

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO ODONTOPEDIATRIA

EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DE  
CLOREXIDINA E FLUORETO DE  
SÓDIO SOBRE LESÕES DE CÁRIE  
ATIVAS NÃO CAVITADAS E ESMALTE  
HIGIDO SUBMETIDO A DESAFIO  
CARIOGÊNICO

*Tese de Doutorado*

*Ana Rita Duarte Guimarães*

FLORIANÓPOLIS  
2006

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO ODONTOPEDIATRIA**

**Ana Rita Duarte Guimarães**

**EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DE CLOREXIDINA E  
FLUORETO DE SÓDIO SOBRE LESÕES DE CÁRIE  
ATIVAS NÃO CAVITADAS E ESMALTE  
HÍGIDO SUBMETIDO A DESAFIO CARIOGÊNICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Odontologia-Área de Concentração Odontopediatria.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo de S. Vieira.

Co-Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Adriana Modesto.

**FLORIANOPOLIS  
2006**

# **EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DE CLOREXIDINA E FLUORETO DE SÓDIO SOBRE LESÕES DE CÁRIE ATIVAS NÃO CAVITADAS E ESMALTE HIGIDO SUBMETIDO A DESAFIO CARIOGÊNICO”**

**Ana Rita Duarte Guimarães**

**Orientador: Ricardo de Sousa Vieira**

**Co-Orientadora: Adriana Modesto G. da S. Vieira**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Odontologia – Área de Concentração Odontopediatria.

Aprovada por:

---

Presidente, Prof. Dr. Ricardo S. Vieira.

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Marisa Maltz

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Mônica Campos Serra

---

Prof. Dr. Sylvio Monteiro Junior

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Izabel Cristina Santos Almeida

**FLORIANÓPOLIS  
2006**

*A meus pais, Augusto e Ana.*

*A meus queridos filhos, Gabriel e João Victor.*

*A todas as pessoas que estiveram envolvidas,  
direta e indiretamente, nessa conquista.*

## AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao professor **Ricardo de Sousa Vieira**, meu orientador, não só pela dedicação e disponibilidade, mas pelo incentivo que sempre me foi dado.

Ao professor **Jaime Aparecido Cury**, que, além de colaborar com todo o seu conhecimento científico, sempre me serviu de referência como pesquisador, por sua competência, dedicação e ética.

Ao Professor **Marco Aurélio Peres**, outro exemplo de conduta profissional, que me fez enxergar a pesquisa clínica de forma mais criteriosa e abrangente.

A todos os participantes dos estudos apresentados nesta Tese, adolescentes, **alunos da Escola Estadual Pe. Anchieta**, bem como aos voluntários, pela confiança e perseverança necessárias à condução das pesquisas.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar força nesta conquista.

A meus pais e a meus filhos, pelo apoio e incentivo para vencer mais esta etapa e pela compreensão por tantas ausências....

À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), em todas as instâncias, especialmente à Pós-Graduação, por minha aceitação no Curso de Doutorado, possibilitado assim o meu crescimento profissional, não somente com as disciplinas teóricas, práticas e laboratoriais, também com o incentivo dado à produção científica e participação em eventos científicos de significativa relevância.

Ao orientador, Prof. Dr. Ricardo de Sousa Vieira, pelos ensinamentos passados e principalmente pela confiança que sempre depositou em mim. Nunca poderei agradecer o bastante!

À co-orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dra. Adriana Modesto, pela amizade, pelo incentivo e ensinamentos transmitidos desde o Mestrado.

Ao Prof. Dr. Marco Aurélio Peres, pelo muito que aprendi trabalhando sob sua co-orientação e pela ajuda na correção deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Jaime A. Cury, pela brilhante contribuição e co-orientação do trabalho *in situ* apresentado na Tese.

Aos Professores da Pós-Graduação em Odontopediatria da UFSC, Izabel, Joeci, Maria Jose, Ricardo e Vera, pelos conhecimentos teórico-práticos transmitidos ao longo do curso, bem como pelo exemplo de ética e conduta profissional, e a Rosa Maria, que trilhou conosco esta bonita trajetória.

À secretária da Pós-Graduação, Ana Maria, pelo profissionalismo e atenção com que sempre me auxiliou em todas as solicitações.

A Bete e Ivalda, sempre dispostas a nos ajudar e de forma tão carinhosa.

Às colegas de Doutorado em Odontopediatria, Carolina, Gimol, Mabel, Maria Letícia e Mariane, pelo convívio desses anos, pelas palavras carinhosas de incentivo e por sempre estarmos juntas.

À colega mineira, Maria Letícia Ramos-Jorge, pela parceria e amizade estabelecidas desde nosso primeiro contato, que frutificaram em trabalhos científicos realizados por nós e trocas de experiências em Odontopediatria e de vida!

Aos demais colegas de doutorado e mestrado, que ajudaram a tornar o caminho mais rico e divertido...

Aos professores da Fop-Unicamp, Dr. Jaime Cury, Altair Del Bel Cury e Cinthia Tabchoury, não só por me terem aberto as portas da Instituição, mas por tudo que aprendi com seus ensinamentos. E aos colegas, Giovana, Livia, Cecília, Adriana, Celso, Nilza, Maristela, Cristiana, Elaine e Carolina Aires, pelo muito que me ensinaram. Minha eterna gratidão!

A todos os funcionários do Laboratório da FOP-Unicamp, Mariza, Waldomiro e José Alfredo, pelo auxílio na condução dos experimentos.

À Dra. Professora Bente Nyvad, pela amizade e pelas preciosas sugestões e leitura crítica dos artigos.

Aos adolescentes que participaram do estudo clínico e aos voluntários do estudo *in situ*, pois sem vocês nada disso seria possível....

Aos meus colegas da Área de Odontopediatria da Universidade Estadual de Feira de Santana, Alessandra, Alexandre, Ana Isabel, Hervânia, Paulo, Ronald e Susana, pela confiança transmitida, que possibilitou minha dedicação exclusiva ao Curso.

À Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS) e a todos os colegas, professores e servidores que possibilitaram minha participação no Curso.

A Capes, pela importante ajuda, decisiva para a realização do Curso.

À Funpesquisa, por ter financiado o estudo clínico, mediante aprovação em Edital Público.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a minha participação nesse Curso de Doutorado.

*“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar... As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito”.*

**Chico Xavier**

*“É preciso beber na arte e na ciência para aprender a estranhar o habitual, para enxergar no óbvio o inusitado. As grandes descobertas surgiram do espanto diante do óbvio. Galileu Galilei tira a Terra do lugar porque duvida de que é o Sol que anda, apesar da nítida sensação de que é ele que se move sobre nossas cabeças. Van Gogh também não se contentou com o óbvio e fez nascer girassóis de todos os amarelos, até aqueles que nunca veremos em plantação alguma. Girassóis que transbordam da tela de tão amarelos que são. Salve Van Gogh, que fez os girassóis pularem em nosso colo. Van Gogh que anoitece o céu de Galileu a qualquer hora do dia, que pode nos dar uma noite estrelada em pleno meio-dia. Van Gogh viu diferente. Galileu viu diferente. Que eles, juntos, nos inspirem a ver e fazer um mundo diferente”.*

**Thelma Lopes**

*“O único homem que está isento de erros, é aquele que não arrisca acertar.”*

**Albert Einstein**



## RESUMO GERAL

Resumo da Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Odontologia, Área de Concentração: Odontopediatria, Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Odontologia.

A utilização de agentes químicos na prevenção da doença cárie fundamenta-se na relação que esta doença tem com a placa bacteriana, sugerindo sua efetividade na prevenção e tratamento dessa doença. Embora reconhecido o efeito antiplaca da clorexidina, o seu efeito adicional na ação preventiva e terapêutica dos enxaguatórios bucais fluoretados (F) ainda não é bem estabelecido, sendo este, o objetivo geral deste estudo. O trabalho foi conduzido em duas etapas: o estudo 1, *in vivo*, e o estudo 2, *in situ*, avaliaram o efeito adicional de clorexidina 0,12% (CHX) sobre NaF 0,05% em uma mesma solução, em controlar lesões de cáries ativas de esmalte. O estudo 2 ainda avaliou, simultaneamente, a paralisação e a progressão de lesões não-cavidades de cárie, e a composição bioquímica do biofilme dental formado na desmineralização do esmalte hígido, exposto a situação de alto desafio cariogênico. Apesar de verificada a paralisação das lesões ativas de carie com uso da solução testada, os resultados encontrados no estudo 1 não indicam que a adição de clorexidina aumentou o efeito “remineralizador” da solução de NaF. Adicionalmente, os do estudo 2, além de confirmarem os resultados do estudo 1, também não apresentaram inibição da desmineralização do esmalte, quando submetido a situações de alto desafio cariogênico..Os resultados confirmam os do ensaio clínico, existência de remineralização nos grupos com fluoreto, entretanto sem significância estatística. Também não se pôde indicar poder preventivo à desmineralização em situações de desafio cariogênico.

**Palavras-chave:** clorexidina, fluoreto, remineralização, desmineralização.

## GENERAL ABSTRACT

*Abstract* da Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Odontologia – Área de Concentração, Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Antimicrobial agents may inhibit bacterial metabolism and are associated with the prevention of dental caries. Because of the relationship between the disease and bacterial plaque, it has been suggested that an antimicrobial approach may be effective in preventing and treating dental caries. Although the anti-plaque effect of chlorhexidine has been well-established, the preventive and therapeutic effects that could be expected by adding it to fluoridated mouth rinses have yet to be established, and this was the general objective of the present study. This study on the effectiveness of adding 0.12% chlorhexidine (CHX) to a fluoridated solution (0.05% NaF) for the control of active enamel carious lesions was conducted in two stages: the first *in vivo* and the second *in situ*. The second part of the study simultaneously evaluated the arrestment and progression of non-cavitated carious lesions and the biochemical composition of the dental biofilm formed in the demineralization of sound enamel in situations of high cariogenic challenge. Despite the verified arrestment of active lesions of caries from group tested with CHX + F solution, in both phases of the study, results indicated that the addition of chlorhexidine failed to improve the efficacy of NaF solution in arresting caries; moreover, in the second phase, no inhibition of demineralization was found when enamel was exposed to cariogenic challenge. The findings are in consonance with those of the clinical trial: existence of “remineralization” in the fluoridated groups, although without statically significance.

**Key-words:** chlorhexidine, fluoride, remineralization, demineralization.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 CAPÍTULOS.....	16
2.1 ARTIGO 1.....	17
2.1.1 Versão em português.....	17
2.1.2 Versão em inglês.....	40
2.2 ARTIGO 2.....	63
2.2.1 Versão em português.....	63
2.2.2 Versão em inglês.....	84
3 CONCLUSÃO.....	105
REFERENCIAS.....	106
ANEXOS.....	109
Anexo 1.....	109
Anexo 2.....	110
Anexo 3.....	111
Anexo 4.....	113
Anexo 5.....	114
Anexo 6.....	115
Anexo 7.....	116
Anexo 8.....	117
Anexo 9.....	120
Anexo 10.....	122
Anexo 11.....	123
Anexo 12.....	124
Anexo 13.....	126
Anexo 14.....	127
APÊNDICE.....	128
Apêndice 1.....	128
Apêndice 2.....	129
Apêndice 3.....	130
Apêndice 4.....	131
Apêndice 5.....	132

## 1 INTRODUÇÃO

Atualmente, tem-se buscado uma melhor atuação na promoção e manutenção da saúde bucal, os profissionais têm deixado de praticar medidas estritamente curativas e/ou restauradoras, já que essas medidas, por si só, não revertem o quadro epidemiológico da doença cárie (KOCH; MODEER; RASMUSSEN, 1995).

