacilos/mg de placa e um aumento de $1,5 \times 10^{14}$ estreptococos totais/mg de placa ($1,8 \times 10^{10}$ de *S. salivarius* e $1,5 \times 10^{14}$ *S. mitis*).

O estudo de Beighton e Hayday²⁴ objetivou determinar a taxa de crescimento das espécies de estreptococos predominantes nos sulcos de molares em macacos. Um grupo de 20 macacos (idade 12 a 18 meses) recebeu metade de um sanduíche de manutenção (MS), metade de uma banana descascada e metade de um ovo descascado cozido por dia; outro de 6 macacos (idade de 12 a 18 meses) uma dieta comercial de macacos (Mazuri); e outro de 7 macacos adultos (idade de 5 a 7 anos) uma dieta altamente cariogênica (CHS). Todos os grupos se alimentaram com as referidas dietas por mais de 9 meses antes do início da pesquisa. Para a realização do trabalho, os animais foram anestesiados e a placa dentária do sulco palatino do primeiro molar superior esquerdo nos grupos MS e Mazuri e do sulco palatal do primeiro molar superior direito ou esquerdo no grupo CHS foi removida e examinada. Este sulcos possuíam um volume constante utilizado para o cálculo das bactérias. Todos os sulcos foram limpos com raspagem e esta placa foi descartada. Estes animais retornaram a suas jaulas e foram alimentados por 48 horas para avaliar as placas formadas no tempo zero; em seguida, com os dentes limpos, deixaram-se

passar 6 horas para próxima coleta; isto foi repetido nos tempos avaliados. Além disto, os animais MS e Mazuri foram privados de comida por 18 horas e sua placa avaliada para determinar os efeitos do jejum na quantidade de placa. Os estreptococos totais foram quantificados, bem como seus subgrupos, em logarítimos e as médias comparadas pelo teste “t” de *Student*, ANOVA a dois critérios e o teste de Duncan. Dentre seus resultados, a contagem de $\log(\text{média}) \pm \log(\text{desvio-padrão})$ de UFC de estreptococos totais foram feitas no grupo MS (0h: $3,81 \pm 0,60$, 6h: $4,44 \pm 0,64$, 18h: $5,59 \pm 0,56$, 24h: $5,52 \pm 0,38$, 42h: $5,74 \pm 0,49$ e 96h: $5,74 \pm 0,45$), no grupo Mazuri (0h: $2,87 \pm 0,41$, 6h: $3,10 \pm 1,59$, 18h: $4,44 \pm 0,93$, 24h: $4,55 \pm 0,57$, 42h: $4,63 \pm 0,66$ e 96h: $4,25 \pm 0,58$) e no grupo CHS (0h: $4,76 \pm 0,61$, 6h: $5,58 \pm 0,69$, 18h: $6,12 \pm 0,27$, 24h: $6,34 \pm 0,68$, 42h: $6,62 \pm 0,36$ e 96h: $6,30 \pm 0,49$). Concluiu-se que em todas as dietas, ocorre um número constante de bactérias depois de 18-24h de crescimento exponencial, sendo que a quantidade de estreptococos totais se estabilizou após as 18 horas em MS e Mazuri e 18-24 horas em CHS; e não há diferença na contagem de bactérias e no tempo de multiplicação entre o jejum e a placa de 18 horas.

Nancollas e Johnsson²⁵ realizaram uma análise crítica a respeito dos fatores termodinâmicos e cinéticos que determinam a formação, o desenvolvimento e a dissolução de depósitos duros, como cálculos dentários. Destaca-se que a saliva geralmente é supersaturada de material mineral, principalmente hidroxapatita, que favorece um ambiente que previne a dissolução das superfícies dentárias. Em pH neutro, a saliva é supersaturada também com fosfato de octacálcio e fosfato de diidrato de dicálcio. Muitas proteínas salivares são capazes de inibir a precipitação e dissolução dos minerais de fosfato de cálcio pela adsorção em receptores ativos das superfícies cristalinas. A carga negativa das proteínas salivares (principalmente

estaterina e proteína rica em prolina) permite que sejam imobilizadas a superfícies e ajam como iniciadoras de mineralização, provavelmente se ligando a íons cálcio. O cálculo dentário consiste em sais de fosfato de cálcio, que possuem sua formação muito mais influenciada pelo pH do que pela sua energia iônica. O pH da placa bacteriana (entre 5,5 e 6,5) é geralmente menor do que o da saliva e favorece a formação de precipitados minerais cristalizados, favorecendo o depósito de bactérias e de mais proteínas. As bactérias produzem ácidos e proteínas que também favorecem a mineralização. Os autores concluíram que as condições relacionadas à formação de cálculos sugerem o envolvimento de intermediários ácidos de fosfato de cálcio, com transformação parcial ou completa subsequente para depósitos mais estáveis termodinamicamente; que íons diversos do cálcio e do fosfato, bem como proteínas e macromoléculas influenciam o processo de transformação; e que fatores como as variações do pH e a força iônica influenciam o desenvolvimento de cálculo.

Bowden e Li²³ realizaram uma revisão sobre a literatura a respeito de biofilmes dentários, visto que a evolução de pesquisas a este respeito ocorreu também em estudos de biofilmes da natureza, da medicina e da indústria. Enquanto os biofilmes na natureza se desenvolvem sob condições de escassez de nutrientes e com grande volume de bactérias em forma planctônica, biofilmes orais possuem ambiente diverso. Estudos demonstraram que o desenvolvimento de biofilmes segue estágios similares na natureza e *in vitro*, que são: 1) aderência de células a determinada superfície; 2) rápida divisão e crescimento das células aderentes; e 3) um platô de acumulação. Em ambientes com uma ampla mistura de floras planctônicas, a composição final do biofilme reflete o resultado da sucessão bacteriana, resultante da competição entre os microrganismos aderidos. Isto é evidente quando se considera que a geração de matriz polimérica de biofilmes feita

pelas bactérias orais pode não só aumentar sua competitividade, mas também servir como suporte para outros organismos. Biofilmes imaturos possuem células mais simples, que se dividem mais rápido e produzem menos matriz extracelular. Já os biofilmes maduros possuem mais camadas, grande quantidade de matriz extracelular e são mais complexos, fornecendo um ambiente distinto daquele associado à forma planctônica das bactérias, bem como tornando-o mais resistentes a agentes danosos (por exemplo, antibióticos). Biofilmes maduros multi-específicos representam um consórcio em que o metabolismo interativo de nutrientes não podem ser facilmente previstos. O “ambiente do biofilme maduro” garante a retenção das células dentro de um *habitat* independente das influências diretas e indiretas do meio circundante e a matriz estabiliza o biofilme sobre a superfície e suporta as células da comunidade bacteriana. Concluíram que um entendimento mais completo da formação do biofilme e, mais particularmente, das atividades das células do biofilme em consórcio, pode levar ao desenvolvimento de novos meios de controlar doenças do ambiente bucal.

Vroom *et al.*³⁴ realizaram um estudo para analisar o potencial da microscopia de excitação difotônica (TPE) em imagens de biofilme profundo desenvolvido *in vitro*, comparando-o com a microscopia de *laser* confocal (CLSM), e a resposta do pH do biofilme seguindo o uso de sacarose. Uma cultura mista de 10 bactérias orais foi cultivada em um sistema quemostato, que foi utilizado para inocular um fermentador de filme de profundidade constante por 24h à 50mL/h. Um meio de cultura com base em mucina foi utilizado para os biofilmes durante 10 ou 11 dias, os biofilmes foram removidos e mensurados utilizando tanto por TPE quanto por CLSM. O pH dos biofilmes foi mensurado em diferentes profundidades através de fluorescência. Dentre seus resultados, antes da aplicação de sacarose, o pH do biofilme era de

aproximadamente 6,8; 6,2; e 6,4 para as profundidades de 5, 35 e 70 μm , respectivamente. Após 70 minutos de exposição a um bochecho simulado de sacarose, o pH a 35 μm (pH 5,6) e 70 μm (pH 5,6) foram significativamente menores que a 5 μm (pH 6,2). Concluiu-se que o TPE possui melhor contraste que o CLSM e, quando utilizado, deve ser usada a imagem de fluorescência para determinar o pH.

Jin e Yip²⁶ realizaram uma revisão crítica sobre o cálculo dentário. Destaca-se que o cálculo dental é composto por material inorgânico e matriz orgânica, sendo sempre coberto por uma camada de microrganismos (filamentosos no cálculo supragengival e uma mistura de cocos, bastonetes e filamentosos no subgengival). Entre a camada de microrganismos há áreas de calcificação. A formação de depósitos minerais inicia-se na matriz da placa e gradualmente alguns microrganismos se tornam calcificados a medida que o cálculo amadurece. Após os dentes irromperem ou ser realizada uma profilaxia, proteínas salivares rápida e seletivamente adsorvem sobre a superfície do esmalte para formar a película adquirida, seguido pela aderência de vários microrganismos (inicialmente Gram-positivos e, posteriormente, bactérias filamentosas), que formam a placa bacteriana. Esta placa absorve o cálcio e o fosfato da saliva para formar o cálculo supragengival ou o fluido crevicular para formar o cálculo subgengival. A saliva não é bem distribuída na cavidade bucal e maior quantidade de cálculo supragengival ocorre em regiões com maior exposição salivar, como a região vestibular dos molares superiores (próximos aos ductos das glândulas parótidas) e lingual dos incisivos inferiores (próximos aos ductos das glândulas sublinguais). As proteínas salivares possuem papel importante na aderência dos microrganismos da placa bacteriana. A mineralização dos microrganismos é generalizada, ocorrendo inclusive em bactérias acidogênicas, em microrganismos mortos, vivos e degenerados. Concluíram que os

avanços no entendimento sobre como ocorre a formação do cálculo dental, bem como a influência dos iniciadores e dos promotores químicos, auxiliarão no desenvolvimento de agentes que previnam sua formação.

O objetivo do estudo de Wood *et al.*⁴³ foi utilizar a microscopia confocal para determinar a estrutura de biofilmes da placa dentária humana natural e intacta, formada sobre substrato de esmalte. Oito voluntários utilizaram, colados na superfície vestibular de seus primeiros ou segundos molares superiores, dois dispositivos com esmalte dentário criados por Robison *et al.* (1997) para desenvolver biofilme dental naturalmente. Os voluntários continuaram com seus hábitos normais de higiene, utilizaram o dispositivo por 4 dias e, após removidos, os dispositivos foram armazenados em fluidos de transporte e era escaneada a sua imagem por um microscópio a *laser* confocal sem preparação prévia. Os biofilmes foram avaliados com secções de 1,5µm de espessura a intervalos de 0,5µm. Dentre seus resultados, os 16 dispositivos apresentaram evidência de formação de placa, cuja quantidade teve grande variação entre os indivíduos. Agregados celulares pequenos e grandes, separados por áreas que devem ser canais de passagem dos fluidos, foram visualizados sobre o esmalte. Alguns canais penetravam por toda a profundidade da placa, criando colunas de agregados de bactéria e matriz. O tamanho e a distribuição de todas as estruturas resultaram em estruturas com forma de cogumelo. Concluíram que a presença de canais na placa dental pode ser importante para a movimentação de ácidos, toxinas bacterianas e outros antígenos, bem como para o acesso de substâncias terapêuticas a alvos desejados dentro do biofilme.

Bacteremia e endocardite infecciosa em procedimentos ortodônticos

Em 1997, Dajani *et al.*⁴⁴ se propuseram a atualizar as recomendações da *American Heart Association* publicadas em 1990, no que diz respeito à prevenção da endocardite infecciosa em indivíduos com risco de desenvolver esta doença. Isto foi realizado através da análise da literatura relevante a respeito dos procedimentos relacionados à endocardite, suscetibilidade *in vitro* dos agentes bacterianos capazes de causar esta doença, resultados de estudos profiláticos em modelos animais e análises retrospectivas a respeito dos protocolos e falhas de profilaxia antibiótica. Dentre seus resultados, destaca-se que atualmente não há ensaio clínico randomizado em humanos com problemas cardíacos para estabelecer definitivamente que a profilaxia antibiótica ofereça proteção contra o desenvolvimento de endocardite durante procedimentos que possam causar bacteremia. Por isso, uma atitude coerente é considerar o grau de risco do paciente e do procedimento, os possíveis efeitos colaterais dos antibióticos e o custo-benefício do regime profilático recomendado. Este estudo não substitui o julgamento clínico do profissional. Os pacientes são classificados em “alto risco”, “risco moderado” e “risco negligenciável”. A profilaxia antibiótica só é recomendada nos pacientes de alto e moderado risco ao realizarem procedimento com risco de causar bacteremia considerável. A bacteremia ocorre durante atividades diárias como escovação dos dentes e mastigação. Os procedimentos odontológicos apresentam risco de bacteremia em pacientes com higiene dental deficiente e infecções periodontais ou periapicais. Os estreptococos viridans são muito relacionados à endocardite infecciosa. O uso de antissépticos orais pode reduzir a incidência e a magnitude de bacteremia. A recomendação é de um bochecho de 30 segundos com 15mL de clorexidina antes do procedimento. A profilaxia é recomendada para a

instalação de bandas, mas não para a colagem de *brackets* ou ajuste do aparelho. Concluíram que as maiores mudanças nas recomendações são: 1) ênfase que a maioria dos casos de endocardite não são atribuídos a procedimento invasivo; 2) condições cardíacas são classificadas em categorias de risco alto, moderado e negligenciável, baseados no potencial de desenvolvimento de endocardite; 3) procedimentos que podem causar bacteremia e para os quais a profilaxia antibiótica é recomendada são mais claramente especificados; 4) um algoritmo foi desenvolvido para definir mais claramente quando a profilaxia é recomendada para pacientes com prolapso da válvula mitral; 5) para procedimentos odontológicos, a dose inicial de amoxicilina é reduzida para 2g, uma dose de antibiótico no acompanhamento não é mais recomendada, a eritromicina não é mais recomendada para indivíduos alérgicos a penicilina, mas a clindamicina e outras alternativas são oferecidas; e 6) para os procedimentos gastro-intestinais ou genito-urinários, os regimes profiláticos são simplificados.