Métodos preventivo-terapêuticos, principalmente a base de fluoretos têm sido empregados como auxiliares no controle da placa (CARVALHO; MALTZ, 1997). É crescente o número de pesquisas que buscam avaliar os diversos produtos químicos empregados como recursos auxiliares na higiene bucal (HEIMER; CRUZ, 1995; GUIMARÃES; MODESTO; VIEIRA, 2000). Os compostos fluoretados, devido ao baixo custo e reconhecida eficácia no controle da doença carie, são importantes agentes preventivos e terapêuticos, pois, além de ativar a remineralização do esmalte dental induzida pelo cálcio e fosfato, inibem a desmineralização, diminuindo a dissolução do cristal de apatita, quando presentes na saliva, além de possuir alguma ação antimicrobiana (CURY, 2001). Vários métodos para potencializar o efeito cariostático do fluoreto em baixos níveis de pH têm sido sugeridos, dentre outros, a combinação de fluoreto com antimicrobianos (BÜYÜKYILMAZ; ÖGAARD; DAHM, 1995).

A utilização de agentes químicos na prevenção da doença cárie fundamenta-se na relação que esta doença tem com a placa bacteriana, sugerindo sua efetividade na prevenção e tratamento da doença carie. Uma abordagem antimicrobiana foi proposta para a prevenção e controle de doenças bucais, particularmente em pacientes de alto risco (MARSH, 1994). Clorexidina (CHX) é o agente antimicrobiano de referência usado em tratamentos antiplaca (ROLLA; MELSEN, 1975; CAUFIELD et al., 2001). Ao seu favor estaria o fato de que qualquer redução da placa bacteriana é benéfica se realizada de forma saudável, especialmente em situações em que o controle mecânico realizado pelo indivíduo é difícil de ser alcançado e, muitas vezes, é inadequado. Assim, os agentes químicos seriam adjuntos ao controle da placa. Por outro lado, o seu uso poderia perturbar o equilíbrio ecológico dentro da cavidade bucal, podendo desenvolver resistência entre

algumas espécies microbianas. Entretanto, não existem evidências de que o uso rotineiro dos agentes químicos para a placa bacteriana tenha resultados adversos perceptíveis ou benéficos à saúde. (SCHIE, 2005).

Apesar de possuir amplo espectro de atuação, a clorexidina possui ação específica contra estreptococos do grupo *mutans* podendo, portanto, ser utilizada na prevenção da cárie dentária. Por causa da sua poderosa ação bactericida contra *S. mutans*, a clorexidina tem sido estudada com relação à sua capacidade de reduzir cáries especialmente em indivíduos de alto risco (KATZ, 1982). No biofilme dental pós-clorexidina, há maior quantidade de microorganismos como o *A. Viscosus* e *S. Sanguis*, que competem com o *S. mutans* durante a recolonização, originando um biofilme menos cariogenico e que permanece assim por períodos prolongados (VAN LOVEREN et al., 1996). A clorexidina reconhecidamente inibe a produção de ácido na placa e assim, reduz a queda de pH durante os desafios cariogênicos (ROLLA; MELSSSEN, 1975). O gluconato de clorexidina, utilizado em bochechos, reduz significativamente a população de bactérias aeróbias e anaeróbias da cavidade bucal (BARROS et al., 1998), constituindo-se, portanto, em um importante recurso terapêutico em pacientes com alto risco/atividade às doenças cárie e periodontal (SPLIETH et al., 2000; BOTELHO, 2000).

Um efeito antimicrobiano imediato ocorre após um simples bochecho com clorexidina (CHX) (SCHIÖTT, 1973). Como um resultado do efeito antimicrobiano direto, a CHX reduz a atividade metabólica da placa bacteriana. Isso é mostrado pela diminuição da queda do pH na placa bacteriana após estímulo com glicose e sacarose (SANDHAM; BROW; CHAN, 1998). A CHX apresenta o melhor efeito clínico antiplaca do que de outros agentes antimicrobianos, possivelmente graças à substantividade da CHX, fazendo com que ela retenha seu efeito antimicrobiano, mesmo quando adsorvida às superfícies dentárias. Entretanto, pouco ou nenhum efeito cariostático foi encontrado em estudos conduzidos em humanos, com a aplicação da CHX como parte do cuidado caseiro individual, na forma de bochecho ou durante a escovação (KLOCK; KRASSE, 1978). Por outro lado, a aplicação profissional de CHX, combinada a um regime profilático rigoroso incluindo instrução de higiene bucal, aconselhamento da dieta, profilaxia dentária profissional e aplicação tópica de verniz fluoretado, reduziu o desenvolvimento das lesões de cáries em crianças durante os três anos do estudo (ZICKERT; EMILSON; KRASSEB, 1982).

Uma meta - análise de estudos clínicos do uso de clorexidina para a prevenção de cárie em participantes de 11 a 15 anos com níveis de *S. mutans*  $> 2,5 \times 10^5$  /ml saliva (VAN RIJKOM; TRUIN; Van't HOFMA, 1996) indica que o seu efeito inibidor de cárie é de 46%. Contudo, os resultados são variáveis e difíceis de comparar por causa da diferença nos métodos de registro, severidade das lesões de cárie, níveis de risco iniciais, concentrações, frequência e método de aplicação dos agentes terapêuticos (ANUSAVICE, 2001). Embora seu efeito anticariogênico ainda seja inconclusivo, CHX é muito importante porque suprime a proporção de bactérias relacionadas à doença e diminui a formação ácida, dessa forma, permitindo e aumentando o efeito remineralizador do fluoreto (TWETMAN, 2004).

A associação pode ser indicada especialmente para pacientes refratários aos métodos usuais de prevenção da doença cárie, por exemplo, pacientes com hipossalivação ou quaisquer outras situações em que o equilíbrio entre desmineralização e remineralização esteja comprometido, como em pacientes que apresentem inabilidade em remoção mecânica da placa (CHIKTE et al., 1991), ou que façam uso de medicações que interferem no fluxo salivar. Seria uma parte integrante da higiene bucal de uso domiciliar de pacientes com alta susceptibilidade à doença cárie, tais como os irradiados, portadores de próteses ou aparelhos ortodônticos e os que possuem lesões de cárie radiculares (HEIMER; CRUZ, 1995). Também poderia ser benéfico na prevenção da transmissão de *S. mutans* para crianças, especialmente entre a principal fonte, a mãe, para seu filho (KÖHLER; ARDREE; JONSSON, 1994; TENOVUO et al., 1992).

Os poucos estudos que se detiveram no efeito da prevenção da doença cárie da associação de fluoreto e clorexidina, o fizeram ou através de medidas de incremento de cárie, de contagens de microorganismos cariogênicos, como o *S. mutans* e lactobacilos (KELTJENS et al., 1987; KELTJENS et al., 1990; SPETS-HAPPONEN et al., 1991; ÖGAARD et al., 1997; TWETMAN; PETERSSON, 1997a; TWETMAN; PETERSSON, 1997b; PETERSSON et al., 1998) ou através de microrradiografia, avaliando a perda mineral (ULLSFOSS et al., 1994). Assim, faz-se necessária a avaliação da efetividade do uso de soluções químicas no processo de “remineralização” ou paralisação de lesões cariosas, através do controle químico do biofilme bacteriano, e em situações de alto desafio cariogênico e condições verossímeis com as que ocorrem na cavidade bucal, desde quando a

desmineralização e a remineralização ocorrem concomitantemente, as pesquisas deveriam considerar os dois aspectos ao mesmo tempo (BAELUM et al., 2003).

A hipótese do trabalho é que a associação de clorexidina a 0,12% ao fluoreto de sódio a 0,05% iniba a produção de ácido na placa e assim, reduz a queda de pH durante os desafios cariogênicos. Desta forma, a combinação de clorexidina ao fluoreto aumentará a sua ação terapêutica em lesões de cárie ativas não cavitadas de esmalte e também no segundo estudo, potencialize a sua capacidade preventiva em esmalte exposto a situações de alto desafio cariogênico.

## 2 CAPÍTULOS

Esta tese está baseada na Informação PPPG/001/98/UFSC que regulamenta o formato alternativo para tese de Doutorado e permite a inserção de artigos científicos de autoria ou co-autoria do candidato. Desta forma, esta tese é composta de dois artigos, os quais se encontram em fase de submissão para publicação em revistas científicas, conforme descrito abaixo:

### 2.1 ARTIGO 1

**2.1.1 Artigo 1 em Português** – Eficácia de Duas Soluções de Bochecho em Lesões de Cárie de Esmalte Ativas Não-cavidadas: um Estudo Clínico.

**2.1.2 Artigo 1 em Inglês** – Effectiveness of Two Mouth Rinses in Arresting Caries Lesions: a Short-term Clinical Study.

### 2.2 ARTIGO 2

**2.2.1 Artigo 2 em Português** – Efeito de Solução contendo Fluoreto e Clorexidina na Desmineralização e na Remineralização: um estudo *in situ*.

**2.2.2 Artigo 2 em Inglês** – Effect of Mouthrinse Containing Fluoride and Chlorhexidine on Enamel Demineralization/Remineralization: an *in situ* Study.



## **2.1 ARTIGO 1**

### ***2.1.1 Versão em português***

## **Avaliação da Eficácia de Duas Soluções de Bochecho em Lesões de Cárie de Esmalte Não-cavitadas: Um Ensaio Clínico**

A. R. D. Guimarães<sup>a,b</sup>, R. S.Vieira<sup>b</sup>, M. A. Peres<sup>c</sup>, M. L. Ramos-Jorge<sup>b</sup>, A. Modesto<sup>d</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Saúde, UEFS, Bahia, Brasil; <sup>b</sup> Programa de Pós-Graduação em Odontologia (Odontopediatria), UFSC, Brasil; <sup>c</sup> Departamento de Saúde Pública, UFSC, Brasil; <sup>d</sup> Departamento de Odontopediatria e Ortodontia, UFRJ, Br

**Correspondência:**

**Prof. Dr. Ricardo de Sousa Vieira**

**Departamento de Estomatologia – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário – Trindade 88010-970 Florianópolis, SC, Brasil.**

## RESUMO

O objetivo deste estudo clínico duplo-cego foi avaliar clinicamente o efeito adicional de clorexidina 0,12% (CHX) a NaF 0,05% em uma solução em controlar lesões de cáries ativas de esmalte após 28 dias. Uma amostra de 170 escolares, dentro dos critérios de inclusão, foi dividida em dois grupos aleatoriamente selecionados de 85 crianças de 11-15 anos. As crianças bochecharam uma vez sob supervisão 1 min por dia durante 28 dias com 15 mL de solução (Grupo 1: NaF 0,05%; Grupo 2: NaF 0,05% + CHX 0,12%). Após escovação supervisionada, as crianças eram examinadas duas vezes, ao início e ao final do estudo. Os dentes eram secos com ar comprimido por 15s, isolados relativamente, iluminados com refletor e então todas as superfícies lisas eram examinadas clinicamente por um único examinador, previamente calibrado ( $\kappa= 0,7$ ). A superfície era considerada ativa (A) se parecesse opaca, enrugado e sem brilho, e inativa (I) se parecesse plana, brilhante e com algum grau de descoloração, com margem gengival saudável. A frequência de superfícies A e I foi calculada como a diferença entre o número de superfícies ativas ao início e ao término do estudo. Os dois grupos não diferiram com respeito à idade e sexo ( $p > 0,05$ ; Mann-Whitney U test), tampouco com relação ao número de lesões de superfície lisas ( $6,49 \pm 4,45$  - G1,  $6,55 \pm 4,23$  - G2, respectivamente) encontradas no início do estudo. As proporções de controle das lesões foram 84,4% (Grupo 1) e 85,3% (Grupo 2) ( $p = 0,71$ ; ns.). Embora, ambas as soluções apresentassem alta proporção de controle de lesões, a adição de clorexidina não aumentou o efeito “remineralizador” da solução de NaF. (Suporte financeiro: FUNPESQUISA 337/2002).