Rosa *et al.*¹¹ investigaram a bacteremia transitória imediatamente após a remoção do disjuntor palatal do tipo Haas de 8 pacientes (idade média de 18,5±3,9 anos, idades de 11 a 24 anos) de ambos os gêneros, com mordida cruzada posterior e que utilizaram o disjuntor de 120 a 140 dias de acordo com seus planos de tratamento. Nenhum deles relatou o consumo de antibióticos 3 meses antes do estudo e foram instruídos a não escovar os dentes duas horas antes da sessão de remoção do aparelho. Imediatamente antes da remoção, uma amostra de 10mL de sangue foi colhida. Após 3 minutos da remoção do disjuntor pelo mesmo ortodontista experiente, uma segunda amostra de 10mL de sangue foi colhida. As amostras foram inoculadas em meio de cultura Hemoprov III e incubados a 35°C, 10% pCO₂, por 14 dias. Em caso de suspeita de crescimento positivo, as culturas foram

confirmadas em ágar sangue (aeróbio) e ágar sangue suplementado com 0,0005% hemina e 0,00005 menadiona (anaeróbio) por 37°C por até 7 dias. A coloração de Gram foi usada para distinguir a morfologia das bactérias. Não houve crescimento bacteriano nas amostras tomadas antes da remoção do disjuntor. Das amostras de sangue após a remoção do aparelho, a amostra de duas pessoas apresentaram crescimento bacteriano no terceiro dia; de uma no quarto; e de outra no quinto dia. Como as subculturas em ágar sangue confirmaram que o tipo hemolítico predominante era alfa para todas as colônias desenvolvidas, 3 de 5 colônias por placa foram escolhidas randomizadamente. Sua bacterioscopia demonstrou células esféricas organizadas em formas típicas de estreptococos com reação de coloração Gram-positivo. Testes bioquímicos subsequentes demonstraram que todas as colônias isoladas foram de *Streptococcus oralis*. Concluiu-se que: 1) a remoção do disjuntor palatal tipo Haas é um ato traumático que pode produzir bacteremia; 2) os agentes microbianos isolados do sangue periférico de pacientes tratados com este aparelho foram estreptococos viridans, que estão relacionados com endocardite em pacientes com problemas na válvula cardíaca; e 3) o ortodontista deve considerar a possibilidade de indução de bacteremia em pacientes de risco e agir profilaticamente.

Clorexidina

Bonesvoll *et al.*³³ verificaram a retenção da clorexidina na cavidade oral quando ocorrem variações no período de bochecho, concentração da substância, temperatura e pH. Cinco funcionários da clínica odontológica com idade de 30 a 45 anos e dentição completa participaram da pesquisa, realizando os bochechos 2h após o café da manhã e com um intervalo de pelo menos uma semana para a

realização de cada experimento. Todos os funcionários fizeram o bochecho com 10mL das soluções testadas, por 1min; expectoraram o fluido no copo que continha a solução; e, após 10s, 3 bochechos de 1min com 10mL de água deionizada seguidos por intervalos de 10s. Todas as soluções eram especiais com 0,05 μCi [^{14}C]-clorexidina e 1 μCi [^{51}Cr]-EDTA/10mL. Sempre foi calculada a retenção oral, pela diferença da retenção total e a quantidade engolida. A retenção total foi calculada da diferença entre a atividade da ^{14}C original e a recuperada a cada expectoração; e a quantidade engolida pela quantidade de ^{51}Cr não recuperada a cada expectoração. As variáveis avaliadas foram: concentração (0,05%, 0,1%, 0,2% e 0,4%); período de bochecho (15s, 30s e 60s, avaliados nas soluções a 0,1 e 0,2%); temperatura (60°C e temperatura ambiente na solução a 0,1%); e pH (1,5; 3,0; 6,4; e 9,0). Dentre seus resultados, a quantidade média de clorexidina mantida na cavidade oral variou de 1,8mg na solução de 0,05% até 10,5mg na solução de 0,4%; a retenção foi proporcional à concentração de clorexidina; e a quantidade de clorexidina liberada foi praticamente constante em todas as concentrações. Quanto ao tempo de bochecho, aproximadamente metade da clorexidina aderida nos 60 segundos de bochecho foi retida dentro dos primeiros 15 segundos e, ainda, a retenção média após 15s de bochecho com a solução de 0,2% foi aproximadamente o mesmo que 1min de bochecho com a solução a 0,1%. A variação inter-individual foi grande. A mesma retenção ocorreu com as duas temperaturas avaliadas e menos da metade da quantidade de substância retida ocorre quando se passa de pH 6,4 para pH 1,5 e 3,0, não havendo diferença entre pH 6,4 e pH 9,0. Concluíram que a quantidade de clorexidina retida na cavidade oral aumenta proporcionalmente com a concentração da substância no bochecho; aproximadamente metade da clorexidina retida depois de um bochecho de 60s é retida dentro dos primeiros 15 s e

aproximadamente 75% nos primeiros 30s; a quantidade de clorexidina; o aumento de temperatura tem pouco efeito sobre a retenção; e a quantidade de clorexidina liberada reduz com o pH mais baixo.

Rölla e Melsen³⁶ estudaram a interação *in vitro* da clorexidina com os grupos carboxila, sulfato e fosfato, inclusive com fatores que poderiam interferir com estas interações. Dois mililitros de material iônico de clorexidina e diferentes concentrações de cátions ou outros potenciais inibidores foram incubados por uma hora à temperatura ambiente e centrifugados por 10min a 3000x. Dentre seus resultados, encontraram que a clorexidina se ligou fortemente a materiais aniônicos, enquanto não foi observada ligação à material catiônico; a clorexidina ligada se soltou imediatamente a pH 1; a presença de até 30% de uréia não interferiu com a ligação da clorexidina aos grupos carboxila, sulfato ou fosfato. Os íons Ba^{2+} , Ca^{2+} e Cd^{2+} interferiram na ligação da clorexidina a todos os grupos ácidos. Concluíram que a clorexidina é ligada aos grupos ácidos e que cátions divalentes podem deslocar a clorexidina dos grupos fosfato e carboxila. A partir destas conclusões, os autores sugeriram que o efeito inibitório da clorexidina pode ser explicado pelo seguinte mecanismo: 1) o número de bactérias na saliva disponível para adsorção aos dentes é significativamente reduzido; 2) bloqueio dos grupos ácidos nas glicoproteínas salivares reduzem a adsorção das proteínas às superfícies dentárias; 3) através da ligação à superfície das bactérias salivares, uma interferência com o mecanismo com o qual as bactérias se ligam aos dentes pode ser imaginado; e 4) precipitação de fatores de aglutinação ácidos na saliva e deslocamento do cálcio que está envolvido na aderência da placa.

Bonesvoll³⁷ abordou os fatores que afetam a ligação e o efeito inibitório da placa da clorexidina na cavidade bucal. Dentre seus resultados, destaca-se que a

retenção oral de um bochecho de clorexidina 0,2% é de 30%. Em um período de bochecho de 60s, 55% da retenção ocorre já nos primeiros 15s. Quando o pH é de 1,5 ou de 3,0, a retenção oral é muito diminuída. Substâncias presentes na placa que permitem a ligação da clorexidina *in vitro* são: microrganismos, polissacarídeos extracelulares e proteínas salivares. O aumento da retenção oral pode ser conseguido com aumento do número de bochechos. O manchamento pode ser inibido pelo uso de fio dental e escovação concomitante aos bochechos. Existe competição entre cálcio e clorexidina por um ou mais receptores na cavidade bucal. Concluiu que 1) cerca de um terço da clorexidina é retida após um bochecho de 1min; 2) a variação inter-individual é grande, enquanto a variação intra-individual é pequena; 3) cerca de 40% de um gel de clorexidina é retido depois da escovação; 4) a concentração na saliva depois do bochecho, escovação e adsorção a próteses totais mostra que há queda durante as primeiras horas, seguida por baixa liberação, com atividade ainda presente depois de 24h; 5) há certa correlação linear entre concentração e a retenção na área testada; 6) a ligação é mais rápida no começo do período do bochecho; 7) a retenção e o efeito clínico são reduzidos quando o pH da solução de bochecho é diminuído; 8) aumento da energia iônica causa aumento da liberação; 9) os dentes não têm influência importante na retenção; 10) Próteses totais superiores com saliva, depois de 15min de imersão, possuem quantidades de ligação comparáveis a 1min de bochecho; 11) Múltiplos bochechos aumentam a retenção; 12) a inibição de placa está relacionada com a quantidade retida; 13) o cálcio reduz a retenção e aumenta a liberação; 14) dodecil sulfato de sódio reduz tanto a retenção quanto a inibição de placa; e 15) maior número de bochechos com amônio quaternário possuem efeito similar na inibição de placa quando comparado à clorexidina.

Hennessey³² analisou as características principais da interação da clorexidina que levam à morte das bactérias, quais sejam: adsorção, dano a barreiras de permeabilidade e precipitação do citoplasma. Destaca-se que, inicialmente, a clorexidina adsorve à célula, pela sua carga negativa, chegando da parede celular até a membrana celular. A integridade da membrana celular é violada, causando vazamento e precipitação dos componentes intracelulares. A clorexidina não causa a lise das células como fazem a penicilina e antissépticos como o hipoclorito. Não há relação necessária entre os efeitos bacteriostáticos e bactericidas. A clorexidina é capaz de reduzir de 30 a 50% no número de bactérias salivares sem produzir mudanças detectáveis nas populações bacterianas. Concluiu que seus resultados indicam que a resistência das bactérias a clorexidina não é um problema clínico relevante.

O estudo de Briner *et al.*²⁷ teve o propósito de reportar as mudanças numéricas em determinadas bactérias da placa em pacientes que utilizaram um bochecho de clorexidina a 0,12%. Uma amostra foi composta de 40 voluntários selecionados do grupo que utilizava clorexidina (índice de placa de 1,5) e 40 do que utilizava placebo (índice de placa 1,6), de 430 adultos sem doença periodontal e com boa higiene bucal. Os pacientes realizaram um bochecho de 30s com 15mL de gluconato de clorexidina a 0,12% (CX) ou de uma solução placebo (PB), respectivamente. Durante o período da pesquisa eles seguiram sua rotina normal de higiene bucal. Depois de 6 meses de pesquisa, os voluntários continuaram higienizando os dentes normalmente, sem a clorexidina, por 3 meses. As amostras de placa foram coletadas dos segundos molares e dos incisivos centrais inferiores direitos e esquerdos em uma consulta controle e, em seguida, os voluntários foram submetidos à profilaxia. Apenas as placas dos molares e dos incisivos direitos foram

coletadas novamente depois de 3 e 6 meses de uso do bochecho. Ao final do período pós-tratamento, a placa foi coletada de todos os dentes. A placa do lado esquerdo foi deixada intacta entre o controle e o pré-tratamento para garantir que o re-crescimento da placa não mudasse o ecossistema bacteriano. Cada amostra de placa era colocada em um fluido de transporte, disperso em tubos plásticos e eram cultivadas as seguintes bactérias: aeróbios totais e anaeróbios totais. Estreptococos, actinomicetes, fusobactérias, neisseria e alguns patógenos oportunistas, em seus meios apropriados. Os dados foram transformados em logaritmo e utilizou-se o teste não-paramétrico de Wilcoxon. Dentre seus resultados, o controle não teve diferença estatisticamente significativa entre o PB e CX. Houve reduções significantes nestas populações com 3 meses e com 6 meses. Depois de 3 meses em que o uso da CX foi suspenso, os números aumentaram e não houve diferença entre o grupo PB e CX. Quanto aos estreptococos totais em log (UFC(média±dp)) no lado direito: PB – 2º molar controle (6,24±0,82); 3 meses (6,46±0,90); 6 meses (6,71±0,58); 3 meses pós-tratamento (6,57±0,71); CX – 2º molar controle (6,30±0,72); 3 meses (5,99±1,10); 6 meses (6,04±1,00); 3 meses pós-tratamento (6,50±0,63); PB – incisivo controle (6,35±0,84); 3 meses (6,40±0,86); 6 meses (6,45±0,66); 3 meses pós-tratamento (6,69±0,76); CX – incisivo controle (6,10±0,96); 3 meses (6,05±1,40); 6 meses (6,19±1,10); 3 meses pós-tratamento (6,67±0,67). Quanto ao lado esquerdo: PB – 2º molar controle (6,26±0,92); 3 meses pós-tratamento (6,57±0,58); CX – 2º molar controle (6,32±0,78); 3 meses pós-tratamento (6,22±0,94); PB – incisivo controle (6,39±0,69); 3 meses pós-tratamento (6,65±0,76); CX – incisivo controle (6,03±1,10); 3 meses pós-tratamento (6,42±0,70). Durante todo o período pesquisado, não houve mudanças no ecossistema bacteriano (mesmas proporções de bactérias).