## INTRODUÇÃO

A doença cárie resulta de um desequilíbrio entre o fenômeno da des e remineralização. Em situações de alto desafio cariogênico, o pH intra-bucal fica abaixo de 4, 5, e a fase de “remineralização” é inibida [THYLSTRUP, FEJERSKOV, 1986]. Nessas condições, e disponibilidade de mais fluoreto não irá, necessariamente, prover um melhor efeito cariostático [ÖGAARD et al., 1991]. Vários métodos para potencializar o efeito cariostático do fluoreto em baixos níveis de pH têm sido sugeridos, dentre outros, a combinação de fluoreto com antimicrobianos [BÜYÜKYILMAZ et al., 1995]. A clorexidina, um potente agente antimicrobiano, inibe a produção de ácido na placa dental, reduzindo a queda de pH durante os desafios cariogênicos [ROLLA, MELSEN, 1975].

O pH da placa dental rapidamente cai após a exposição à sacarose e permanece baixo por um período variável de tempo antes de lentamente retornar ao nível inicial. O pH dos indivíduos com elevada atividade de caries tem-se mostrado menor [STEPHAN, 1944], em particular quando placa dental está associada com lesões de mancha branca ou lesões profundas de caries [FEJERSKOV et al., 1992].

Estudos clínicos têm relatado um efeito sinérgico contra estreptococos do grupo *mutans* quando é usada uma combinação de clorexidina e fluoreto [LUOMA, 1972; EMILSON et al., 1976]. Em razão de sua poderosa ação bactericida contra o *S mutans* e sua capacidade de reduzir a incidência de cáries [ZICKERT et al., 1983], a clorexidina tem sido muito estudada, especialmente em indivíduos com alto risco a doença cárie [para meta-análise, ver VAN RIJKOM et al., 1996]. Contudo, estudos com limitações metodológicas, (estudos não controlados, com inadequado número de participantes ou formado por populações heterogêneas) têm sido desenvolvidos para identificar a combinação ideal de fluoreto e clorexidina para o controle da doença carie.

Foi realizada uma busca ao Medline, restringindo-se aos ensaios clínicos, porém sem restrição de idioma de publicação e usando como palavras chave, termos como: “fluoride-chlorhexidine”, “chlorhexidine-fluoride”, “fluoride combined chlorhexidine”, “chlorhexidine combined fluoride”, “fluoride with chlorhexidine” and

“chlorhexidine with fluoride”. Vinte ensaios clínicos randomizados, publicados entre 1966 e 2002, foram identificados. Onze deles se referiam exclusivamente à prevenção de doença periodontal, enquanto que um investigava a força de adesão de brackts ortodômicos e, somente os demais se referiam à prevenção da doença cárie [KELTJENS et al., 1987; KELTJENS et al., 1990; SPETS-HAPPONEN et al., 1991; ULLSFOSS et al., 1994; ÖGAARD et al., 1997; TWETMAN, PETERSSON, 1997a; TWETMAN, PETERSSON, 1997b; PETERSSON et al., 1998]. Os estudos selecionados analisaram o efeito da associação de fluoreto a clorexidina na prevenção de carie dental, baseando-se em medidas de decréscimo da doença, em ou contagens de microrganismos cariogênicos como *S. mutans* e *Lactobacillus*. Não há dados disponíveis que reportem o efeito da adição de clorexidina ao fluoreto na monitorização da atividade das lesões de cárie, ou seja, na paralização das lesões ativas de cárie.

Este trabalho teve como objetivo considerar clinicamente o efeito adicional da clorexidina a 0,12% ao fluoreto de sódio a 0,05%, numa mesma solução para bochecho, e comparar a capacidade de fluoreto de sódio a 0,05% isoladamente em controlar lesões ativas de carie em superfícies lisas livres de esmalte durante 28 dias de bochechos em escolares que não estavam recebendo outra intervenção preventiva no período estudado.

## MÉTODOS

### ***a) População estudada***

O presente estudo foi realizado em uma escola pública em Florianópolis, Brasil. A população estudada consistiu de adolescentes, entre 11 a 15 anos de idade, matriculados na escola. A média do índice de CPO-D foi 1,4 foi encontrada através de um estudo epidemiológico de cáries dentais realizado em 2002 na mesma escola, usando-se os critérios estabelecidos pela Organização de Saúde Mundial [WHO, 1997], envolvendo todos os escolares entre 11 e 12 anos. [BASTOS et al., 2004].

O protocolo de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Revisão Institucional da Universidade Federal de Santa Catarina (Protocolo No. 154/2002), como também

pelas autoridades educacionais pertinentes, anteriormente ao início do estudo. Uma carta foi enviada aos pais ou guardiões dos escolares explicando o propósito do estudo, suas características e sua importância, e pedindo seu acordo à participação do menor. Pais que concordaram que na participação de seus filhos assinaram um termo de consentimento.

### ***b) Critério de elegibilidade***

Trezentos e dezesseis escolares que tivessem ao menos uma lesão não-cavitada ativa, em superfície de esmalte lisa livre (vestibular/lingual). Entretanto, foram excluídos cento e quarenta e seis adolescentes, devido ao critério de exclusão adotado: uso de *brackets* ortodônticos, prótese dental, restauração estética em anteriores, gravidez ou amamentação, ou recusa do adolescente ou do seu guardião na participação do estudo (23 adolescentes). Um total de cento e setenta escolares atendeu aos critérios de inclusão e participaram do estudo.

### ***c) Desenho do Estudo***

Tratou-se de um ensaio clínico randomizado duplo-cego, cujos participantes estavam distribuídos randomicamente em dois grupos.

### ***d) Tamanho da amostra e poder do cálculo***

O tamanho de amostra foi calculado para detectar uma diferença de 20% na proporção de lesões de cáries 'paralisadas' entre os grupos como segue: um nível de alfa de 0,05 (5%), um poder de teste de 80%, uma proporção de 70% de paralisação nos indivíduos expostos a bochechos supervisionados com solução de fluoreto de sódio a 0,05% após 28 dias (grupo controle), e uma proporção de 90% de paralisação no grupo teste. Foi calculado para cada grupo um tamanho de amostra de 71 indivíduos e adicionados mais 15% de crianças para compensar para possíveis perdas posteriores. Então, cada grupo consistiu de 82 indivíduos. O programa de software Epiinfo [DEAN et al., 1994] foi usado para calcular o tamanho de amostra.

### ***e) Randomização e Mascaramento***

Um método de randomização foi usado para formar os grupos. Um número foi dado a cada adolescente elegível e posto em um envelope opaco fechado hermeticamente. Os envelopes foram selecionados aleatoriamente pelo supervisor (MLRJ) alocando assim os indivíduos nos dois grupos: solução de fluoreto de sódio a 0,05% sozinho ou combinado a clorexidina a 0,12%. Duas soluções puras de mesma formulação farmacológica foram usadas, diferindo entre si unicamente pela presença ou ausência de clorexidina a 0,12% nas soluções B e A, respectivamente. As soluções foram colocadas em recipientes idênticos de cor âmbar sem etiqueta, codificadas em A e B. Nem os adolescentes elegíveis, nem os supervisores dos bochechos diários, nem o examinador sabiam o conteúdo das soluções. Um único examinador realizou os exames clínicos e também não sabia a qual grupo o escolar tinha sido alocado.

### ***f) Bochechos***

Uma equipe odontológica orientou que os adolescentes enxaguassem com a 15 mL de solução por um minuto ao dia durante 14 dias escolares consecutivos que representava na prática um período médio de tratamento de 28 dias. Os outros componentes comuns às duas soluções eram: fluoreto de sódio a 0,05%, glicerina, aroma de anis não-cariogênico, corante azul, conservante e veículo qsp.

As soluções foram especialmente preparadas para o estudo, com a mesma cor, sabor e aroma artificial. De acordo com o fabricante (Fórmula & Ação, São Paulo, Brasil), o sabor anis disfarça eficazmente o gosto amargo da clorexidina.

### ***g) Pessoal e treinamento***

A equipe consistiu de coordenador (MAPA), dois investigadores e quatro estudantes de Odontologia. O investigador principal (ARDG) examinou clinicamente as lesões de carie, o segundo (MLRJ) coordenou a escovação e bochechos diários supervisionados pelos estudantes que transferiram os dados clínicos dos participantes para os seus cartões de registro. A escovação foi executada sem o uso de dentifrícios desde os produtos brasileiros contêm LSS (lauril sulfato de sódio),

que inativa a CHX, requerendo um intervalo mínimo de 30 minutos entre a escovação e os bochechos [BARKVOLL et al, 1989] que seria uma interrupção que prejudicaria muito a rotina dos escolares. Embora um efeito da água fluoretada, concentração de fluoreto na água e no dentifrício fossem esperados na paralisação das lesões de cáries, os dois grupos foram distribuídos aleatoriamente a estas variáveis e as quaisquer outras influências que também foram distribuídas ao acaso.

Entretanto, é importante salientar que além dos bochechos realizados, o estudo também utilizou a escovação supervisionada, ou seja, foi avaliada a ação química dos bochechos precedidos pela escovação supervisionada, ou seja, remoção mecânica da placa.

#### ***h) Calibração e confiabilidade intra-inter examinador***

Constituíram etapa prévia do estudo a calibração intra-examinador, o treinamento do investigador principal e anotador e um estudo piloto com um grupo de indivíduos de semelhante faixa etária da população estudada. Durante a coleta dos dados, foram realizados exames em duplicata em 10% da amostra para verificar a concordância de diagnóstico intra-examinador,

O investigador principal (ARDG) e anotador (RMF) foram treinados pelo coordenador (MAP) em exercícios de calibração usando a metodologia descrita por Peres et al. (2001). O único examinador (ARDG), calibrado com alto grau de confiabilidade intra-examinador, realizou todos os exames clínicos ( $\kappa = 0,7$ ). Outro dentista (RSV), que não participou na coleta de dados deste estudo, foi o padrão de referência. Antes do trabalho de campo, o examinador foi instruído e calibrado, adotando critérios de atividade de lesões de cárie sugeridos por Nyvad et al. [1999].

#### ***i) Exames clínicos e desfecho***

Dois exames dentais foram realizados, o primeiro no começo e o segundo ao final do estudo. Antes dos exames dentais, os escolares escovaram os dentes sob supervisão de um estudante de Odontologia, com escovas de dente, providenciadas pela equipe de pesquisa, sem uso de dentifrício. Os dentes foram secos então com ar comprimido por 15 segundos, mantidos por constante aspiração de saliva e

iluminados com refletor antes de serem examinados. Se o examinador ainda verificasse placa insuficientemente removida, essas superfícies dentais eram limpas com suavidade com auxílio do lado da sonda e gaze. Os exames dentais foram feitos em superfícies limpas, secas e iluminadas usando espelhos clínicos em uma sala reservada especificamente para esse fim.

Cada superfície lisa foi examinada e diagnosticada de acordo com os critérios para lesões não cavitadas, previamente descritos por Nyvad et al. [1999] and Pinelli et al. [2002].

Código	Condição Clínica	Características Clínicas
(A)	Lesão de cárie ativa (não-cavitadas)	Superfície de esmalte opaca, rugosa.
(I)	Lesão de cárie inativa (não-cavitadas)	Superfície de esmalte lisa e brilhante com graus de descoloração variando do branco ao marrom.

Se a mancha branca estivesse situada longe de uma margem gengival saudável, era considerada uma lesão paralisada [PINELLI et al., 2002; MALTZ et al., 2003]. Este critério diagnóstico clínico mostrou-se confiável e com validade preditiva para estágios diagnósticos de atividade de lesões de cáries não-cavitadas [NYVAD et al., 2003].

Apos satisfazer os critérios de inclusão, o adolescente era então alocado randomicamente ao grupo teste ou controle, como descrito acima. O segundo exame seguiu o mesmo critério. Foi considerado absenteísmo quando um participante não completava o número de bochechos agendados ou não comparecia ao exame clínico final. Ao término do estudo, esses adolescentes cujas lesões de cárie não haviam sido paralisadas ou que tivessem outras necessidades odontológicas foram encaminhadas às clínicas odontológicas da UFSC ou para postos públicos de saúde.

#### ***j) Tratamento dos dados e análise estatística***



A confiabilidade de examinador foi aferida pelo teste de *kappa*, superfície por superfície.

Foram usados os testes de *Mann Whitney U* e de Qui-quadrado para avaliar as diferenças nas variáveis no começo do estudo e as diferenças entre superfícies paralisadas entre os dois grupos após a pesquisa. As médias, desvio padrão e quartis das lesões ativas no início e ao final do estudo eram calculados dentro do mesmo grupo (G1 e G2). A diferença entre lesões ativas clinicamente identificadas ao início e ao término do estudo foi testada usando-se o *Wilcoxon matched pairs test*. O programa de software SPSS foi usado para a análise.

## RESULTADOS

Foram recrutados cento e setenta participantes para o estudo, igualmente distribuídos entre os dois grupos. Todos os participantes permaneceram no estudo até sua conclusão (Fluxograma 1).

A Tabela 1 confirma que as possíveis variáveis confundidoras como gênero e idade foram uniformemente equilibrados entre o grupo de estudo (solução de bochecho de fluoreto de sódio 0,05% combinada a clorexidina 0,12% - G1) e o grupo controle (solução de bochecho de fluoreto de sódio 0,05% - G2). Além disso, o número médio de superfícies que mostram lesões ativas não foi significativamente diferente entre os dois grupos ao início do estudo (6,49 e 6,55; respectivamente).

Ambos os grupos (G1 e G2) mostraram redução altamente significativa em número médio de lesões ativas e em todos os quartis da distribuição de frequência durante o período estudado (Tabelas 2 e 3).

A Tabela 4 mostra que após 14 dias, as proporções de paralisação foram elevadas nos dois grupos (84,4% e 85,3% para G1 e G2, respectivamente,  $p = 0,71$ ; não significante). Quando o número médio de superfícies paralisadas foi comparado, G1 e G2 apresentaram valores semelhantes (5,54 e 5,52; respectivamente). O absenteísmo dos participantes que poderia ter modificado os resultados foi quase idêntico nos dois grupos.

## DISCUSSÃO

### **a) Achados principais**

Ao final do estudo, aproximadamente, 80% de paralisação das lesões de cárie dental foi observada em ambos os grupos. O número médio de superfícies paralisadas também se apresentou semelhante nos grupos. Conseqüentemente, a adição de clorexidina não aumentou o efeito do fluoreto em paralisar a atividade das lesões de cárie. Não foi identificado nenhum estudo clínico que analisasse proporções de transição de lesões de cáries do estado ativo ao inativo ao usar fluoreto combinado com agentes antimicrobianos. Esta pesquisa mostrou elevada proporção de paralisação em ambos os grupos (Tabela 2), mas não mostrou diferença entre as soluções, ao contrário de relatórios prévios [LUOMA et al., 1978; SPETS-HAPONEN, 1991]. A discussão das altas proporções encontradas de lesões ativas a inativas fica comprometida devido à escassez de dados na literatura. Ao avaliar o tratamento de fluoreto tópico em adolescentes jovens também verificaram altas taxas, em maior concordância com as que foram encontradas no presente estudo [BAELUM et al., 2003]. Altas taxas de remineralização *in vitro* durante um pequeno tempo de avaliação foram também verificadas após o tratamento com fluoreto tópico: 1,8%/dia durante um mês [LANGERWEIJ, ten CATE, 2002] e 5%/dia, durante 9 dias [GOORHUIS, PURDELL-LEWIS, 1986], provavelmente porque o maior aumento de remineralização acontece nas primeiras duas semanas [IJIMA et al., 1999].

### **b) Aspectos positivos e limitações do estudo**

Há uma maior prevalência de lesões de cárie não-cavidadas ou pré-cavidadas em relação às cavidadas, principalmente em países economicamente desenvolvidos [ISMAIL, 1997; AMARANTE et al, 1998; ISMAIL, 2004]. Florianópolis tem maiores nível socioeconômico e indicadores de saúde do que o Brasil como um todo. Além disso, contribuem para a existência de uma menor prevalência e severidade de cáries dentais, a provisão de água fluoretada e os dentifrícios fluoretados, distribuídos em bases regulares [MARCENES et al., 2001].

Outras fontes de fluoreto, por exemplo, dentifrício fluoretado usado em casa e maior atenção à limpeza dental como resultado da participação no estudo, certamente poderiam ter contribuído para alcançar os resultados positivos

encontrados nesta pesquisa. Além disso, é importante notar que foram observadas taxas relativamente mais altas de paralisação tem sido observadas em superfícies lisas livres comparadas às outras superfícies, devido potencialmente à abrasão da escovação [BAELUM et al. 2003]. Estes fatos podem ser partes da explicação para maiores taxas de paralisação registradas neste estudo. O delineamento, método de randomização, mascaramento e elevada confiabilidade intra-examinador utilizados conferem ao estudo forte validade interna. Ambas as soluções de bochecho foram formuladas de forma mais idêntica possível quanto às características físicas, como cor, sabor, aroma e peso, diferindo unicamente pelo agente farmacológico ativo. As soluções foram especificamente preparadas para o estudo, porém sem quaisquer vínculos com o fabricante para evitar conflitos de interesse.

A subjetividade inerente do exame clínico pode ser evitada usando condições de critérios claramente definidos para medir a progressão das lesões de cárie [ISMAIL, 2004]. Adicionalmente, o caráter duplo-cego adotado pode ter evitado vieses de detecção. O exercício de calibração adotado assegurou elevado grau de confiabilidade intra e inter examinador achado neste estudo e em consonância com estudos prévios que adotaram os mesmos procedimentos [NYVAD et al. 1999, PINELLI et al., 2002]. Os métodos diagnósticos quantitativos não foram usados porque apresentam baixa sensibilidade e moderada especificidade [ISMAIL, 1997; BADER et al., 2002] e até que os métodos emergentes realmente provem superioridade aos métodos diagnósticos convencionais como exames clínicos, não deveriam ser recomendados para a prática clínica [NYVAD, 2004].

A heterogeneidade dos estudos, quanto ao delineamento e as medidas de desfecho, publicados na literatura com relação à eficácia de clorexidina no controle de lesões de cárie pode ter prejudicado a discussão dos presentes achados.

Ekstrand et al. [2005] avaliaram o julgamento táctil-visual de lesões de cáries dentais e os examinadores mostraram dificuldades relacionadas às características visuais e tácteis das lesões e tomadas de decisões considerando a atividade de lesão, o acordo intra-examinador foi apenas razoável, enquanto que a reprodutibilidade inter-examinador foi normalmente pobre e especulando-se que 3-4 semanas usadas no estudo-piloto pode ser muito pequeno para avaliar mudança na atividade de lesões. Entretanto, em lesões de cáries provocadas, sinais de regressão foram percebidos, *in vitro*, após 1 semana [HOLMEN et al., 1987; THYLSTRUP et al., 1994], assim foi esperado que em lesões ativas em

circunstâncias naturais, mudanças visuais e tácteis poderiam também ser percebidas após 3-4 semanas [THYLSTRUP et al., 1994].

Em situações especiais, higiene oral satisfatória é excepcionalmente difícil ser executada e há mesmos casos, que precisa ser executada por outra pessoa que não o paciente. Além disso, os autores consideraram que pacientes que apresentam atividade de lesões de cárie em superfícies, especialmente linguais, deveriam ser considerados como de risco. Conseqüentemente, higiene oral poderia ser melhorada adicionando o uso de agentes de antimicrobianos para controlar atividade de lesões de cáries.

Várias são as possíveis explicações para a inexistência de diferença entre as duas soluções pesquisadas quanto à capacidade de paralisação de lesões de cáries ativas. Inicialmente, achados anteriores demonstraram o limitado efeito bactericida em que, 90 minutos após o bochecho, nenhuma inibição adicional da atividade metabólica da placa dental foi observada [GIERTSEN, SCHIE, 1995].

Estudos com o objetivo de avaliar a capacidade da clorexidina em proteger o esmalte contra desmineralização podem ser mais adequados para avaliar a efetividade de CHX [ten CATE, MARSH, 1994], contrariamente ao que foi realizado neste estudo que pretendeu avaliar o efeito terapêutico da combinação entre clorexidina e fluoreto em paralisar lesões de cáries ativas. Esta afirmação baseia-se no mecanismo de ação de clorexidina que consiste principalmente na interferência do metabolismo bacteriano, produzindo assim, subseqüentemente, efeito na desmineralização do esmalte. Não foi o propósito deste estudo, a avaliação de lesões inativas ou superfícies híginas.

## **CONCLUSÃO**

A clorexidina não evitou o efeito “remineralizador” reconhecido do fluoreto, nem sua presença adicionou efetividade do fluoreto em controlar lesões ativas de carie em superfícies lisas livres de esmalte. Conseqüentemente, baseado no presente estudo clínico não seria recomendada a adição de clorexidina as soluções de bochecho a base de NaF para o controle de lesões de cáries ativas.