Brown *et al.*³⁹, através de análise crítica de várias pesquisas, evidenciaram as razões para a resistência de biofilmes a agentes bacterianos. Destaca-se que é bem documentado que várias infecções crônicas, particularmente aquelas que envolvem implantes médicos e dispositivos protéticos, envolvem um consórcio de bactérias que crescem como um biofilme aderente. Assim, o glicocálix exerce uma função homeostática e minimiza as consequências de flutuações no meio ambiente. Por isso, as populações do biofilme possuem muitas propriedades importantes distintas de seus equivalentes planctônicos e contribuem para sua sobrevivência dentro do hospedeiro infectado. As células dentro de biofilmes possuem um crescimento mais lento do que as formas planctônicas e, uma vez que a taxa de crescimento é o modulador principal da atividade dos antibióticos, muitos biofilmes são mais resistentes a antibióticos. A ação de antissépticos pode ser alterada em até 1000 vezes pela taxa de crescimento e limitações de nutrientes. Concluiu-se que os pesquisadores de substâncias antimicrobianas devem ter consciência de todos estes fatos.

O estudo de Gilbert *et al.*⁴⁰ objetivou fazer uma revisão sobre a literatura pertinente no que diz respeito à resistência de biofilmes bacterianos a antibióticos. Destaca-se que muitas infecções crônicas, particularmente aquelas que envolvem implantes médicos e dispositivos protéticos, envolvem um consórcio de bactérias que crescem como um biofilme aderente dentro de glicocálices polissacarídeos mais extensos. O glicocálix, agindo como uma barreira, isola as células de flutuações no meio ambiente circundante. Por isso, as propriedades fisiológicas de populações de biofilme sésil são distintas de seus correspondentes planctônicos. Diferenças na taxa de crescimento também são indicativos de possíveis causas de mudança de suscetibilidade e, para algumas drogas são mais importantes do que mudanças da

propriedades de glicocálix. Concluiu-se que microrganismos possuem várias formas de resistir a agentes agressores, como períodos de latência, diminuição da velocidade de seu ciclo celular e mudanças em seu glicocálix.

Os objetivos de Cummins e Creeth³⁸ foram: 1) resumir brevemente as principais propriedades biológicas de agentes antiplaca; 2) discutir os princípios que governam a liberação e depuração de agentes antiplaca e as propriedades dos dentifrícios relacionadas ao seu papel como veículos de liberação; 3) revisar a substantividade e as informações clínicas para agentes antiplaca específicos; e 4) identificar as rotas genéricas para melhorar a eficácia dos agentes antiplaca e revisar a evidência de sua efetividade *in vivo*. Dentre seus resultados, a literatura mostra que a clorexidina possui grande adsorção aos tecidos bucais, que age como reservatório para liberação lenta do agente. Sua ligação e liberação são altamente dependentes do pH, alcançando seu nível máximo em pH de 7 a 9. Íons cálcio fazem supressão da retenção oral, consistente com a ligação eletrostática da clorexidina aos grupos de ácidos carboxílicos das moléculas de proteína e glicoproteína. Os tecidos bucais são as estruturas mais importantes para a retenção total da clorexidina, liberando-a de maneira lenta para a saliva e para a própria placa bacteriana. Concluíram que os dados da atualidade demonstram que a retenção bucal total, perfis de salivares e concentrações do agente na placa, película dos dentes e mucosa oral não são parâmetros para a atividade biológica *in vivo*, sendo apenas indicadores do seu potencial. Apesar de serem mais difíceis de mensurar, o melhor parâmetro para efetividade clínica é uma atividade aumentada no local ou nos locais de ação biológica, ao longo do tempo em que o agente fica na cavidade bucal.

Gilbert *et al.*⁴¹ discutiram as razões para diminuição da suscetibilidade de biofilmes a antibióticos. Destacaram que biofilmes microbianos, em que organismos estão intimamente associados uns com os outros ou com um substrato sólido através de ligação e inclusão dentro de uma matriz polimérica, são distribuídos na natureza e em doenças. A organização de microrganismos em biofilmes confere propriedades que não são evidentes em espécies individuais que crescem independentes ou como populações planctônicas em meio líquido. Infecções causadas por biofilme, como as associadas a dispositivos médicos, são geralmente crônicas e são fontes de bacteremia. Enquanto as bacteremias são tratadas por prescrição de rotina de antibióticos, os biofilmes que a geram apresentam grande resistência e geralmente não respondem a antibióticos fortes. A redução nas taxas de crescimento é devida à privação de oxigênio dentro do biofilme. Os exopolímeros possuem função de aderir o biofilme a alguma superfície; de proteger as células de seu interior de entidades fagocitárias, como leucócitos ou protozoários; e de restringir a difusão de agentes do meio. Existe ainda a possibilidade de as bactérias poderem sentir a presença de uma superfície em que podem se fixar e, como consequência, ativar genes/operons para conferir um fenótipo de ligação-específica (isto também pode ser uma manifestação físico-química à proximidade da superfície) que possua uma susceptibilidade alterada a antimicrobianos. Concluiu-se que os principais mecanismos associados à resistência aumentada de biofilmes são: 1) disponibilidade de nutrientes modificada e supressão da taxa de crescimento dentro do biofilme; 2) interação direta entre as matrizes exopoliméricas e suas constituintes, afetando a difusão e disponibilidade de antimicrobianos; e 3) o desenvolvimento de fenótipos de biofilme/ligação-específica.

O objetivo do trabalho de Pratten *et al.*²⁹ foi determinar *in vitro* o efeito de pulsos de gluconato de clorexidina a concentrações comumente utilizadas em bochechos nos biofilmes de *Streptococcus sanguis* e nas placas dentais com múltiplos microrganismos. Utilizaram-se um biofilme de *S. Sanguis* NCTC 10904 e outro desenvolvido da saliva de 10 indivíduos. Os biofilmes foram cultivados sobre um disco de esmalte de dente bovino em um fermentador de filme de profundidade constante. Os pulsos de clorexidina foram feitos duas vezes ao dia (9:00h e 17:00h), por 1min, com 10mL de gluconato de clorexidina a 0,05 ou 0,2% e só começaram quando o biofilme se estabilizou. Também foi testada a exposição inicial do disco à clorexidina e a posterior formação do biofilme. As bactérias avaliadas foram cultivadas de maneira apropriada e ainda foi avaliada a vitalidade das células. Dentre os resultados, no biofilme de *S. sanguis*, o pulso inicial de clorexidina a 0,2%, depois de 120h, produziu uma redução de 99,7% do número de bactérias viáveis e isto foi seguido de um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) nas 24h seguintes, mas a contagem de células vivas 216 horas depois foi menor que antes de se iniciar os bochechos. Já no biofilme de múltiplas espécies, ao atingir estabilidade, havia 25% de estreptococos e, após o primeiro pulso com clorexidina a 0,2%, houve uma redução de 1 log nas bactérias viáveis. Depois deste pulso, a contagem de aeróbios se recuperou e, ao chegar a 240h, não havia diferença entre as contagens iniciais. Os estreptococos pareciam mais suscetíveis que as outras bactérias. Quando a aplicação de clorexidina era feita nos discos antes da inoculação do biofilme, depois do pulso inicial, havia uma redução de 3 log nos aeróbios, anaeróbios e estreptococos. Depois de 56h, os aeróbios totais, anaeróbios totais e estreptococos totais se recuperaram a níveis similares àqueles antes do tratamento. Concluiu-se que, independentemente da natureza do biofilme, o pulso

inicial consegue uma ação bactericida substantiva, mas a viabilidade dos biofilmes aumenta subsequente, mesmo que se continue pulsando; e a clorexidina foi efetiva em reduzir a viabilidade de placas com várias espécies quando foi aplicada ao substrato antes da exposição à bactéria e com realização de pulso subsequente no biofilme.

O trabalho *in vitro* de Pratten *et al.*³¹ teve o objetivo de promover o crescimento de biofilmes de múltiplas espécies, compostos por bactérias normalmente encontradas na placa supragengival e determinar suas composições e susceptibilidades ao gluconato de clorexidina. Os organismos estudados foram *Streptococcus sanguis* NCTC 10904, *S. mutans* NCTC 10449, *S. oralis* NCTC 11427, *Actinomyces naeslundii* NCTC 10951, *Neisseria subflava* ATCC A1078 e *Veillonella dispar* NCTC 11831. Os biofilmes foram cultivados sobre discos de esmalte bovino em um fermentador de filme de profundidade constante. As bactérias entravam em contato com o disco através de suspensões. As amostras foram recolhidas diariamente e era feita a contagem das bactérias de maneira apropriada. Também foi avaliada a viabilidade das células. As amostras foram expostas à solução de gluconato de clorexidina a 0,2% por 1, 5 e 60min. Dentre seus resultados, o total de bactérias viáveis atingiu seu ponto máximo em 24h e a densidade de células viáveis neste ponto foi de 10^8 UFC/mm², com os estreptococos sendo os organismos prevalentes. A exposição à clorexidina por 1 ou 5min não teve efeito estatisticamente significativo na viabilidade de qualquer das espécies de biofilme, porém uma exposição de 60min resultou na morte estatisticamente significativa de todos os organismos, sendo os *S. sanguis* os mais suscetíveis, com redução de 5 log. Concluíram que a exposição à clorexidina a 0,2% por até 5 minutos tem pouco efeito na viabilidade do biofilme.

Pratten *et al.*³⁰ realizaram estudo *in vitro*, o qual objetivou avaliar os efeitos de pulsos de clorexidina na viabilidade e composição de biofilmes formados por múltiplas espécies suplementados com sucrose. A saliva de 10 indivíduos foi usada para fornecer o biofilme de múltiplas espécies. Os biofilmes cresceram sobre um disco de esmalte bovino em um fermentador de filme de profundidade constante. Na maioria dos experimentos, sucrose a 10% era aplicada sobre os biofilmes por 30min três vezes ao dia (9:00h, 13:00h e 17:00h). Dez mL de gluconato de clorexidina a 0,2% eram aplicados por 1min duas vezes ao dia (9:00h e 17:00h). Amostras de biofilme eram recolhidas e cultivadas de maneira apropriada, era avaliada a viabilidade das células e determinado o pH do biofilme. Dentre seus resultados, o biofilme com sucrose produziu um total de 5×10^8 UFC/mm² anaeróbios e, após 120h, eram formados por 11,7% de *Actinomyces spp.*, 84,7% de estreptococos e 0,2% de *Veillonella spp.* Após as 120h, com o pulso de 0,2% de clorexidina, houve uma redução total de aeróbios e anaeróbios de aproximadamente 1,3 log, com a redução de *Streptococcus spp.* e *Veillonella spp.* menor que 1 log. O pH caiu de 6,8 nas 24h para 4,2 nas 192h e aumentou para 4,8 nas 264h. A viabilidade das células diminuía em 1,5 log após os pulsos de 1 min. À medida que os pulsos continuavam, as células viáveis se recuperavam e, depois de 4 dias, a contagem dos anaeróbios atingiu o nível anterior aos pulsos, apesar de a composição bacteriana do biofilme ter se alterado. Concluiu-se que dois pulsos diários com clorexidina a 0,2%, em um período de 4 dias, não foram efetivos em reduzir o total de anaeróbios viáveis, mas alterou a composição bacteriana.

Gehlen *et al.*³⁴ propuseram-se a testar inter e intra-individualmente o efeito do digluconato de clorexidina a 0,2% em parâmetros bacteriológicos de pacientes sob tratamento ortodôntico. Doze pacientes ortodônticos (8 mulheres e 4 homens; idade

média 14,1±1,5 anos) participaram desta pesquisa. O período da pesquisa consistiu em 4 fases descritas em Gehlen *et al.* (2000). Os parâmetros bacteriológicos avaliados foram: fluorescência vital em T0, T1 e T2, através da coleta de placa dos incisivos centrais superiores e a marcação de células vitais e avitais; coleta de placa dos incisivos laterais superiores em T0, T1 e T2, sua suspensão e cultivo de placa; contagem das placas por UFC/mL de solução, considerando as bactérias vitais e avitais; avaliação da quantidade de estreptococos do grupo mutans do restante da placa em T0 e T2 e a utilização de um produto comercial com as contagens dadas em categorias (0: de 0 a 1 colônia na placa; 1: de 1 a 10^1 colônias na placa; 2: de 10^1 a 10^2 colônias na placa; 3: de 10^2 a 10^3 colônias na placa; e 4: de 10^3 a 10^4 colônias na placa). Utilizaram-se testes “t” pareados e para amostras independentes. Dentre os seus resultados, de T0 a T2, a vitalidade da placa foi de 70 a 80% no grupo controle e de 27% no grupo da clorexidina, sendo estatisticamente significativa ($p=0,005$); em T1 e em T2, houve aumento na contagem bacteriana no grupo controle e diminuição no grupo da clorexidina; e quanto aos estreptococos mutans, enquanto não havia diferença entre os grupos em T0, quando o bochecho de clorexidina era usado (independente de ser na Fase A ou na Fase B), houve redução de sua contagem. Os microrganismos mortos permanecem nas superfícies dos dentes sem que haja remoção mecânica de placa. Concluiu-se que realizar bochechos com solução de clorexidina a 0,2% reduz o re-crescimento de placa e a vitalidade da microbiota em pacientes ortodônticos. Uma vez que microrganismos mortos permanecem na superfície dos dentes, a clorexidina deve ser suplementada com a higiene oral.