## **AGRADECIMENTOS**

Esta pesquisa foi patrocinada pela FUNPESQUISA (337/2002), da Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil. Os autores gostariam de agradecer aos estudantes de Odontologia: Rodrigo Melin, Noah Vanti, Frederico Pereira, Luciana Kamimura, Andreia Cascaes, Anderson de Bom, Leonardo Mezzari, Adalberto Eyng, Donavan Soares, Sara Apolinario, Mariana Minamisako, André Carneiro que ajudaram na pesquisa de campo, e Ana Nere Santos pelo suporte técnico. Os autores também gostariam de agradecer as autoridades educacionais locais, professores, e ao Prof. Dr. Jaime A. Cury (FOP-UNICAMP) pela leitura crítica e sugestões. As escovas dentais usadas nessa pesquisa foram gentilmente cedidas pela Condor.

## REFERÊNCIAS\*

AMARANTE E, RAADAL M, ESPELID I. Impact of diagnostic criteria on the prevalence of dental caries in Norwegian children aged 5 and 18 years. *Comm Dent Oral Epidemiol* 1998; 26(2): 87-94.

BADER JD, SHUGARS DA, BONITO AJ. A systematic review of the performance of methods for identifying carious lesions. *J Public Health Dent* 2002; 62: 201-213.

BAELUM V, MACHIULSKIENE V, NYVAD B, RICHARDS A, VÆTH M. Application of survival analysis to caries lesion transition in interventional trials. *Community Dent Oral Epidemiol* 2003; 31: 252-260.

BARKEVOLL P, ROLLA G, SVENDSEN K. Interaction between chlorhexidine digluconate and sodium lauryl sulfate *in vivo*. *J Clin Periodontol* 1989; 16: 593-5.

BASTOS JL, NOMURA LH, PERES MA. Trends in dental caries rates in schoolchildren 12 and 13 years old in Florianópolis, Santa Catarina, Brazil, 1971 -2002. *Cad Saúde Pública* 2004; 20: 117-22.

BÜYÜKYILMAZ T, OGAARD B, DAHM S. The effect on the tensile bond strength of orthodontic brackets of titanium tetrafluoride (TiF<sub>4</sub>) application after acid etching. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1995; 108(3): 256-61.

DEAN AG, DEAN JA, COLOMBIER D, BRENDEL KA, SMITH DC, BURTON AH et al. *Epi Info, version 6: a word processing, database, and statistics program for epidemiology on microcomputers*. Atlanta, Georgia, USA: Centers for Disease Control and Prevention; 1994.

EMILSON CG, KRASSE B, WESTERGREN G. Effect of a fluoride-containing chlorhexidine gel on bacteria in human plaque. *Scand J Dent Res*. 1976; 84(2):

---

\* De acordo com as normas da Caries Research, periódico ao qual se pretende submeter o artigo.

56-62.

EKSTRAND KR, RICKETTS DNJ, LONGBOTTOM C, PITTS NB. Visual and Tactile Assessment of Arrested Initial Enamel Carious Lesions: An *in vivo* Pilot Study. *Caries Res*. 2005; 39 (3): 173-177.

FEJERSKOV O, SCHEIE AA, MANJI F. The effect of sucrose on plaque in the primary and permanent dentition of caries-inactive and -active Kenyan children. *J Dent Res* 1992; 71: 25-31.

GIERTSEN E, SCHEIE AA. Effects of chlorhexidine-fluoride mouthrinses on viability, acidogenic potential and glycolytic profile of established dental plaque. *Caries Res*. 1995; 29(3):181-7.

GOORHUIS J, PURDELL-LEWIS DJ. .25% and 0.4% amine fluoride gel for weekly topical application. An *in vivo* study on human dental enamel. *Caries Res* 1986; 20 (5): 458-64.

HOLMEN L, THYLSTRUP A, ARTUN J. Clinical and histological features observed during arrestment of active enamel caries lesions *in vivo*. *Caries Res* 1987; 21(6): 546-554.

IJIMA Y, TAGAKI O, RUBEN J, ARENDS J. *In vitro* remineralization of *in vivo* and *in vitro* formed enamel lesions. *Caries Res* 1999; 33: 206-213.

ISMAIL AI. Clinical diagnosis of precavitated carious lesions. *Community Dent Oral Epidemiol* 1997; 25: 13-23.

ISMAIL AI. Visual and visual-tactile detection of dental caries. *J Dent Res*. 2004; 83 Spec No C: C56-66.

KELTJENS HA, SCHAEKEN, MJ, VAN DER HOEVEN JS. Caries control in *overdenture* patients: 18-month evaluation on fluoride and chlorhexidine therapies. *Caries Res* 1990; 24: 371-5.

KELTJENS HM, SCHAEKEN MJ, VAN DER HOEVEN JS. Microbial aspects of preventive regimes in patients with *overdentures*. *J Dent Res*. 1987; 66(10): 1579-82.

LAGERWEIJ MD, TEN CATE JM. Remineralisation of enamel lesions with daily applications of a high-concentration fluoride gel and a fluoridated toothpaste: an *in situ* study. *Caries Res* 2002; 36: 270-74.

LUOMA H, MURTOMAA H, NUUJA T, NYMAN A, NUMMIKOSKI P, AINAMO J, LUOMA AR. A simultaneous reduction of caries and gingivitis in a group of schoolchildren receiving chlorhexidine-fluoride applications. Results after 2 years. *Caries Res* 1978; 12(5):290-8.

LUOMA H. The effects of chlorhexidine and fluoride combinations on the potassium, sodium and phosphorus content and acid production of cariogenic streptococci. *Arch Oral Biol* 1972; 17(10):1431-7.

MALTZ M, BARBACHAN B, CARVALHO e Silva DQ, VOLKWEIS A. Results after two years of non-operative treatment of occlusal surface in children with high caries prevalence. *Braz Dent J.* 2003; 14(1): 48-54.

NYVAD B, MACHIULSKIENE V, BAELUM V. Construct and predictive validity of clinical caries diagnostic criteria assessing lesion activity. *J Dent Res* 2003; 82: 117-122.

NYVAD B, MACHIULSKIENE V, BAELUM V. Reliability of a new caries diagnostic system differentiating between active and inactive caries lesions. *Caries Res* 1999; 33: 252-260.

NYVAD B. Diagnosis versus Detection of Caries. *Caries Res.* 2004; 38(3):192-8.

OGAARD B, LARSSON E, GLANS R, HENRKSSON T, BIRKHEAD D. Antimicrobial effect of a chlorhexidine-thymol varnish (Cervitec) in orthodontic patients. A prospective, randomized clinical trial. *J Orofac Orthop* 1997; 58(4): 206-13.

OGAARD B, ROLLA G, DIJKMAN T, RUBEN J, ARENDS J. Effect of fluoride mouth rinsing on caries lesion development in shark enamel: an *in situ* caries model study. *Scand J Dent Res* 1991; 99(5): 372-7.



PERES MA, TRAEBERT J, MARCENES W. Calibração de examinadores para estudos epidemiológicos de carie dentaria. *Cad Saúde Pública* 2001; 17: 287-92.

PETERSSON LG, MAGNUSSON K, ANDERSSON H, DEIERBORG G, TWETMAN S. Effect of semi-annual applications of a chlorhexidine/fluoride varnish mixture on approximal caries incidence in schoolchildren. A three-year radiographic study. *Eur J Oral Sci* 1998; 106: 623-7.

PINELLI C, CAMPOS SERRA M, DE CASTRO Monteiro Loffredo. Validity and reproducibility of a laser fluorescence system for detecting the activity of white-spot lesions on free smooth surfaces *in vivo*. *Caries Res* 2002; 36(1): 19-24.

ROLLA G, MELSEN B. On the mechanism of the plaque inhibition by chlorhexidine *J Dent Res* 1975; 54 (Spec N° B): 57-62.

SPETS-HAPPONEN S, LUOMA H, FORSS H, KENTALA J, ALALUUSUA S, LUOMA AR, GRONROSS L, SYVAOJA S, TAPANINEN H, HAPPONEN P. Effects of a chlorhexidine-fluoride-strontium rinsing program on caries, gingivitis and some salivary bacteria among Finnish schoolchildren. *Scand J Dent Res* 1991; 99 (2):130-8.

STEPHAN RM. Intra-oral hydrogen-ion concentrations associated with dental caries activity. *J Dent Res* 1944; 23: 257-66.

TEN CATE JM, MARSH PD. Procedures for establishing effectiveness of antimicrobial agents for chemotherapeutic caries prevention. *J Dent Res* 1994; 73(3): 659-703.

THYLSTRUP A, BRUUN C, HOLMEN L: *In vivo* caries models. Mechanisms for caries initiation and arrestment. *Adv Dent Res* 1994; 8 (2): 144-157.

THYLSTRUP A, FEJERSKOV E. Textbook of Cariology. Copenhagen: Munksgaard, 1986.

TWETMAN S, PETERSSON LG. Effect of different chlorhexidine varnish regimens on *mutans streptococci* levels in interdental plaque and saliva. *Caries*

Res 1997a; 31(3): 189-93.

TWETMAN S, PETERSSON LG. Efficacy of a chlorhexidine and a chlorhexidine-fluoride varnish mixture to decrease interdental levels of *mutans streptococci*. *Caries Res* 1997b; 31: 361-5.

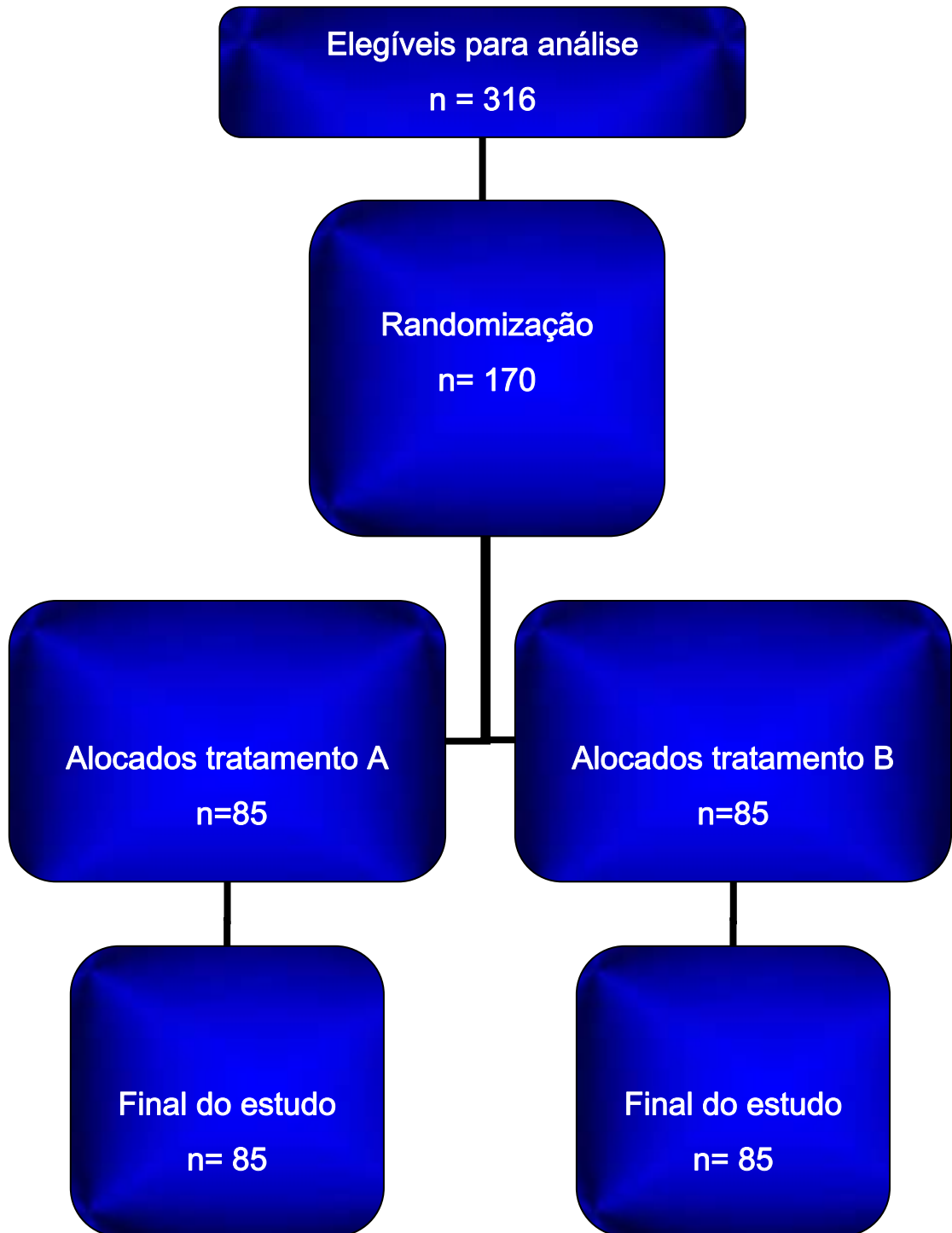
ULLSFOSS BN, OGAARD B, ARENDS J, RUBEN J, ROLLA G, AFSETH J. Effect of a combined chlorhexidine and NaF mouth rinse: an *in vivo* human caries model study. *Scand J Dent Res* 1994; 102(2): 109-12.

VAN'T RIJKOM HM, TRUIN GJ, VAN 'T Hof MA. A meta-analysis of clinical studies on the caries-inhibiting effect of chlorhexidine treatment. *J Dent Res* 1996; 75(2): 790-5.

WHO (World Health Organization). Oral health surveys: basic methods. Geneva: World Health Organization 1997.

ZICKERT I, EMILSON CG, KRASSE B. Correlation of level and duration of *Streptococcus mutans* infection with incidence of dental caries. *Infect. Immun.* 1983; 39: 982-985.

**Fluxograma 1: Progresso através dos diferentes estágios do estudo clínico randomizado\***



\* Baseado na Declaração Consort - fluxograma [Moher et al., 2001].

## Tabelas

**Tabela 1: Características demográficas e clínicas dos sujeitos no G1 (solução de fluoreto de sódio a 0,05%) e G2 (solução de fluoreto de sódio a 0,05% combinada a clorexidina a 0,12%), ao início do estudo.**

Variáveis	G1 (n=85)	G 2 (n=85)	p
% Participantes gênero feminino	58,8%	55,3%	0,64*
Idade em anos – média (DP)	12,96 (1,38)	13,01 (1,34)	0,88**
Número de lesões ativas - média (DP)	6,49 (4,45)	6,55 (4,23)	0,89**

DP: Desvio Padrão;

\* Teste Qui-quadrado;

\*\* Mann Whitney U test

**Tabela 2: Efetividade da solução de fluoreto de sódio a 0,05% (G1) na paralisação de lesões ativas de caries em esmalte, após o final do estudo.**

	média	DP	mínimo	25 <sup>th</sup>	mediana	75 <sup>th</sup>	Máximo
Lesões ativas no início	6,49*	4,45	1	3	5	9	21
Lesões ativas ao final	0,95*	1,79	1	0	0	1	10

\*  $p < 0,001$  (Wilcoxon matched paired test)

**Tabela 3: Efetividade da solução de fluoreto de sódio a 0,05% combinada a clorexidina a 0,12% (G2) na paralisação de lesões ativas de caries em esmalte, ao final do estudo.**

	média	DP	mínimo	25 <sup>th</sup>	mediana	75 <sup>th</sup>	máximo
Lesões ativas no início	6,55	4,23	1	3	4	9	21
Lesões ativas ao final	1,02	1,60	0	0	0	1	8

\*  $p < 0,001$  (Wilcoxon matched pairs test)

**Tabela 4:** Efetividade da G1 (solução de fluoreto de sódio a 0,05%) e da G2 (solução de fluoreto de sódio a 0,05% combinada a clorexidina a 0,12%) na paralisação de lesões ativas de caries em esmalte ao final do estudo.

Variáveis	G1 (n=85)	G2 (n=85)	p
Número de lesões ativas – média (DP)	0,95 (1,79)	1,02 (1,61)	
25 <sup>th</sup>	0,00	0,00	0,34**
Mediana	0,00	0,00	
75 <sup>th</sup>	1,00	1,00	
Lesões paralisadas/indivíduo – média (DP)	5,51(3,86)	5,68 (4,07)	
25 <sup>th</sup>	3,00	3,00	0,94**
Mediana	5,00	5,00	
75 <sup>th</sup>	8,00	8,00	
Lesões paralisadas (%) – média (DP)	85,4 (24,2)	85,6 (20,5)	
25 <sup>th</sup>	73,03	75,00	0,66**
Mediana	100,00	100,00	
75 <sup>th</sup>	100,00	100,00	
Absenteísmos participantes – média (DP)	2,76 (2,34)	2,63 (2,76)	
25 <sup>th</sup>	1,00	1,00	0,37**
Mediana	2,00	2,00	
75 <sup>th</sup>	4,00	4,00	

DP: Desvio Padrão;

\* Teste Qui-quadrado;

\*\* Mann Whitney U test

### **2.1.2 Versão em inglês**

## **Effectiveness of Two Mouth Rinses in Arresting Caries Lesions: a Short-term Clinical Study**

A.R.D. GUIMARÃES<sup>1,2</sup>, M.A. PERES<sup>2</sup>, R.S.VIEIRA<sup>2</sup>, M.L. RAMOS-JORGE<sup>2</sup>, A. MODESTO<sup>3</sup>, <sup>1</sup>State University of Feira de Santana- UEFS, Brazil, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil; <sup>2</sup>Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil; <sup>3</sup>Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

### **Correspondence:**

**Prof. Dr. Ricardo de Sousa Vieira**

**Department of Stomatology – Centro de Ciências da Saúde, Federal University of Santa Catarina - Trindade, Florianópolis, SC. 88010-970, Brazil.**



## ABSTRACT

This short-term double-blind clinical study aimed to clinically evaluate the additional effect of adding 0.12% CHX to a 0.05% sodium fluoride (NaF) mouth rinse in arresting active enamel caries lesions after 28 days. A total of 170 children, aged 11-15 years, with active smooth surface caries lesions (average 6.52) was enrolled and randomly distributed into two equal groups. Under the supervision of the research team, the children rinsed with a 15 ml solution of either 0.05% NaF (G1) or 0.05% NaF + 0.12% CHX (G2) for 1 minute/day during 28 days. Children underwent supervised tooth brushing and examination at the beginning and at the end of the study. Teeth were dried with compressed air, isolated and illuminated with a reflector, after which all smooth surfaces were examined by one blinded, previously calibrated examiner. The surface was considered active (A) or arrested (I). The frequency of A or I surfaces was evaluated by calculating the difference between the number found at the beginning and at the end of the trial. No significant differences were detected between the two groups with respect to carious surfaces at baseline ( $6.49 \pm 4.45$  - G1,  $6.55 \pm 4.23$  - G2, respectively), nor were differences found when age and gender were taken into consideration. Arrestment proportions were 84.4% (G1) and 85.3% (G2), ( $p=0.71$ ; ns). Although both solutions showed high arrestment proportions, the addition of chlorhexidine did not improve the arrestment capacity of the NaF mouth rinse.

**Key-Words:** chlorhexidine, fluoride, dental caries, randomised controlled trial (RCT)

## INTRODUCTION

Caries result from an imbalance between the phenomena of demineralization and remineralization. In situations of high cariogenic challenge, intra-oral pH is below 4.5 and the “remineralization” phase is inhibited [THYLSTRUP, FEJERSKOV, 1986]. Under these conditions, the availability of more fluoride will not necessarily provide a better cariostatic effect [ÖGAARD et al., 1991]. Several methods for enhancing the fluoride’s cariostatic effect at low pH have been suggested, such as combining fluoride with antimicrobial agents [BÜYÜKYILMAZ et al., 1995]. Chlorhexidine, a potent antimicrobial agent, inhibits the production of acid in dental plaque, reducing the drop in pH during cariogenic challenge [ROLLA, MELSEN, 1975]. The pH of dental plaque quickly decreases after exposure to sugar and remains at the same low level for a varying period of time before slowly returning to its initial level. The pH of individuals with high caries activity has been shown to be lower [STEPHAN, 1944], in particular when dental plaque is associated with white-spot lesions or deep dental caries lesions [FEJERSKOV et al., 1992].

Clinical studies have reported a synergistic effect against *S. mutans* when a combination of fluoride and chlorhexidine is used [LUOMA, 1972; EMILSON et al., 1976]. Because of its powerful bactericidal action against *S. mutans*, and its ability to reduce caries incidence [ZICKERT et al., 1983], chlorhexidine has been widely studied, especially in high-risk individuals [for meta-analysis, see van RIJKOM et al., 1996]. However, limited work has been carried out to identify the optimal combination of fluoride and chlorhexidine for the control of dental caries.

A Medline search was performed, restricted to clinical trials but with no restriction with respect to language of publication, and using such MeSH terms as “fluoride-chlorhexidine”, “chlorhexidine-fluoride”, “fluoride combined chlorhexidine”, “chlorhexidine combined fluoride”, “fluoride with chlorhexidine” and “chlorhexidine with fluoride”. Twenty randomized clinical trials, published between 1966 and 2002, were identified. Eleven of these publications referred exclusively to the prevention of periodontal diseases, while one investigated the adhesion strength of orthodontic brackets and the other eight papers referred to the prevention of dental caries

[KELTJENS et al., 1987; KELTJENS et al., 1990; SPETS-HAPPONEN et al., 1991; ULLSFOSS et al., 1994; ÖGAARD et al., 1997; TWETMAN, PETERSSON, 1997a; TWETMAN, PETERSSON, 1997b; PETERSSON et al., 1998]. The studies selected analyzed the effect of associating fluoride and chlorhexidine for the prevention of dental caries and either measured the decrease in caries or counted cariogenic microorganisms such as *S. mutans* and *Lactobacillus*. No data is available on the additional effect of using chlorhexidine for arresting active lesions, while concomitantly controlling the bacterial biofilm.