Stewart⁴² analisou que muitas das diferenças entre bactérias de biofilmes e planctônicas podem ser explicadas pelo fenômeno da difusão. Em forma

planctônica, a difusão é geralmente de pequena importância. Já em biofilmes, ocorre limitação da difusão, porque o fluxo dos fluidos é mais reduzido e a distância para a difusão é aumentada pelo modo como os biofilmes crescem. O biofilme e o substrato ao qual ele está ancorado impedem o fluxo nas proximidades do biofilmes, prejudicando o transporte de nutrientes. Além disto, dentro do agregado de células, a alta densidade celular localizada e a presença de substâncias da matriz polimérica extracelular retêm o fluxo de água. A difusão é o processo de transporte predominante dentro dos agregados celulares. O valor do coeficiente de difusão efetivo de uma substância em biofilme será reduzido comparado ao coeficiente de difusão em água devido à presença de células bacterianas, polímeros extracelulares e partículas abióticas ou bolhas de gás que estão presas no biofilme. Destaca-se que, considerando-se a penetração de um bochecho de clorexidina em uma placa bacteriana esférica com raio de 260 μ m, o tempo de difusão estimado é de 5 minutos. O fato de bactérias no interior de biofilmes sobreviverem à aplicação de bochecho antimicrobiano talvez possa ser explicado por: falta de penetração da substância; falta de nutrientes no interior do biofilme, que gera células com menor potencial de crescimento; sinais de *quorum-sensing* que se acumulam no interior dos agregados e geram a expressão de genes protetores; sensores da superfície celular que detectam a presença de uma superfície sólida; ou um mecanismo de *feedback* que responde ao aumento de resistência à mobilidade que deve ocorrer quando as células se aderem a superfícies ou estão próximas a outras células ou a substâncias da matriz extracelular. Concluiu que a difusão é o processo predominante de transporte de soluto dentro de agregados celulares; a escala de tempo para o equilíbrio difusivo de um soluto não reagente irá variar de uma fração de segundo a dezenas de minutos na maioria dos sistemas de biofilme; a limitação da difusão

prontamente leva a gradientes na concentração de solutos reagentes e gradientes na fisiologia; canais de água podem carregar solutos dentro ou fora das profundidades de um biofilme, mas eles não garante acesso ao interior dos agregados celulares.

O objetivo do trabalho de Featherstone³⁵ foi discutir os principais desafios para melhor utilizar os agentes anti-cáries a verdadeiros níveis terapêuticos, pelo tempo necessário e para destruir o equilíbrio da cárie. Para tanto, foi feita uma revisão da literatura pertinente. Destaca-se que a clorexidina reduz os níveis de *S. mutans*, mas não é tão efetiva contra lactobacilos, em humanos; reduz mutans e lactobacilos no laboratório, mas é bem menos efetiva quando estes organismos estão em biofilme. Não se sabe se isto é uma questão de substantividade, de difusão, ou se os mutans e lactobacilos mais profundos no biofilme não podem ser atingidos por alguma razão. Concluiu que a clorexidina não é efetiva contra lactobacilos em biofilme; a terapia para pacientes com alto risco de cárie deve ser feita em conjunto com o uso de flúor; e deve-se achar um antimicrobiano que não necessite tanto da colaboração do paciente.

ANEXO II – METODOLOGIA

Justificativa

Na bacteremia constatada nos procedimentos ortodônticos, os estreptococos sempre foram encontrados na corrente sanguínea.^{1,2,3,4,5,6,7} Independentemente da espécie, após o primeiro ano de vida, os estreptococos viridans são os organismos mais freqüentemente encontrados em pacientes com endocardite infecciosa.^{8,9} Por esta razão, a presente pesquisa avaliou os estreptococos totais. Em seres humanos,

¹ MCLAUGHING, J. O.; COULTER, W. A.; COFFEY, A.; BURDEN, D. J. The incidence of bacteremia after orthodontic banding. **Am J Orthod Dentofac Orthop**, v. 109, p. 639-644, 1996.

² ERVERDI, N.; KADIR, T.; ÖZKAN, H.; ACAR, A. Investigation of bacteremia following orthodontic banding. **Am J Orthod Dentofac Orthop**, v. 116, p. 687-690, 1999.

³ ERVERDI, N.; BIREN, S.; KADIR, T.; ACAR, A. Investigation of bacteremia following orthodontic debanding. **Angle Orthod**, v. 70, p. 11-14, 2000.

⁴ ERVERDI, N.; ACAR, A.; ISGÜDEN, B.; KADIR, T. Investigation of bacteremia after orthodontic banding and debanding following chlorhexidine mouth wash application. **Angle Orthod**, v. 71, p. 190-194, 2001.

⁵ LUCAS, V. S.; OMAR, J.; VIEIRA, A.; ROBERTS, G. J. The relationship between odontogenic bacteraemia and orthodontic treatment procedures. **Eur J Orthod**, v. 24, p. 293-301, 2002.

⁶ BURDEN, D. J.; COULTER, W. A.; JOHNSTON, C. D.; MULLALLY, B. The prevalence of bacteraemia on removal of fixed orthodontic appliances. **Eur J Orthod**, v. 26, p. 443-447, 2004.

⁷ ROSA, E. A. R. ; RACHED, R. N.; TANAKA, O.; FRONZA, F.; FRONZA, F.; ASSAD, R. A. Preliminary investigation of bacteremia incidence after removal of the Haas palatal expander. **Am J Orthod Dentofac Orthop**, v. 127, p. 64-66, 2005.

⁸ DAJANI, A. S.; TAUBERT, K.A.; WILSON, W.; BOLGER, A. F.; BAYER, A.; FERRIERI, P.; GEWITZ, M. H.; SHULMAN, S. T.; NOURI, S.; NEWBURGER, J. W.; HUTTO, C.; PALLASCH, T. J.; GAGE, T. W.; LEVISON, M. E.; PETER, G.; ZUCCARO JR, G. Prevention of bacterial endocarditis. **Circulation**, v. 96, p. 358-366, 1997.

⁹ FERRIERI, P.; GEWITZ, M. H.; GERBER, M. A.; NEWBURGER, J. W.; DAJANI, A. S.; SHULMAN, S. T.; WILSON, W.; BOLGER, A. F.; BAYER, A.; LEVISON, M. E.; PALLASCH, T. J.; GAGE, T. W.; TAUBERT, K. A. Unique features of infective endocarditis in childhood. **Circulation**, v. 105, p. 2115-2126, 2002.

os estreptococos viridans são os prevalentemente encontrados na cavidade bucal.¹⁰ Estes estreptococos não-beta-hemolíticos são divididos nos grupos mutans, salivarius, anginosos, sanguinis e mitis.¹¹

A endocardite infecciosa é uma doença que causa risco de vida e se desenvolve em indivíduos que possuem determinadas doenças cardíacas.¹² A *American Heart Association*, em suas recomendações para prevenção da endocardite infecciosa¹³ apenas considera a colocação de bandas como procedimento ortodôntico com risco de bacteremia, ao qual a profilaxia antibiótica é recomendada. Esta recomendação se deve ao fato de procedimentos ortodônticos geralmente incorrem em baixa casuística de bacteremia.¹⁴ Contudo, a grande casuística de bacteremia por estreptococos encontrada por Rosa *et al.*¹⁵ (50%) e por

¹⁰ FACKLAM, R. What happened to the Streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. **Clin Microbiol Rev**, v. 15, p. 613-630, 2002.

¹¹ FACKLAM, R. What happened to the Streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. **Clin Microbiol Rev**, v. 15, p. 613-630, 2002.

¹² DAJANI, A. S.; TAUBERT, K.A.; WILSON, W.; BOLGER, A. F.; BAYER, A.; FERRIERI, P.; GEWITZ, M. H.; SHULMAN, S. T.; NOURI, S.; NEWBURGER, J. W.; HUTTO, C.; PALLASCH, T. J.; GAGE, T. W.; LEVISON, M. E.; PETER, G.; ZUCCARO JR, G. Prevention of bacterial endocarditis. **Circulation**, v. 96, p. 358-366, 1997.

¹³ DAJANI, A. S.; TAUBERT, K.A.; WILSON, W.; BOLGER, A. F.; BAYER, A.; FERRIERI, P.; GEWITZ, M. H.; SHULMAN, S. T.; NOURI, S.; NEWBURGER, J. W.; HUTTO, C.; PALLASCH, T. J.; GAGE, T. W.; LEVISON, M. E.; PETER, G.; ZUCCARO JR, G. Prevention of bacterial endocarditis. **Circulation**, v. 96, p. 358-366, 1997.

¹⁴ BURDEN, D. J.; COULTER, W. A.; JOHNSTON, C. D.; MULLALLY, B. The prevalence of bacteraemia on removal of fixed orthodontic appliances. **Eur J Orthod**, v. 26, p. 443-447, 2004.

¹⁵ ROSA, E. A. R. ; RACHED, R. N.; TANAKA, O.; FRONZA, F.; FRONZA, F.; ASSAD, R. A. Preliminary investigation of bacteremia incidence after removal of the Haas palatal expander. **Am J Orthod Dentofac Orthop**, v. 127, p. 64-66, 2005.

Lucas *et al.*¹⁶ (44%), após a remoção dos DDMS e instalação de bandas, respectivamente, reforça os pressupostos de importância desse grupo bacteriano em eventos de bacteremia associada ao uso de aparelhos de correção ortodôntica.

Seleção da amostra

Após a aprovação do projeto no Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), Of. 011/06/CEP-PUCPR, todos os pacientes da Clínica do Programa de Pós-Graduação em Odontologia (PPGO), Área de Concentração em Ortodontia da PUCPR que utilizavam o disjuntor dento-muco-suportado (DDMS) e tinham indicada sua remoção em razão de cada plano individual de tratamento foram examinados, totalizando 67 indivíduos de ambos os gêneros.

Foram selecionados pacientes que não apresentavam qualquer problema cardíaco ou vascular, imunossupressão, diabetes, consumo de antibióticos nos 3 meses anteriores à remoção do disjuntor e uso de qualquer produto bacteriostático ou bactericida. Três pacientes do PPGO com indicação para remoção do DDMS faziam uso de antibiótico e não foram selecionados, diminuindo a população avaliada para 64 indivíduos.

Os fatores gênero, idade e tempo de uso do disjuntor foram controlados através de uma ficha cadastral de maneira a serem analisados estatisticamente.

Quanto às características dos disjuntores avaliados, a contenção do parafuso em cada caso foi feita com diferentes materiais, como fios de ligadura, fios de latão e

¹⁶ LUCAS, V. S.; OMAR, J.; VIEIRA, A.; ROBERTS, G. J. The relationship between odontogenic bacteraemia and orthodontic treatment procedures. **Eur J Orthod**, v. 24, p. 293-301, 2002.

resina acrílica. A variabilidade dos disjuntores também era decorrente de características inerentes a cada paciente, como a anatomia da região palatina, a quantidade de ativações realizadas e o uso do disjuntor associado ou não à máscara facial. Além destas diferenças, os disjuntores no PPGO são confeccionados por diferentes operadores e os pacientes se diferenciavam entre si quanto à técnica utilizada para a higiene bucal. A solução encontrada para neutralizar o efeito destas variáveis de confundimento foi a aleatorização de distribuição dos pacientes.

Estes pacientes foram divididos em Grupo Experimental (n=34) – que recebeu a solução de digluconato de clorexidina a 0,2% – e Grupo Controle (n=30) – que não recebeu qualquer tratamento para reduzir a quantidade de bactérias e a massa de biofilme – e seu responsável recebeu o Termo de Consentimento apropriado (Anexo IV, p. 101; e Anexo V, p. 103). Somente compuseram a amostra aqueles pacientes cujos responsáveis assinaram e concordaram com a pesquisa. Como benefícios pela participação no estudo, os pacientes receberam orientação sobre higiene bucal, profilaxia e aplicação de flúor, após a remoção do DDMS, procedimentos estes realizados pelos pesquisadores, na própria Clínica do PPGO da PUCPR.

Durante a realização do estudo, ambos os grupos apresentaram diminuição no número de pacientes: 1 paciente do Grupo Controle apresentou desconforto antes da sessão de remoção do disjuntor e iniciou o uso de Clorexidina a 0,12%; 4 pacientes do Grupo Controle iniciaram o uso de bochechos com soluções bacteriostáticas antes da sessão de remoção; e 8 do Grupo Clorexidina não realizaram o protocolo correto de bochechos, 1 devido à sensibilidade na mucosa e 7 outros por negligência. Estes 13 pacientes não tiveram seus resultados considerados.

Ao final, a amostra apresentou as características listadas na Tabela I.

TABELA I – CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS DA AMOSTRA – PUCPR, 2006

	Clorexidina	Controle
N	26	25
Gênero		
Masculino	11	8
Feminino	15	17
Idade (anos/meses)		
Média	10a03m	9a4m
Desvio-Padrão	2a03m	1a4m
Mediana	9a05m	9a6m
Mínimo	7a00m	7a5m
Máximo	15a10m	11a6m
Tempo de uso do disjuntor (dias)		
Média	209,35	200,28
Desvio-Padrão	86,06	106,30
Mediana	178,50	147,00
Mínimo	119,00	77,00
Máximo	405,00	421,00

FONTE: Dados da Pesquisa.

Concentração e protocolo de utilização da clorexidina

Foi utilizada a solução de digluconato de clorexidina a 0,2%, na forma de bochechos. O protocolo recomendado foi de 3 bochechos diários de 5mL, 7 dias antes da remoção do disjuntor palatal. O tempo de cada bochecho foi determinado como sendo de 30s, após um estudo piloto com 3 voluntários.

A clorexidina foi o agente antimicrobiano de escolha, devido ao seu amplo espectro de atividade antimicrobiana, alta toxicidade seletiva, especificidade, eficácia, substantividade, segurança e estabilidade,¹⁷ além de não promover a

¹⁷ LANG, N. P.; BRECX, M. C. Chlorhexidine digluconate – an agent for chemical plaque control and prevention of gingival inflammation. **J Periodont Res**, v. 21, Suppl 16, p. 74-89, 1986.

seleção de cepas resistentes quando usada por até seis meses.¹⁸ A clorexidina é ativa contra uma grande variedade de organismos gram-positivos e gram-negativos, leveduras, fungos, anaeróbios facultativos e aeróbios.^{19,20} A determinação de sua concentração e protocolo de uso buscou unir viabilidade clínica, eficiência e minimização dos possíveis efeitos colaterais.