The purpose of this study was to assess the additional effect of adding 0.12% chlorhexidine to 0.05% sodium fluoride mouth rinse and clinically compare the capacity of solutions of 0.05% sodium fluoride alone to arrest active carious lesions on smooth enamel surfaces during twenty-eight days of mouth rinsing in adolescents who were not receive to other preventive interventions in the studied period.

## **METHODS**

### ***a) Subjects***

The study was carried out in a public school in Florianópolis, Brazil. The study population consisted of teenagers, 11 to 15 years of age, enrolled at school. Epidemiological study of dental caries, carried out using criteria established by the World Health Organization [WHO, 1997], was conducted in 2002 at the same school, involving all schoolchildren aged 11 and 12 years and found 1.4 as mean DMF-T indices [BASTOS et al., 2004].

The research protocol was approved by Ethical and Research Committee of Federal University of Santa Catarina (Protocol N<sup>o</sup>. 154/2002), as well as by the relevant educational authorities, prior to study initiation. A letter was sent to the parents or guardians of the participants explaining the purpose of the study, its characteristics and its importance, and requesting their agreement to the adolescent's participation. In that case, parents signed a consent form.

### ***b) Eligibility criteria***

Three hundred and sixteen adolescents had at least one active non-cavitated enamel caries lesion, on a free smooth enamel surface (buccal and lingual). However, a hundred forty-six adolescents were excluded, due the exclusion criteria adopted: use of orthodontic brackets, dental prosthesis, prior aesthetic restoration of teeth, pregnant or breastfeeding girls, or refusal of the child or his/her guardian to participate in the study (23 adolescents). A total of one hundred and seventy teenagers matched the inclusion criteria and took part at the study.

### ***c) Study Design***

This was a double-blind, randomized clinical study for which the participants were randomized with two groups.

### ***d) Sample size and power calculation***

The sample size was calculated to detect a difference of 20% in the proportion of arrested lesions between the groups as follows: an alpha level of 0.05 (5%), test power of 80%, a proportion of 70% arrestment in those individuals exposed to supervised 0.05% fluoride mouth rinsing after 28 days (control group), and a proportion of 90% arrestment in the test group. A sample size of 71 individuals was estimated for each group, to which 15% more teenagers were added to compensate for possible drop-outs. Each group, therefore, enrolled 82 individuals. The Epiinfo software program [DEAN et al., 1994] was used for calculating sample size.

### ***e) Randomization and blinding***

A randomization method was used to form the groups. A number was given to each eligible child and then put into a sealed opaque envelope. The envelopes were randomly selected by the supervisor (MLRJ) to allocate the individuals to each group of mouth rinsing solution, either 0.05% fluoride or 0.05% plus 0.12% chlorhexidine. Two pure solutions with the same pharmacological formulation were used, their only difference being the presence or absence of 0.12% chlorhexidine in solution B and A, respectively. The solutions were placed in identical, amber-coloured, unlabeled containers, coded A and B. Neither the eligible children, the persons supervising daily

mouthrinses, nor the examiner were aware of the contents of the solutions. The single examiner was also blinded to the status of the participant as diagnosed at the previous examination, and did not know to which group the adolescent had been allocated.

#### ***f) Mouth rinsing***

The dental team instructed the teenagers to rinse with the 15 mL solution for one minute each day during 14 consecutive school days, which actually represented a period of treatment of 28 days. The other components common to the two solutions were 0.05% sodium fluoride, glycerin, non-cariogenic anise aroma, blue food colouring, preservative and vehicle q.s.

The solutions were specially prepared for the study and all had the same colour, flavor and artificial taste. According to the manufacturer (Formula & Ação, São Paulo, Brazil), the anise flavour successfully masks the bitter taste of chlorhexidine.

#### ***g) Personnel and training***

The team consisted of a co-coordinator (MAP), two researchers and four dental students. The principal researcher (ARDG) clinically examined the carious lesions, the second (MLRJ) coordinated the tooth brushing and daily mouth rinsing supervised by the students, who transferred the participant's clinical data to their record cards. The toothbrushing was performed without the use of toothpaste since Brazilian dentifrices contain SLS (sodium lauryl sulphate), which inactivates CHX, thereby requiring a minimum interval of 30 minutes between toothbrushing and rinsing [BARKVOLL et al, 1989], which would be an unreasonable interruption of the schoolchildren's routine. Although an effect of fluoridated water, concentration of water fluoridated and dentifrice in the arrestment of dental caries was expected, both groups were randomly exposed to these variables and any influence should therefore have been distributed randomly.

#### ***h) Calibration and intra- and inter- examiner reliability***

Previously the study, the principal researcher (ARDG) and reporter (RMF) were trained by the coordinator (MAP) to conduct calibration exercises using the methodology described by Peres et al. (2001). A single calibrated examiner (ARDG) with high intra-examiner reliability conducted all the clinical examinations (kappa = 0.7). Another dentist (RSV), who did not participate in the data collection of this study, was the reference standard. Prior to the fieldwork, the examiner was instructed and calibrated to adopt dental caries lesion activity criteria of Nyvad et al., 1999 for caries assessment in clinical trials [NYVAD et al, 1999]. The exams was performed in duplicated in 10% of the sample during the data collection to verify the intra-examiner agreement.

***i) Clinical examinations and outcome***

Two dental examinations were carried out, the first one at the beginning and the second at the end of the study. Prior to the dental examinations, the teenagers were asked to brush their teeth under a dental student's supervision, using a toothbrush provided by the research team without dentifrice. The teeth were then dried with compressed air for 15 seconds, maintained by constant saliva aspiration and were illuminated using a standard dental light unit before being examined. If the examiner still found that insufficient plaque had been removed, the surfaces were gently cleaned using the side of the probe and gauze. The dental examinations were conducted on clean, dry and illuminated teeth using flat clinical mirrors in a room specifically reserved for this purpose. Each smooth surface was examined and a diagnosis was made according to the following criteria for non-cavitated caries for non-cavitated caries previously described by Nyvad et al. [1999] and Pinelli et al. [2002].

Code	Clinical Condition	Clinical Characteristics
(A)	Active caries lesion (non-cavitated)	Opaque, roughened and dull enamel surface.
(I)	Inactive caries lesion (non-cavitated)	Smooth, shiny enamel surface with varying degrees of white or brown discoloration

If the white spot was situated far from a healthy gingival margin, it was considered an arrested lesion [PINELLI et al., 2002; MALTZ et al., 2003]. These clinical diagnostic criteria have shown construct and predictive validity for the activity of caries lesions at the non-cavitated stage of diagnosis [NYVAD et al., 2003].

After satisfying all the inclusion criteria, the participant was then randomly allocated to the test or control group, as described above. The second examination followed the same criteria. Absenteeism was presumed when a teenager did not complete the total of scheduled mouth rinses or did not attend the final clinical examination. At the end of the study, those participants whose dental caries had not been arrested or who had other odontological requirements were referred to the dental clinic of the UFSC or to public health clinics.

#### ***j) Data handling and statistical analysis***

Examiner reliability was measured by the kappa test on a surface basis. The Mann Whitney U and Chi-square tests were used to assess the differences in variables at the beginning of the study and the differences in arrested surfaces between the two groups after the trial. The means, standard deviation and quartiles of active lesions at baseline and at the end of the study were calculated within the same group (G1 and G2). The difference between active lesions clinically identified at baseline and at the end of the study was tested using the Wilcoxon matched pairs test. The SPSS software program was used for the analysis

## RESULTS

One hundred and seventy participants were recruited to the study and equally distributed between the two groups. All participants remained in the study until its conclusion (Flowchart 1).

Table 1 confirms that possible confounding variables such as gender and age were evenly balanced between the study group (0.05% sodium fluoride combined with 0.12% chlorhexidine – G1) and the control group (0.05% sodium fluoride mouth rinse alone – G2). Moreover, the mean number of surfaces showing active lesions was not significantly different between the two groups at baseline (6.49 and 6.55 respectively).

Both groups (G1 and G2) showed a highly significant reduction in mean number of active lesions and in all quartiles of the frequency distribution during the study period (Tables 2 and 3).

Table 4 shows that after the period of treatment the arrestment proportions were high in both groups (84.4% and 85.3% for G1 and G2, respectively,  $p=0.71$ , not significant). When mean number of arrested surfaces was compared, G1 and G2 presented similar values (5.54 and 5.52 respectively). Subject absenteeism, which could have modified the results, was almost identical in the two groups.

## DISCUSSION

### ***a) Principal findings***

After the end of the clinical trial it was observed around 80% of arrestment of dental caries lesion in both, test and control groups. The mean number of arrested surfaces also presented similar in both groups. Hence, the addition of chlorhexidine did not enhance the fluoride effect in arrest active of caries lesions. No clinical studies have been identified that analyze transition proportions of caries lesions from the active to the inactive state using fluoridated combined with antimicrobial agents.



This trial showed high arrestment proportions in both groups (Table 2), but did not detect any difference between the combined solutions and the fluoride alone, contrary to previous reports [LUOMA et al., 1978; SPETS-HAPONEN, 1991]. The high proportions from active to inactive lesions are difficult to discuss due the lack of this findings in the literature. What could be closer to these results were the high rates found in previous studies evaluating topical fluoride treatment in young teenagers [BAELUM et al., 2003]. High “remineralisation” rates *in vitro* over a short evaluation time were also found following topical fluoride treatment: 1.8%/day during one month [LANGERWEIJ, ten CATE, 2002] and 5%/day for 9 days [GOORHUIS, PURDELL-LEWIS, 1986], probably because the highest increase in remineralisation occurs in the first two weeks [IJIMA et al., 1999].

### ***b) Strengths and weaknesses of the study***

There is a greater prevalence of non-cavitated or pre-cavitated caries lesions than cavitated surfaces in economically developed countries [ISMAIL, 1997; AMARANTE et al, 1998; ISMAIL, 2004]. Florianópolis has higher socioeconomic and health indicators than Brazil as a whole. In addition, it was found to have a low prevalence and severity of dental caries, mostly due to the fluoridated water supply and to the fluoridated dentifrices that are now distributed on a regular basis [MARCENES et al., 2001].

Other fluoride sources, e.g., fluoridated dentifrice used at home and increased awareness of dental cleanliness as a result of enrollment into the trial could certainly have contributed to get positive results as achieved in this trial. In addition, it is important note that relatively higher arrestment rates have been observed on free smooth tooth surfaces compared to other surfaces, potentially owing abrasion from toothbrushing [BAELUM et al. 2003]. These facts may be part of the explanation for the high arrestment rates recorded in this study.

The design, randomisation method, blinding and high intra- and inter-examiner reliability used in this study gives it strong internal validity. Both rinsing solutions were as identical as possible to each other with respect to physical characteristics such as color, weight, taste and smell, the only difference being the active pharmacological agent. They were specifically prepared for the study, but no

commitment of any kind was given to the manufacturer in order to avoid conflict of interest.