A *American Heart Association* recomenda bochecho de 30s com 15mL de clorexidina antes de procedimentos com potencial de causar bacteremia,^{21,22} sem especificar qual deve ser sua concentração. Na literatura, protocolos com cinco, dois e um bochechos diários em intervalos posológicos curtos e longos e diferentes concentrações demonstraram eficiência na prevenção e no tratamento da gengivite, bem como no retardamento de formação de placa *de novo*.²³

¹⁸ BRINER, W. W.; GROSSMAN, E.; BUCKNER, R.Y.; REBITSKI, G. F.; SOX, T. E.; SETSER, R. E.; EBERT, M. L. Assessment of susceptibility of plaque bacteria to chlorhexidine after six months' oral use. **J Periodont Res**, v. 21, Suppl 16, p. 53-59, 1986.

¹⁹ LANG, N. P.; BRECX, M. C. Chlorhexidine digluconate – an agent for chemical plaque control and prevention of gingival inflammation. **J Periodont Res**, v. 21, Suppl 16, p. 74-89, 1986.

²⁰ FARDAL, O.; TURNBULL, R. S. A review of the literature on use of chlorhexidine in dentistry. **J Am Dent Assoc**, v. 112, p. 863-869, 1986.

²¹ DAJANI, A. S.; TAUBERT, K.A.; WILSON, W.; BOLGER, A. F.; BAYER, A.; FERRIERI, P.; GEWITZ, M. H.; SHULMAN, S. T.; NOURI, S.; NEWBURGER, J. W.; HUTTO, C.; PALLASCH, T. J.; GAGE, T. W.; LEVISON, M. E.; PETER, G.; ZUCCARO JR, G. Prevention of bacterial endocarditis. **Circulation**, v. 96, p. 358-366, 1997.

²² ERVERDI, N.; ACAR, A.; ISGÜDEN, B.; KADIR, T. Investigation of bacteremia after orthodontic banding and debanding following chlorhexidine mouth wash application. **Angle Orthod**, v. 71, n. 3, p. 190-194, 2001.

²³ LANG, N. P.; BRECX, M. C. Chlorhexidine digluconate – an agent for chemical plaque control and prevention of gingival inflammation. **J Periodont Res**, v. 21, Suppl 16, p. 74-89, 1986.

A escolha da concentração de 0,2% foi fundamentada na sua segurança de uso²⁴ e por ser capaz de reduzir a casuística de eventos de bacteremia durante a instalação e remoção de bandas.²⁵

Os autores que preconizam tal concentração geralmente a recomendam em dois bochechos diários com 10mL,^{26,27,28,29} inclusive para pacientes sob tratamento ortodôntico.^{30,31} A prescrição de dois bochechos é fundamentada no fato de que a clorexidina aumenta a fase lag das bactérias de nove para quatorze horas³² e

²⁴ LÖE, H.; SCHIÖTT, C. R. The effect of chlorhexidine mouthrinses and topical application of chlorhexidine on the development of dental plaque and gingivitis in man. **J Periodont Res**, v. 5, p. 79-83, 1970.

²⁵ ERVERDI, N.; ACAR, A.; ISGÜDEN, B.; KADIR, T. Investigation of bacteremia after orthodontic banding and debanding following chlorhexidine mouth wash application. **Angle Orthod**, v. 71, n. 3, p. 190-194, 2001.

²⁶ LÖE, H.; SCHIÖTT, C. R. The effect of chlorhexidine mouthrinses and topical application of chlorhexidine on the development of dental plaque and gingivitis in man. **J Periodont Res**, v. 5, p. 79-83, 1970.

²⁷ GJERMO, P.; BONESVOLL, P.; RÖLLA, G. Relationship between plaque-inhibiting effect and retention of chlorhexidine in the human oral cavity. **Archs Oral Biol**, v. 19, p. 1031-1034, 1974.

²⁸ JENKINS, S.; ADDY, M.; NEWCOMBE, R. G. Dose response of chlorhexidine against plaque and comparison with triclosan. **J Clin Periodontol**, v. 21, p. 250-255, 1994.

²⁹ SMITH, R. G.; MORAN, J.; ADDY, M.; DOHERTY, F.; NEWCOMBE, R. G. Comparative staining in vitro e plaque inhibitory properties in vivo of 0.12% and 0.2% chlorhexidine mouthrinses. **J Clin Periodontol**, v. 22, p. 613-617, 1995.

³⁰ GEHLEN, I.; NETUSCHIL, L.; BERG, R.; REICH, E.; KATSAROS, C. The influence of a 0.2% chlorhexidine mouthrinse on plaque regrowth in orthodontic patients: a randomized prospective study – part I: clinical parameters. **J Orofac Orthop**, v. 61, p. 54-62, 2000.

³¹ GEHLEN, I.; NETUSCHIL, L.; GEORG, T.; REICH, E.; BERG, R.; KATSAROS, C. The influence of a 0.2% chlorhexidine mouthrinse on plaque regrowth in orthodontic patients: a randomized prospective study – part II: bacteriological parameters. **J Orofac Orthop**, v. 61, p. 138-148, 2000.

³² FARDAL, O.; TURNBULL, R. S. A review of the literature on use of chlorhexidine in dentistry. **J Am Dent Assoc**, v. 112, p. 863-869, 1986.

equivalem a duas doses diárias de 20mg de clorexidina.³³ Ocorre, porém, que nestas pesquisas, a higiene bucal dos pacientes foi suspensa para o uso exclusivo dos bochechos estudados. Somente pesquisadores que utilizaram clorexidina 0,12% por 6 meses^{34,35} orientaram seus pacientes a continuar sua higiene bucal normal. Maruo³⁶, ao contrário, em pacientes ortodônticos, comparou os índices gengival e de placa em pacientes que utilizavam método de higienização exclusivamente mecânico com os que utilizavam o método mecânico associado à clorexidina, mostrando redução estatisticamente maior nestes índices com 3 bochechos diários com 5mL de clorexidina a 0,2%.

Uma vez que a presente pesquisa tentou se aproximar de situações clínicas e não suspendeu a higiene bucal dos pacientes, escolheu-se o protocolo de 3 bochechos diários de 5mL de clorexidina realizados após a higiene bucal. Esse fato garantiu homeostase do pH próximo à neutralidade da cavidade bucal por um intervalo mais prolongado e, conseqüentemente, maior retenção da molécula,^{37,38} fundamentando a menor dosagem de bochecho.

³³ JENKINS, S.; ADDY, M.; NEWCOMBE, R. G. Dose response of chlorhexidine against plaque and comparison with triclosan. **J Clin Periodontol**, v. 21, p. 250-255, 1994.

³⁴ BRINER, W. W.; GROSSMAN, E.; BUCKNER, R. Y.; REBITSKI, G. F.; SOX, T. E.; SETSER, R. E.; EBERT, M. L. Assessment of susceptibility of plaque bacteria to chlorhexidine after six months' oral use. **J Periodont Res**, v. 21, Suppl 16, p. 53-59, 1986.

³⁵ BRINER, W. W.; GROSSMAN, E.; BUCKNER, R. Y.; REBITSKI, G. F.; SOX, T. E.; SETSER, R. E.; EBERT, M. L. Effect of chlorhexidine gluconate mouthrinse on plaque bacteria. **J Periodont Res**, v. 21, Suppl 16, p. 44-52, 1986.

³⁶ MARUO, H. **Controle de placa bacteriana e inflamação gengival em pacientes sob tratamento ortodôntico**. Piracicaba, 1992. 127f. Tese (Doutorado em Ortodontia) – Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.

³⁷ GJERMO, P.; BONESVOLL, P.; RÖLLA, G. Relationship between plaque-inhibiting effect and retention of chlorhexidine in the human oral cavity. **Archs Oral Biol**, v. 19, p. 1031-1034, 1974.

Ao invés dos 60s utilizados por Maruo³⁹, o tempo de cada bochecho utilizado na presente pesquisa foi de 30s e objetivou proporcionar maior colaboração dos pacientes visto que, em estudo piloto, foi observado que um minuto de bochecho com a solução estudada não era bem tolerado pelos voluntários, que não utilizavam DDMS e tinham a mesma idade dos pacientes da amostra e. Essa redução no tempo encontra respaldo, visto que a clorexidina possui grande substantividade⁴⁰ e bochechos de 30 a 45s garantem adsorção satisfatória.⁴¹ Além disto, o efeito protetor contra a formação de placa *de novo* conseguido com clorexidina 0,12% é similar ao da solução 0,2%⁴² e 15s de bochecho com a solução 0,2% equivalem a um minuto de bochecho com solução 0,1%.⁴³

³⁸ BONESVOLL, P.; LÖKKEN, P.; RÖLLA, G. Influence of concentration, time, temperature and pH on the retention of chlorhexidine in the human oral cavity after mouth rinses. **Archs Oral Biol**, v. 19, p. 1025-1029, 1974.

³⁹ MARUO, H. **Controle de placa bacteriana e inflamação gengival em pacientes sob tratamento ortodôntico**. Piracicaba, 1992. 127f. Tese (Doutorado em Ortodontia) – Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.

⁴⁰ BONESVOLL, P.; LÖKKEN, P.; RÖLLA, G.; PAUS, P. N. Retention of chlorhexidine in the human oral cavity after mouth rinses. **Archs Oral Biol**, v. 19, p. 209-212, 1974.

⁴¹ LANG, N. P.; BRECX, M. C. Chlorhexidine digluconate – an agent for chemical plaque control and prevention of gingival inflammation. **J Periodont Res**, v. 21, Suppl 16, p. 74-89, 1986.

⁴² SMITH, R. G.; MORAN, J.; ADDY, M.; DOHERTY, F.; NEWCOMBE, R. G. Comparative staining in vitro e plaque inhibitory properties in vivo of 0.12% and 0.2% chlorhexidine mouthrinses. **J Clin Periodontol**, v. 22, p. 613-617, 1995.

⁴³ BONESVOLL, P.; LÖKKEN, P.; RÖLLA, G. Influence of concentration, time, temperature and pH on the retention of chlorhexidine in the human oral cavity after mouth rinses. **Archs Oral Biol**, v. 19, p. 1025-1029, 1974.

O uso dos bochechos nos sete dias que precederam a remoção dos DDMS foi justificado para que houvesse a menor ocorrência de efeitos colaterais. Løe⁴⁴ acompanhou periodicamente estudantes que realizaram um e dois bochechos diários de clorexidina a 0,2%, observando que independentemente da quantidade de bochechos, o manchamento dos dentes de todos os pacientes ocorria somente no décimo dia. Mesmo com este cuidado, um paciente apresentou manchamento iatrogênico dos dentes quando se apresentou para a remoção do DDMS e outro não colaborou com o protocolo de bochechos devido à sensibilidade na mucosa, que são os principais efeitos colaterais da clorexidina.^{45,46}

Uma vez que a colaboração do paciente é essencial para se testar a real eficiência da clorexidina, buscaram-se formas de controlar seu uso, tais como o fornecimento ao paciente de frascos de polipropileno de 10mL.

Desta forma, como cada paciente realizaria os bochechos 3 vezes por dia, durante 7 dias, foram fornecidos exatamente 11 frascos de polipropileno de 10mL (Figura 1, página 84). Foram fornecidas as orientações de que o bochecho deveria ser realizado por 30 segundos e que água ou alimento não deveria ser ingerido no mínimo uma hora após a sua aplicação. Na sessão de remoção, o paciente deveria retornar com 10 frascos vazios e um frasco com metade de sua quantidade. Pacientes que se apresentaram com mais de meio frasco com a solução de

⁴⁴ LÖE, H.; SCHIÖTT, C. R. The effect of chlorhexidine mouthrinses and topical application of chlorhexidine on the development of dental plaque and gingivitis in man. **J Periodont Res**, v. 5, p. 79-83, 1970.

⁴⁵ LANG, N. P.; BRECX, M. C. Chlorhexidine digluconate – an agent for chemical plaque control and prevention of gingival inflammation. **J Periodont Res**, v. 21, Suppl 16, p. 74-89, 1986.

⁴⁶ FARDAL, O.; TURNBULL, R. S. A review of the literature on use of chlorhexidine in dentistry. **J Am Dent Assoc**, v. 112, p. 863-869, 1986.

clorexidina, foram considerados não-colaboradores e não foram considerados para a comparação dos resultados.



Figura 1. Frascos dados aos pacientes para que realizassem os bochechos.

Para que os pacientes tivessem melhor controle da realização dos bochechos, foi fornecida uma “Ficha de Controle de Bochechos” (Anexo VII, p. 106). Nesta ficha, assim como verbalmente, os pacientes foram informados dos possíveis efeitos adversos da clorexidina, tais como o manchamento dentário (removível com a utilização de profilaxia), irritação da mucosa e perda de paladar (que cessam, assim que a utilização da clorexidina é interrompida) e que poderiam desistir da participação na pesquisa a qualquer tempo.

Avaliação microbiológica

Em ambos os grupos, a remoção do DDMS ocorreu da mesma forma. Os pacientes foram instruídos a não escovarem os dentes nem se alimentarem no mínimo duas horas antes da remoção do aparelho.

A remoção de cada aparelho foi realizada sempre pelo mesmo operador, sendo este sempre auxiliado para melhor controle de umidade e eficácia de procedimentos. A remoção das bandas foi realizada com alicate removedor de

bandas ortodônticas (Masel, Bristol, PA, ref. 4150-942) e, quando o disjuntor apresentava partes coladas, a remoção da resina aderida aos dentes suporte do disjuntor foi realizada com alicate removedor de resina (Masel, Bristol, PA, ref. 253). Depois da remoção do DDMS, a resina remanescente nos dentes foi retirada com Foice McCall e fresa com 12 lâminas, cilíndrica e com a ponta arredondada montada em baixa-rotação. Em seguida, foi feita profilaxia em todos os dentes com pedrapomes e foi realizada a aplicação tópica de flúor. Apenas uma paciente do Grupo Clorexidina retornou com os dentes com coloração mais escura, sendo a coloração normal restabelecida por profilaxia.

Após cada remoção, percebeu-se que a quantidade de biofilme que ficava aderido à parte acrílica do DDMS e à mucosa palatina era muito variável, ou seja, não era possível prever em que local o biofilme permaneceria mais aderido. Por esta razão, este trabalho avaliou o biofilme que ficou aderido ao DDMS e não necessariamente toda a massa de biofilme que se forma na interface acrílico/palato. Geralmente, a quantidade de biofilme presente na parte acrílica do DDMS é como a vista na Figura 2, tanto no Grupo Clorexidina quanto no Grupo Controle.



Figura 2. Aspecto do disjuntor palatal após sua remoção. **A.** Vista da parte adjacente ao palato. **B.** Vista da parte voltada à cavidade bucal.

Após a remoção, o disjuntor palatal foi armazenado num coletor universal estéril (J. Prolab, São José dos Pinhais, Brasil) com capacidade de 80mL (Figura 3), até o momento da realização dos testes laboratoriais, que ocorreu num intervalo máximo de 2 horas.



Figura 3. Disjuntor armazenado no coletor universal de ensaio para ser levado ao Laboratório de Estomatologia da PUCPR.

Uma vez no Laboratório de Estomatologia da PUCPR, o disjuntor palatal foi retirado do coletor e sua massa imediatamente determinada em balança analítica (Bel Mark U210A, Bel Engineering, Piracicaba, Brasil) com precisão de 0,1mg, sobre uma lâmina de papel-alumínio esterilizada em calor seco (Figura 4, página 87). Em seguida, o disjuntor foi imerso em 100mL de água destilada contida em frasco com vedação hermética (Figura 5, página 87). Este frasco foi disposto no centro de uma cuba de ultra-som (Thornton T7, Thornton Inpec Eletrônica Ltda, Ribeirão Preto, Brasil) (Figura 6, página 87) e os biofilmes aderidos foram removidos por exposição continuada (500W/15min).



Figura 4. Mensuração da massa do conjunto DDMS e massa de biofilme.



Figura 5. DDMS imerso em 100mL de água destilada.



Figura 6. Frasco disposto no centro da cuba de ultra-som para remoção do biofilme.

Após a remoção do biofilme (Figura 7), o disjuntor foi seco em estufa de incubação a 37°C, por 48 horas, e novamente pesado (Figura 8). A diferença entre as massas do aparelho pré e pós-coleta de biofilme foi considerada como sendo a massa de biofilme.



Figura 7. Aspecto da solução água destilada/biofilme do DDMS e remoção do DDMS para secagem.



Figura 8. Mensuração da massa do DDMS sem o biofilme.

O frasco com o biofilme suspenso foi agitado em vórtex (AP56, Phoenix Ltda, São Paulo, Brasil) (2400rpm/30s) e aberto em gabinete de segurança biológica classe II (VLFS 12, Veco do Brasil, São Paulo, Brasil). A partir da suspensão, foram tomadas alíquotas de 100µL que foram processadas por diluição seriada de 10 até

100.000 vezes em incrementos de 10 vezes (Figura 9). De cada tubo da série de diluição, alíquotas de 10 μ L foram aplicadas sobre Ágar Mitis Salivarius (BD, Diagnostic Systems, Sparks, MD), em duplicata (Figura 10, página 89; e Figura 11, página 90). Por fim, todas as placas eram armazenadas em jarras de anaerobiose (Permution, Curitiba, Brasil) (Figura 12, página 90) e incubadas em pCO₂ 10% e 37°C, por 72 horas (Figura 13, página 90).

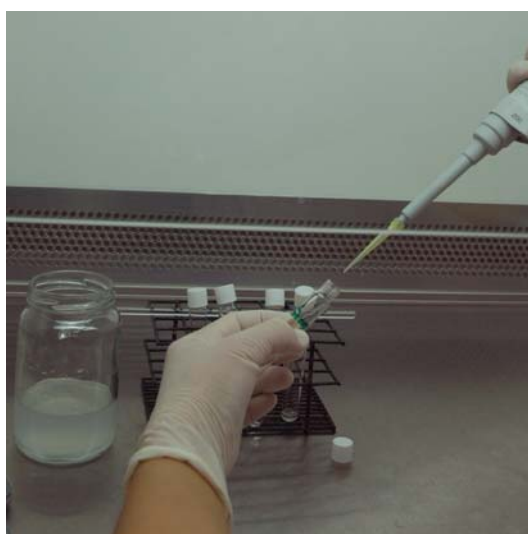


Figura 9. Diluição progressiva da solução água destilada/biofilme do DDMS.



Figura 10. Alíquota de 10 μ L aplicada sobre o meio de cultura Ágar Mitis Salivarius.



Figura 11. Espalhamento da alíquota de 10 μ L sobre o Agar Mitis Salivarius.

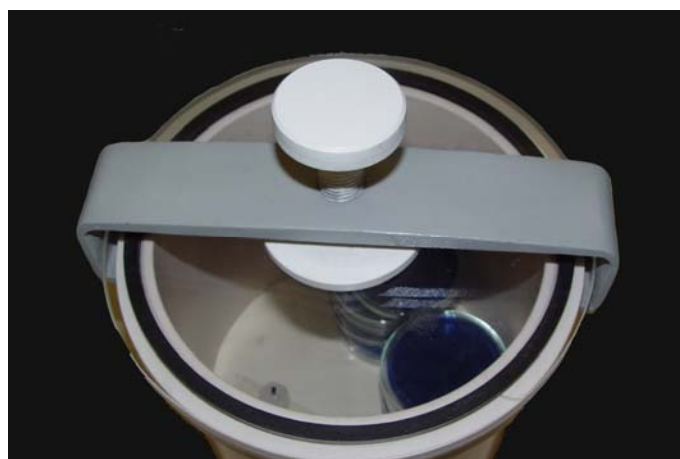


Figura 12. Armazenamento das placas em pCO₂ 10%.



Figura 13. Armazenamento da jarra de anaerobiose em estufa a 37°C, por 72 horas.

As placas que apresentaram 30-300 colônias foram tomadas para quantificação das bactérias, pelo fato de contagens dentro deste intervalo apresentarem menores erros de experimentação (Figuras 14 e 15). Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônias de estreptococos totais por mililitro (UFC-ST/mL) e corrigidos para unidades formadoras de colônia de estreptococos totais por miligrama de biofilme (UFC-ST/mg biofilme). Além de UFC-ST/mg de biofilme, foi também calculado $\log(\text{UFC-ST/mg biofilme})$.

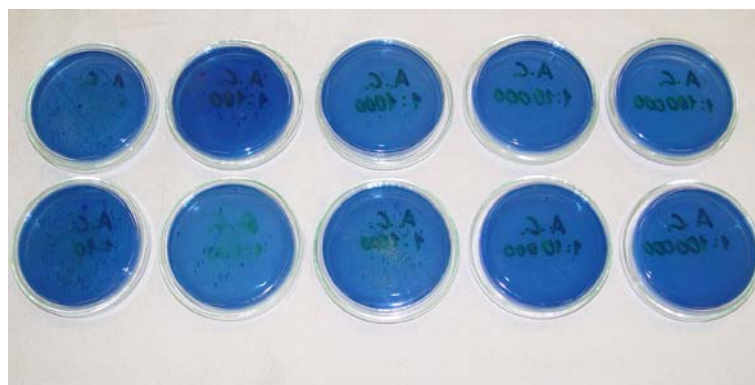


Figura 14. Aspectos das placas após 72 horas em estufa a 37°C.

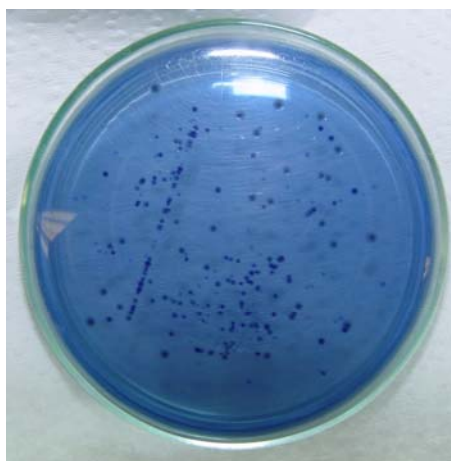


Figura 15. Exemplo de placa com o número apropriado para a contagem das Unidades Formadoras de Colônias.

ANEXO III – ANÁLISE ESTATÍSTICA

O objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos do digluconato de clorexidina a 0,2% na massa de biofilme e na quantidade de estreptococos totais do disjuntor palatal, bem como a correlação entre estas variáveis. O gênero, a idade e o tempo de uso do aparelho poderiam influenciar as variáveis avaliadas e causar um viés no entendimento das diferenças existentes entre os grupos experimental e controle. Por esta razão, os dois grupos foram analisados estatisticamente em relação às possíveis variáveis de confundimento.

A Tabela 1 mostra as características de cada grupo.

TABELA 1 - CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS DA AMOSTRA, PUCPR- 2006

	Clorexidina	Controle
n	26	25
Gênero		
Masculino	11	8
Feminino	15	17
Idade (anos/meses)		
Média	10a03m	9a4m
Desvio-Padrão	2a03m	1a4m
Mediana	9a05m	9a6m
Mínimo	7a00m	7a5m
Máximo	15a10m	11a6m
Tempo de uso do disjuntor (dias)		
Média	209,35	200,28
Desvio-Padrão	86,06	106,30
Mediana	178,50	147,00
Mínimo	119,00	77,00
Máximo	405,00	421,00

FONTE: Dados da Pesquisa.

Quanto à distribuição de indivíduos dos gêneros masculino e feminino entre os grupos, o teste Qui-Quadrado e o teste exato de Fischer demonstraram que não existe dependência entre os grupos e o gênero ($p>0,05$). Isto pode ser melhor visualizado na Figura 1.

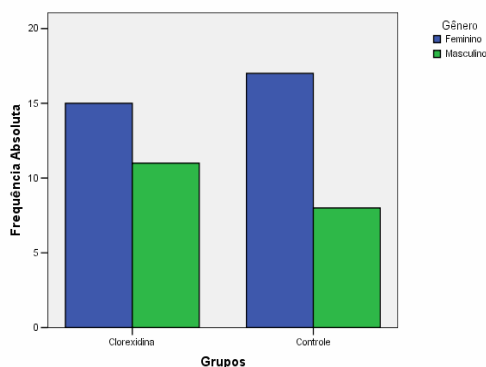


Figura 1. Distribuição de frequência dos grupos, segundo gênero.

As variáveis “Tempo de Uso do Disjuntor” de ambos os grupos e “Idade” do Grupo Clorexidina não apresentaram normalidade, pelos testes de Kolmogorov-Smirnov ($p < 0,05$) apresentando, porém, homogeneidade de variância entre os grupos pelo teste de Levene ($p > 0,05$). Estes resultados podem ser melhor visualizados nas Tabelas 2 e 3.

TABELA 2 - TESTES DE NORMALIDADE PARA AS VARIÁVEIS “IDADE” E “TEMPO DE USO DO DISJUNTOR”, SEGUNDO GRUPOS, PUCPR - 2006

Variável	Grupos	Kolmogorov-Smirnov	
		Estatística	Valor p
Idade	Clorexidina	0,2696	0,0000*
	Controle	0,1021	0,2000
Tempo de Uso do Disjuntor	Clorexidina	0,2563	0,0001*
	Controle	0,2519	0,0003*

FONTE: Dados da Pesquisa

NOTA: *Valores de $p < 0,05$ significam que a variável não apresenta normalidade.

TABELA 3 - TESTES DE HOMOGENEIDADE DE VARIÂNCIAS PARA AS VARIÁVEIS “IDADE” E “TEMPO DE USO DO DISJUNTOR”, SEGUNDO GRUPOS, PUCPR - 2006

Variável	Levene	
	Estatística	Valor p
Idade	3,4625	0,0688
Tempo de Uso do Disjuntor	1,6303	0,2077

FONTE: Dados da Pesquisa

NOTA: *Valores de $p < 0,05$ significam que a variável não apresenta homogeneidade de variância.

Devido a este comportamento das variáveis, os grupos foram comparados entre si pelo teste não-paramétrico “U” de Mann-Whitney (Tabela 4), o qual demonstrou que os grupos não diferiram estatisticamente entre si quanto à “Idade” e quanto ao “Tempo de Uso do Disjuntor” ($p > 0,05$).

TABELA 4 - TESTE "U" DE MANN-WHITNEY PARA COMPARAÇÃO DAS VARIÁVEIS "IDADE" E "TEMPO DE USO DO DISJUNTOR", SEGUNDO GRUPOS, PUCPR - 2006

Variáveis	Clorexidina (n=26)	Controle (n=25)	Z	p
	Média dos Ranks	Média dos Ranks		
Idade	28,0962	23,8200	-1,0279	0,3040
Tempo de Uso do Disjuntor	28,7115	23,1800	-1,3292	0,1838

FONTE: Dados da Pesquisa

NOTA: *Valores de $p < 0,05$ significam que há diferença estatística entre os grupos.

Além destas comparações isoladas, a variável “Tempo de Uso do Disjuntor” foi avaliada segundo os critérios “Gênero” e “Grupo”, através da ANOVA a dois critérios de classificação, modelo fatorial completo, visando a identificar se existia diferenças entre gêneros, entre grupos e a interação entre ambas. Assim, a variável “Tempo de Uso do Disjuntor” foi avaliada quanto ao critério “Gênero” (Figura 2), quanto ao critério “Grupo” (Figura 3) e quanto a ambos os critérios associados (Figura 4). Os resultados demonstraram igualdade entre os grupos Clorexidina e Controle ($p > 0,05$).

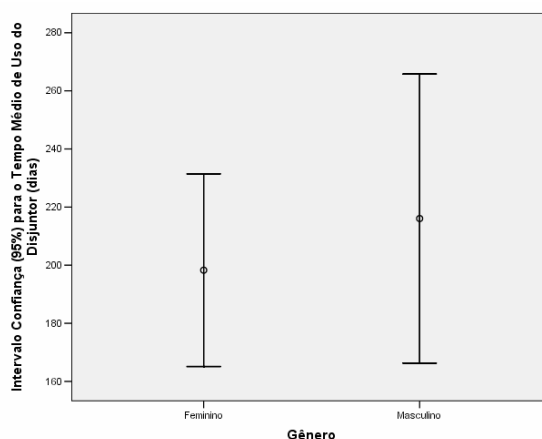


Figura 2. Comparação do Tempo de Uso do Disjuntor, segundo “Gênero” e independente de “Grupo”, mostrando ausência de diferença estatística ($p > 0,05$).

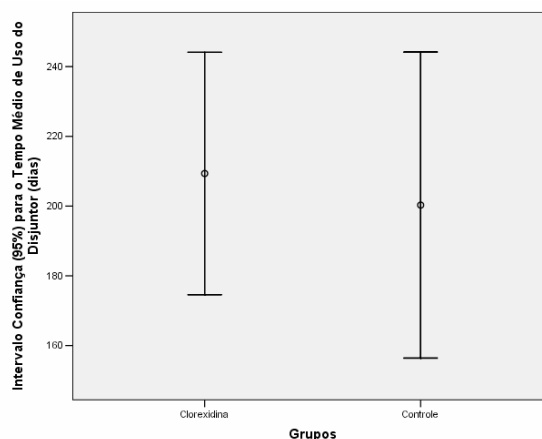


Figura 3. Comparação do Tempo de Uso do Disjuntor, segundo “Grupo” e independente de “Gênero”, mostrando ausência de diferença estatística ($p>0,05$).

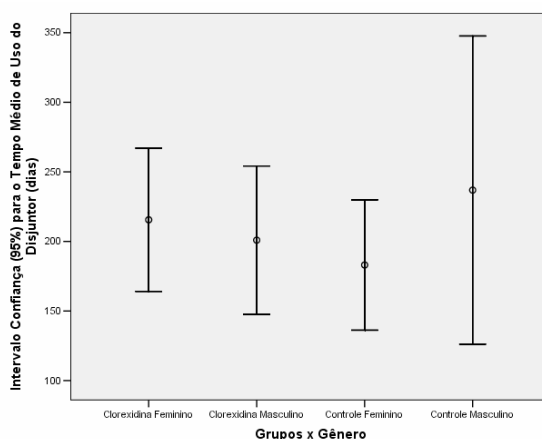


Figura 4. Comparação do Tempo de Uso do Disjuntor, segundo “Grupo” e “Gênero” associados, mostrando ausência de diferença estatística ($p>0,05$).

Como os grupos eram estatisticamente homogêneos e os outros possíveis confundimentos (anatomia do palato do paciente que utilizou o DDMS; quantidade de bandas, de ativações do parafuso, de acabamento e de polimento do DDMS; operador que confeccionou o DDMS; e contenção do parafuso com fio de latão, com fio de ligadura ou com resina acrílica) foram aleatoriamente distribuídos entre eles, qualquer diferença na massa de biofilme e na quantidade de estreptococos totais é decorrente do efeito do uso ou não da clorexidina.

A estatística descritiva das variáveis “Massa de Biofilme”, “UFC-ST/mg de Biofilme” e “log(UFC-ST/mg de Biofilme)” são apresentadas na Tabela 5 (Grupo Clorexidina) e Tabela 6 (Grupo Controle).

TABELA 5 - ESTATÍSTICA DESCRITIVA DAS VARIÁVEIS "MASSA DE BIOFILME", "UFC-ST/MG DE BIOFILME" E "UFC-ST/MG DE BIOFILME", NO GRUPO CLOREXIDINA, PUCPR – 2006

Variáveis	n	Média	Desvio-Padrão	Mediana	Mínimo	Máximo
Massa de Biofilme (mg)	26	168,8846	89,2649	145,0500	33,9000	419,4000
UFC-ST/mg de Biofilme	26	$6,7682 \times 10^6$	$7,7680 \times 10^6$	$4,1718 \times 10^6$	$6,4277 \times 10^5$	$3,1097 \times 10^7$
log(UFC-ST/mg de Biofilme)	26	6,5653	0,5075	6,6201	5,8081	7,4925

FONTE: Dados da Pesquisa

TABELA 6 - ESTATÍSTICA DESCRITIVA DAS VARIÁVEIS "MASSA DE BIOFILME", "UFC-ST/MG DE BIOFILME" E "UFC-ST/MG DE BIOFILME", NO GRUPO CONTROLE, PUCPR - 2006

Variáveis	n	Média	Desvio-Padrão	Mediana	Mínimo	Máximo
Massa de Biofilme (mg)	25	182,0360	49,4263	166,3000	113,4000	296,9000
UFC-ST/mg de Biofilme	25	$3,8246 \times 10^7$	$4,7056 \times 10^7$	$1,4661 \times 10^7$	$3,6541 \times 10^7$	$1,5208 \times 10^7$
log(UFC-ST/mg de Biofilme)	25	7,3048	0,4840	7,1662	6,5628	8,1821

FONTE: Dados da Pesquisa

As variáveis “Massa de Biofilme”, “UFC-ST/mg de Biofilme” e “log(UFC-ST/mg de Biofilme)” foram avaliadas segundo a normalidade, pelos testes de Kolmogorov-Smirnov e de Shapiro-Wilk. Optou-se pelos resultados do teste de Kolmogorov-Smirnov, porque apresentou os mesmos resultados do teste de Shapiro-Wilk, e é menos rígido. Somente “Massa de Biofilme” do Grupo Controle e “log(UFC-ST/mg de Biofilme)” apresentaram normalidade ($p > 0,05$) (Tabela 7).

TABELA 7 - TESTES DE NORMALIDADE PARA AS VARIÁVEIS "MASSA DE BIOFILME", "UFC-ST/MG DE BIOFILME" E "UFC-ST/MG DE BIOFILME", SEGUNDO GRUPOS, PUCPR - 2006

Variável	Grupos	Kolmogorov-Smirnov	
		Estatística	Valor p
Massa de Biofilme	Clorexidina	0,1707	0,0496*
	Controle	0,1523	0,1382
UFC-ST/mg de Biofilme	Clorexidina	0,2509	0,0002*
	Controle	0,3314	0,0000*
log(UFC-ST/mg de Biofilme)	Clorexidina	0,0983	0,2000
	Controle	0,1842	0,0285*

FONTE: Dados da Pesquisa

NOTA: *Valores de $p < 0,05$ significam que a variável não apresenta normalidade.

Em seguida, as variáveis "Massa de Biofilme", "UFC-ST/mg de Biofilme" e "log(UFC-ST/mg de Biofilme)" tiveram sua homogeneidade avaliada pelo teste de Levene. Este teste demonstrou que "Massa de Biofilme" e "UFC-ST/mg de Biofilme" não apresentaram homogeneidade ($p > 0,05$), conforme demonstra a Tabela 8.

TABELA 8 - TESTES DE HOMOGENEIDADE DE VARIÂNCIAS PARA AS VARIÁVEIS "MASSA DE BIOFILME", "UFC-ST/MG DE BIOFILME" E "UFC-ST/MG DE BIOFILME", PUCPR - 2006

Variável	Levene	
	Estatística	p
Massa de Biofilme	5,2644	0,0261*
UFC-ST/mg de Biofilme	32,6535	0,0000*
log(UFC-ST/mg de Biofilme)	0,1193	0,7312

FONTE: Dados da Pesquisa

NOTA: *Valores de $p < 0,05$ significam que a variável não apresenta homogeneidade de variância.

Devido a este comportamento das variáveis, a comparação entre "Massa de Biofilme", "UFC-ST/mg de Biofilme" e "log(UFC-ST/mg de Biofilme)" nos Grupos Clorexidina e Controle foi feita pelo teste não-paramétrico "U" de Mann-Whitney (Tabela 9).

TABELA 9 - TESTE "U" DE MANN-WHITNEY PARA COMPARAÇÃO DAS VARIÁVEIS "MASSA DE BIOFILME", "UFC-ST/MG DE BIOFILME" E "log(UFC-ST/MG DE BIOFILME)", PUCPR - 2006

Variáveis	Clorexidina (n=26)	Controle (n=25)	Z	p
	Média dos Ranks	Média dos Ranks		
Massa de Biofilme	23,0000	29,1200	-1,469727	0,1416
UFC-ST/mg de Biofilme	17,3462	35,0000	-4,239501	0,0000*
log(UFC-ST/mg de Biofilme)	17,3462	35,0000	-4,239501	0,0000*

FONTE: Dados da Pesquisa

NOTA: *Valores de $p < 0,05$ significam que há diferença estatística entre os grupos.

Este teste demonstrou que não há diferença estatística ($p > 0,05$) entre a "Massa de Biofilme" nos Grupos Experimental e Controle (Figura 5), bem como que o digluconato de clorexidina a 0,2% diminui estatisticamente ($p < 0,01$) tanto a "UFC-ST/mg de Biofilme" (Figura 6) quanto o "log(UFC-ST/mg de Biofilme)" (Figura 7). Estes resultados foram os mesmos do teste "t" de *Student* (teste paramétrico), sendo que este não é recomendado para as variáveis que não apresentem distribuição normal.

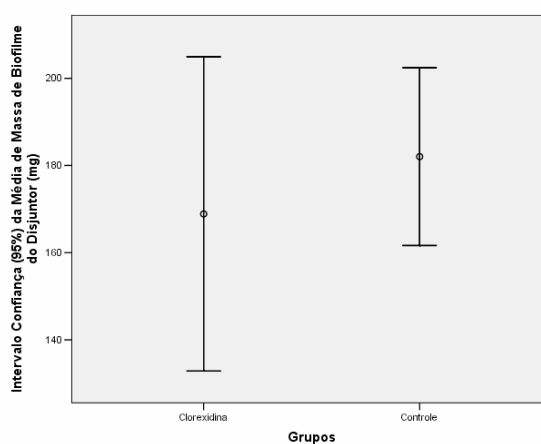


Figura 5. Intervalo de Confiança (95%) para os valores médios da "Massa de Biofilme", segundo grupos.

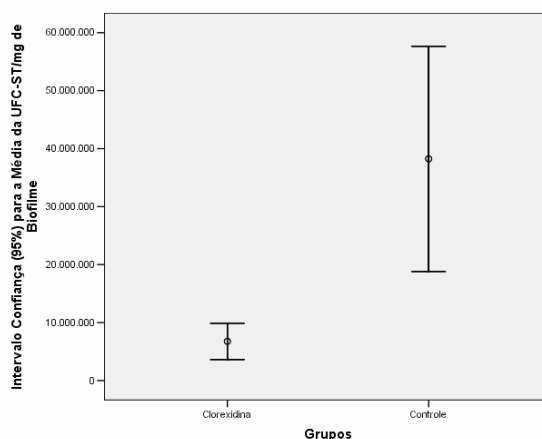


Figura 6. Intervalo de Confiança (95%) para os valores médios das “UFC-ST/mg de Biofilme”, segundo grupos.

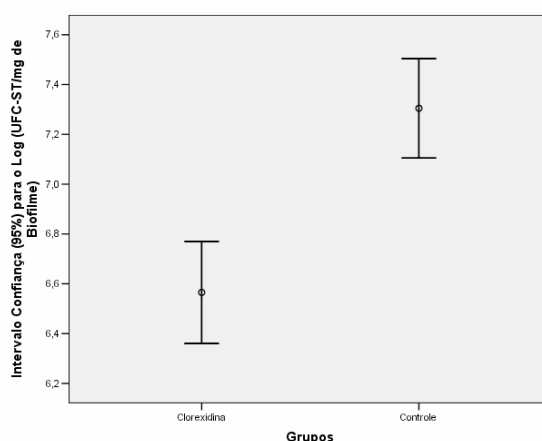


Figura 7. Intervalo de Confiança (95%) para os valores médios do “log(UFC-ST/mg de Biofilme)”, segundo grupos.

As correlações avaliadas no presente trabalho foram as que ocorreram entre “Massa de Biofilme” e “(UFC-ST/mg de Biofilme)” e entre “Massa de Biofilme” e “log(UFC-ST/mg de Biofilme)”.

Como já foi demonstrado, as variáveis “Massa de Biofilme”, “UFC-ST/mg de Biofilme” e “log(UFC-ST/mg de Biofilme)” são contínuas e não apresentam distribuição normal. Por esta razão, utilizou-se a Correlação de Spearman, a qual demonstrou que não há correlação entre “Massa de Biofilme” e “UFC-ST/mg de Biofilme” tanto no Grupo Controle ($r = -0,1127$; $p > 0,05$) quanto no Grupo Clorexidina ($r = 0,3025$; $p > 0,05$). Da mesma forma, não há correlação entre “Massa de Biofilme”

e “log(UFC-ST/mg de Biofilme)” tanto no Grupo Controle ($r = -0,1127$; $p > 0,05$) quanto no Grupo Clorexidina ($r = 0,3025$; $p > 0,05$).

ANEXO IV – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – GRUPO CLOREXIDINA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

A pesquisa “Efeitos da clorexidina nos estreptococos totais formadores de biofilme do disjuntor palatal” se propõe a realizar uma avaliação dos efeitos da clorexidina (solução desinfetante) nos microrganismos que se formam ao redor do disjuntor palatal (aparelho superior para aumentar a largura do osso maxilar). Será conduzida pelo Mestrando Ivan Toshio Maruo, sob orientação da Prof.^a Dr.^a Elisa Souza Camargo e co-orientação do Prof. Dr. Edvaldo Antonio Ribeiro Rosa.

Para que se possa alcançar este objetivo, existe a necessidade de se formarem dois grupos de pacientes, um que utilize a clorexidina e outro que não a use, para compará-los entre si. Você foi escolhido para fazer parte do grupo que utilizará a clorexidina. Desta forma, assim que estiver indicada a remoção do seu aparelho, você iniciará uma rotina de 3 bochechos diários com a solução de digluconato clorexidina a 0,2%, por 7 dias. Em seguida, o seu aparelho disjuntor será removido e analisado laboratorialmente.

Durante este período de uso do bochecho, você pode sentir alguns efeitos colaterais, tais como leve manchamento dentário (que sairá com a limpeza realizada pelos pesquisadores), irritação da mucosa e perda de paladar (os quais acabam assim que a utilização da clorexidina é interrompida).

A sua autorização é indispensável para a continuidade desta pesquisa. Em hipótese alguma, você será identificado publicamente. A identificação será apenas do conhecimento dos pesquisadores, que nada revelarão, por questões éticas.

De qualquer forma, você fica livre para, em qualquer momento, retirar o seu consentimento, deixando de participar do estudo.

Como benefícios pela participação no estudo, você receberá orientações sobre higiene bucal e serão realizadas profilaxia (limpeza dos dentes) e aplicação de flúor pelos pesquisadores, na própria Clínica da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR).

Eu, _____, RG: _____, representado legalmente pelo meu responsável (Pai/ Mãe/ Outro), declaro ter sido informado(a) verbalmente e por escrito, a respeito da pesquisa. Uma vez que foi garantido meu anonimato, concordo espontaneamente em participar da mesma, na qual o aparelho que utilizo será removido e terá seus microrganismos avaliados.

Curitiba, ____ de _____ de 2006.

Assinatura do responsável legal do participante

ANEXO V – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – GRUPO CONTROLE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

A pesquisa “Efeitos da clorexidina nos estreptococos totais formadores de biofilme do disjuntor palatal” se propõe a realizar uma avaliação dos efeitos da clorexidina (solução desinfetante) nos microrganismos que se formam ao redor do disjuntor palatal (aparelho superior para aumentar a largura do osso maxilar). Será conduzida pelo Mestrando Ivan Toshio Maruo, sob orientação da Prof.^a Dr.^a Elisa Souza Camargo e co-orientação do Prof. Dr. Edvaldo Antonio Ribeiro Rosa.

Para que se possa alcançar este objetivo, existe a necessidade de se formarem dois grupos de pacientes, um que utilize a clorexidina e outro que não a use, para compará-los entre si. Você foi escolhido para fazer parte do grupo que não utilizará a clorexidina. Ao final do seu tratamento, o aparelho disjuntor será removido e analisado laboratorialmente.

A sua autorização é indispensável para a continuidade desta pesquisa. Em hipótese alguma, você será identificado publicamente. A identificação será apenas do conhecimento dos pesquisadores, que nada revelarão, por questões éticas.

De qualquer forma, você fica livre para, em qualquer momento, retirar o seu consentimento, deixando de participar do estudo.

Como benefícios pela participação no estudo, você receberá orientações sobre higiene bucal e serão realizadas profilaxia (limpeza dos dentes) e aplicação de flúor pelos pesquisadores, na própria Clínica da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR).

Eu, _____, RG: _____,
representado legalmente pelo meu responsável (Pai/ Mãe/ Outro), declaro ter sido
informado(a) verbalmente e por escrito a respeito da pesquisa. Uma vez que foi
garantido meu anonimato, concordo espontaneamente em participar da mesma, na
qual o aparelho que utilizo será removido e terá seus microrganismos avaliados.

Curitiba, ____ de _____ de 2006.

Assinatura do participante ou responsável

ANEXO VI – FICHA CADASTRAL DOS PACIENTES DA AMOSTRA**PESQUISA: “EFEITOS DA CLOREXIDINA NOS ESTREPTOCOCOS TOTAIS FORMADORES DE BIOFILME DO DISJUNTOR PALATAL”****FICHA CADASTRAL**

Data do preenchimento da ficha: / /

Número do prontuário:

Mestrando e professor responsável:

Nome:

Gênero:

Idade:

Data de nascimento: / /

Diabetes:

☐ Sim

☐ Não

Problema cardíaco:

☐ Sim

☐ Não

Qual?

Passou por alguma infecção nos últimos 3 meses:

☐ Sim

☐ Não

Qual?

Utilizou antibiótico nos últimos 3 meses:

☐ Sim

☐ Não

Qual?

Utilizou outra solução bacteriostática ou bactericida:

☐ Sim

☐ Não

Qual?

Data de instalação do disjuntor palatal: / /

Data de remoção do disjuntor palatal: / /

Grupo:

☐ Clorexidina

☐ Controle

Observações:

ANEXO VII – FICHA DE CONTROLE DOS BOCHECHOS

Nome do paciente:

FICHA DE CONTROLE DOS BOCHECHOS DE CLOREXIDINA

Dia do mês	Dia da semana	Manhã 8:00h	Tarde 13:00h	Noite 22:00h

- 1) Cada frasco é o suficiente para 2 bochechos.
- 2) Bochechar a solução por 30 segundos após a refeição e a escovação.
- 3) Bochechar 3 vezes por dia.
- 4) Não engolir a solução.
- 5) A cada bochecho, marcar com um “X” na tabela acima. Caso não seja feito o bochecho, deixar em branco.
- 6) Qualquer irritação ou perda de paladar durante a realização dos bochechos é temporária e desaparece ao final de seu uso. Por isso, continue realizando os bochechos até a consulta de remoção do aparelho.
- 7) Pode ocorrer manchamento dos dentes, mas este desaparece com a limpeza realizada na consulta de remoção do aparelho.
- 8) Na consulta de remoção do aparelho, será feita a limpeza nos dentes e aplicação de flúor.

Em caso de dúvida, contatar: Dr. Ivan Maruo (41) 3271-1637 / (41) 9999-9999

Próxima consulta: / / às : (feira).

MUITO OBRIGADO POR SUA PARTICIPAÇÃO!

**ANEXO VIII – NORMAS PARA PUBLICAÇÃO – AMERICAN JOURNAL OF
ORTHODONTICS AND DENTOFACIAL ORTHOPEDICS**



Information for Authors

Electronic manuscript submission and review

The *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics* now uses *Editorial Manager*, an online manuscript submission and review system. To submit or review an article, please go to the **AJO-DO** Editorial Manager website: ees.elsevier.com/ajodo.

Send other correspondence to:

Dr David L. Turpin, DDS, MSD, Editor-in-Chief

American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics

University of Washington

Department of Orthodontics, D-569

HSC Box 357446

Seattle, WA 98195-7446

Telephone (206)221-5413

Fax (206)221-5467

E-mail: dlturpin@aol.com

General Information

The *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics* publishes original research, reviews, case reports, clinical material, short communications, and other material related to orthodontics and dentofacial orthopedics.

Submitted manuscripts must be original, written in English, and not published or under consideration elsewhere. Manuscripts will be reviewed by the editor and consultants and are subject to editorial revision. Authors should follow the guidelines below.

Statements and opinions expressed in the articles and communications herein are those of the author(s) and not necessarily those of the editor(s) or publisher, and the editor(s) and publisher disclaim any responsibility or liability for such material. Neither the editor(s) nor the publisher guarantees, warrants, or endorses any product or service advertised in this publication; neither do they guarantee any claim made by the manufacturer of any product or service. Each reader must determine whether to act on the information in this publication, and neither the *Journal* nor its sponsoring organizations shall be liable for any injury due to the publication of erroneous information.

Guidelines for Original Articles

Submit Original Articles via the online Editorial Manager: ees.elsevier.com/ajodo. Organize your submission as follows.

1. Title Page. Put all information pertaining to the authors in a separate document. Include the title of the article, full name(s) of the author(s), academic degrees, and institutional affiliations and positions; identify the corresponding author and include

an address, telephone and fax numbers, and an e-mail address. This information will not be available to the reviewers.

2. Abstract. Structured abstracts of 200 words or less are preferred. A structured abstract contains the following sections: Introduction, describing the problem; Methods, describing how the study was performed; Results, describing the primary results; and Conclusions, reporting what the authors conclude from the findings and any clinical implications.

3. Manuscript. The manuscript proper should be organized in the following sections: Introduction and literature review, Material and Methods, Results, Discussion, Conclusions, References, and figure captions. Express measurements in metric units whenever practical. Refer to teeth by their full name or their FDI tooth number. For style questions, refer to the *AMA Manual of Style*, 9th edition. Cite references selectively, and number them in the order cited. Make sure that all references have been mentioned in the text. Follow the format for references in "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" (Ann Intern Med 1997;126:36-47); <http://www.icmje.org>. Include the list of references with the manuscript proper. Submit figures and tables separately (see below); do not embed figures in the word processing document.

4. Figures. Digital images should be in TIF or EPS format, CMYK or grayscale, at least 5 inches wide and at least 300 pixels per inch (118 pixels per cm). Do not embed images in a word processing program. If published, images could be reduced to 1 column width (about 3 inches), so authors should ensure that figures will remain legible at that scale. For best results, avoid screening, shading, and colored backgrounds; use the simplest patterns available to indicate differences in charts. If a figure has been previously published, the legend (included in the manuscript proper)

must give full credit to the original source, and written permission from the original publisher must be included. Be sure you have mentioned each figure, in order, in the text.

5. Tables. Tables should be self-explanatory and should supplement, not duplicate, the text. Number them with Roman numerals, in the order they are mentioned in the text. Provide a brief title for each. If a table has been previously published, include a footnote in the table giving full credit to the original source.

6. Model release and permission forms. Photographs of identifiable persons must be accompanied by a release signed by the person or both living parents or the guardian of minors. Illustrations or tables that have appeared in copyrighted material must be accompanied by written permission for their use from the copyright owner and original author, and the legend must properly credit the source. Permission also must be obtained to use modified tables or figures.

7. Copyright release. In accordance with the Copyright Act of 1976, which became effective February 1, 1978, all manuscripts must be accompanied by the following written statement, signed by all authors:

"The undersigned author(s) transfers all copyright ownership of the manuscript [insert title of article here] to the American Association of Orthodontists in the event the work is published. The undersigned author(s) warrants that the article is original, does not infringe upon any copyright or other proprietary right of any third party, is not under consideration by another journal, has not been previously published, and includes any product that may derive from the published journal, whether print or electronic media. I (we) sign for and accept responsibility for releasing this material."

Scan the printed copyright release and submit it via the Editorial Manager, or submit it via fax or mail.

8. Conflict of interest statement. Report any commercial association that might pose a conflict of interest, such as ownership, stock holdings, equity interests and consultant activities, or patent-licensing situations. If the manuscript is accepted, the disclosed information will be published with the article. The usual and customary listing of sources of support and institutional affiliations on the title page is proper and does not imply a conflict of interest. Guest editorials, Letters, and Review articles may be rejected if a conflict of interest exists.

Other Articles

Follow the guidelines above, with the following exceptions, and submit via Editorial Manager.

Case Reports will be evaluated for completeness and quality of records, quality of treatment, uniqueness of the case, and quality of the manuscript. A highquality manuscript will include the following sections: introduction; diagnosis; etiology; treatment objectives, alternatives, progress, and results; and discussion. The submitted figures should include extraoral and intraoral photographs and dental models, panoramic radiographs and tracings from both pretreatment and posttreatment, and progress or retention figures as appropriate.

Short Communications should not exceed 2000 words, including the bibliography, and should include a minimal number of figures or tables. Priority will be given to communications relating to primary research data, preferably clinical but also basic. This section permits time-sensitive material to be published within 6 months of submission.

Techno Bytes items report on emerging technological developments and products for use by orthodontists.

Litigation, Legislation, and Ethics items report legal and ethical issues of interest to orthodontists.

Miscellaneous Submissions

Letters to the Editor and Ask Us questions and answers appear in the Readers' Forum section and are encouraged to stimulate healthy discourse concerning the profession. Send letters or questions directly to the editor, via e-mail: dlturpin@aol.com. Submit a signed copyright release with the letter, or fax or mail separately.

Brief, substantiated commentary on subjects of interest to the orthodontic profession is occasionally published as a Guest Editorial or Special Article. Send Guest Editorials or Special Articles directly to the editor, via e-mail: dlturpin@aol.com. Submit a signed copyright release with the editorial, or fax or mail separately.

Books and monographs (domestic and foreign) will be reviewed, depending on their interest and value to subscribers. Send books to the Editor of Reviews and Abstracts, Dr Alex Jacobson, University of Alabama School of Dentistry, 1919 7th Ave S, Box 23, Birmingham, AL 35294. They will not be returned.

Checklist for authors

____ Title page, including full name, academic degrees, and institutional affiliation and position of each author, and author to whom correspondence and reprint requests are to be sent, including address, business and home phone numbers, fax numbers, and e-mail address

____ Abstract

____ Article proper, including references and figure legends

____ Figures, in TIF or EPS format

____ Tables

____ Copyright release statement, signed by all authors

____ Photographic consent statement(s)

____ Conflict of interest statement

____ Permissions to reproduce previously published material