The inherent subjectivity of the clinical examination can be avoided by using clear criteria-defining terms to measure the progression of the caries [ISMAIL, 2004]. In addition to use clearly defined criteria, the double-blind nature of this study should have avoided detection bias. The calibration exercise adopted assured a high intra-examiner reliability found in this study and preceding studies that adopted the same procedures [NYVAD et al. 1999, PINELLI et al., 2002]. Quantitative diagnostic methods were not used because such methods have shown low sensitivity and moderate specificity [ISMAIL, 1997; BADER et al., 2002] and until these emergent methods really prove superior to conventional diagnostic methods such as clinical examinations, they should not be recommended for clinical practice [NYVAD, 2004].

The dissimilarity of the studies published in the literature on the efficacy of chlorhexidine in the control of caries in terms of study design and outcome measures may have impaired the discussion of the present findings.

Ekstrand et al. [2005] evaluated the visual-tactile assessment of dental caries and the examiners showed difficulties related to the visual and tactile features of the lesions and decisions on lesion activity, the intraexaminer agreement was only fair while the inter-examiner reproducibility was generally poor, speculating that 3-4 weeks used in this pilot-study might be too short to evaluate changes criteria of lesions activity. Nevertheless, in provoked caries lesions, signs of regression were perceived after as little as 1 week [HOLMEN et al., 1987; THYLSTRUP et al., 1994], so it was expected that in natural circumstances, active lesions, visual and tactile changes might be detected after 3–4 weeks [THYLSTRUP et al., 1994]. In this context, it is also important to consider study [NEILSON and PITTS, 1991] that analyzed the clinical behavior of free smooth surfaces carious lesions monitored over two years, examining only molars teeth from teenagers randomly allocated to three groups encouraged to use a 1000, 2000 or 2500 ppm fluoride toothpaste, respectively. Although 74% of the lesions apparently remained static or regressed, the fluoride content of the dentifrices did not appear to affect the clinical behavior of the lesions.

In special situations, satisfactory oral hygiene is exceptionally difficult to be performed and in some cases, it has to be executed by someone else than the patient. Moreover, the authors considered that patients presenting activity of caries

lesions in which surfaces, especially lingual surfaces should be indicative to be at risk. Hence, oral hygiene could be improved by adding antimicrobial agents to control caries lesions activity.

There are several possible explanations for the lack of difference between the two solutions in arresting active caries lesions. Firstly, previous findings demonstrated the limited bactericidal effect, in which, 90 minutes following mouth rinsing, no further inhibition of its metabolic activity in dental plaque was detected [GIERTSEN and SCHIE, 1995].

Studies with the objective of evaluating the ability of chlorhexidine to protect enamel against demineralization may be more adequate for evaluating the effectiveness of CHX [ten CATE and MARSH, 1994], contrarily to this present study that intended to evaluate the therapeutic effect of combined chlorhexidine-fluoride in arrestment of active caries lesions. This statement is based on the mechanism of action of chlorhexidine that consists primarily in interfering with bacterial metabolism and subsequently producing a secondary effect on the demineralisation of enamel. There was not the purpose of this study to evaluate inactive lesions or sound surfaces.

## **CONCLUSION**

Chlorhexidine did not prevent the marked caries controlling remineralizing effect of the fluoride, nor did its presence add to the effectiveness of fluoride in controlling active caries lesions. In clinical situations, it is important to ensure simple treatment regimens in order to obtain compliance. Therefore, based on the present clinical trial we do not recommend the addition of chlorhexidine to NaF mouth rinses for the arrestment of active caries.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

This study was sponsored by FUNPESQUISA (337/2002), Federal University of Santa Catarina, Brazil). The authors would like to thank the following students of dentistry: Rodrigo Melin, Noah Vanti, Frederico Pereira, Luciana Kamimura, Andreia

Cascaes, Anderson de Bom, Leonardo Mezzari, Adalberto Eyng, Donavan Soares, Sara Apolinario, Mariana Minamisako, Andre Carneiro who helped during the fieldwork, and Ana Nere Santos for technical support. The authors also thank the local educational authorities, teachers, and Prof. Dr. Jaime A. Cury (FOP-UNICAMP) for critical reading and suggestions. The toothbrushes used in the study were kindly provided by Condor.

## REFERENCES

AMARANTE E, RAADAL M, ESPELID I. Impact of diagnostic criteria on the prevalence of dental caries in Norwegian children aged 5 and 18 years. *Comm Dent Oral Epidemiol* 1998; 26(2): 87-94.

BADER JD, SHUGARS DA, BONITO AJ. A systematic review of the performance of methods for identifying carious lesions. *J Public Health Dent* 2002; 62: 201-213.

BAELUM V, MACHIULSKIENE V, NYVAD B, RICHARDS A, VÆTH M. Application of survival analysis to caries lesion transition in interventional trials. *Community Dent Oral Epidemiol* 2003; 31: 252-260.

BARKEVOLL P, ROLLA G, SVENDSEN K. Interaction between chlorhexidine digluconate and sodium lauryl sulfate in vivo. *J Clin Periodontol* 1989; 16: 593-5.

BASTOS JL, NOMURA LH, PERES MA. Trends in dental caries rates in schoolchildren 12 and 13 years old in Florianópolis, Santa Catarina, Brazil, 1971 -2002. *Cad Saúde Pública* 2004; 20: 117-22.

BUYUKYILMAZ T, OGAARD B, DAHM S. The effect on the tensile bond strength of orthodontic brackets of titanium tetrafluoride (TiF<sub>4</sub>) application after acid etching. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1995; 108(3): 256-61.

DEAN AG, DEAN JA, COLOMBIER D, BRENDEL KA, SMITH DC, BURTON AH et al. *Epi Info, version 6: a word processing, database, and statistics program for epidemiology on microcomputers*. Atlanta, Georgia, USA: Centers for Disease Control and Prevention; 1994.

EMILSON CG, KRASSE B, WESTERGREN G. Effect of a fluoride-containing chlorhexidine gel on bacteria in human plaque. *Scand J Dent Res*. 1976; 84(2): 56-62.

EKSTRAND KR, RICKETTS DNJ, LONGBOTTOM C, PITTS NB. Visual and Tactile Assessment of Arrested Initial Enamel Carious Lesions: An in vivo Pilot Study. *Caries Res.* 2005; 39 (3): 173-177.

FEJERSKOV O, SCHEIE AA, MANJI F. The effect of sucrose on plaque in the primary and permanent dentition of caries-inactive and -active Kenyan children. *J Dent Res* 1992; 71: 25-31.

GIERTSEN E, SCHIE AA. Effects of chlorhexidine-fluoride mouthrinses on viability, acidogenic potential and glycolytic profile of established dental plaque. *Caries Res.* 1995; 29(3):181-7.

GOORHUIS J, PURDELL-LEWIS DJ. .25% and 0.4% amine fluoride gel for weekly topical application. An in vivo study on human dental enamel. *Caries Res* 1986; 20 (5): 458-64.

HOLMEN L, THYLSTRUP A, ARTUN J. Clinical and histological features observed during arrestment of active enamel caries lesions in vivo. *Caries Res* 1987; 21(6): 546-554.

IIJIMA Y, TAGAKI O, RUBEN J, ARENDS J. *In vitro* remineralization of *in vivo* and *in vitro* formed enamel lesions. *Caries Res* 1999; 33: 206-213.

ISMAIL AI. Clinical diagnosis of precavitated carious lesions. *Community Dent Oral Epidemiol* 1997; 25: 13-23.

ISMAIL AI. Visual and visual-tactile detection of dental caries. *J Dent Res.* 2004; 83 Spec No C: C56-66.

KELTJENS HA, SCHAEKEN, MJ, VAN DER HOEVEN JS. Caries control in *overdenture* patients: 18-month evaluation on fluoride and chlorhexidine therapies. *Caries Res* 1990; 24: 371-5.

KELTJENS HM, SCHAEKEN MJ, VAN DER HOEVEN JS. Microbial aspects of preventive regimes in patients with overdentures. *J Dent Res.* 1987; 66(10): 1579-82.

LAGERWEIJ MD, TEN CATE JM. Remineralisation of enamel lesions with daily

applications of a high-concentration fluoride gel and a fluoridated toothpaste: an in situ study. *Caries Res* 2002; 36: 270-74.

LUOMA H, MURTOMAA H, NUUJA T, NYMAN A, NUMMIKOSKI P, AINAMO J, LUOMA AR. A simultaneous reduction of caries and gingivitis in a group of schoolchildren receiving chlorhexidine-fluoride applications. Results after 2 years. *Caries Res* 1978; 12(5):290-8.

LUOMA H. The effects of chlorhexidine and fluoride combinations on the potassium, sodium and phosphorus content and acid production of cariogenic streptococci. *Arch Oral Biol* 1972; 17(10):1431-7.

MALTZ M, BARBACHAN B, CARVALHO E SILVA DQ, VOLKWEIS A. Results after two years of non-operative treatment of occlusal surface in children with high caries prevalence. *Braz Dent J.* 2003; 14(1): 48-54.

MOHER D, SCHULTZ KF, ALTMAN DG. The CONSORT Statement: revised recommendations for improving the quality of reports of parallel-group randomized trial. *Ann Intern Med* 2001; 134: 657-62.

NYVAD B, MACHIULSKIENE V, BAELUM V. Construct and predictive validity of clinical caries diagnostic criteria assessing lesion activity. *J Dent Res* 2003; 82: 117-122.

NYVAD B, MACHIULSKIENE V, BAELUM V. Reliability of a new caries diagnostic system differentiating between active and inactive caries lesions. *Caries Res* 1999; 33: 252-260.

NYVAD B. Diagnosis versus Detection of Caries. *Caries Res.* 2004; 38(3):192-8.

OGAARD B, LARSSON E, GLANS R, HENRKSSON T, BIRKHEAD D. Antimicrobial effect of a chlorhexidine-thymol varnish (Cervitec) in orthodontic patients. A prospective, randomized clinical trial. *J Orofac Orthop* 1997; 58(4): 206-13.

OGAARD B, ROLLA G, DIJKMAN T, RUBEN J, ARENDS J. Effect of fluoride

mouth rinsing on caries lesion development in shark enamel: an in situ caries model study. *Scand J Dent Res* 1991; 99(5): 372-7.

PERES MA, TRAEBERT J, MARCENES W. Calibração de examinadores para estudos epidemiológicos de carie dentaria. *Cad Saúde Pública* 2001; 17: 287-92.

PETERSSON LG, MAGNUSSON K, ANDERSSON H, DEIERBORG G, TWETMAN S. Effect of semi-annual applications of a chlorhexidine/fluoride varnish mixture on approximal caries incidence in schoolchildren. A three-year radiographic study. *Eur J Oral Sci* 1998; 106: 623-7.

PINELLI C, CAMPOS SERRA M, DE CASTRO Monteiro Loffredo. Validity and reproducibility of a laser fluorescence system for detecting the activity of white-spot lesions on free smooth surfaces *in vivo*. *Caries Res* 2002; 36(1): 19-24.

ROLLA G, MELSEN B. On the mechanism of the plaque inhibition by chlorhexidine *J Dent Res* 1975; 54 (Spec N° B): 57-62.

SPETS-HAPPONEN S, LUOMA H, FORSS H, KENTALA J, ALALUUSUA S, LUOMA AR, GRONROSS L, SYVAOJA S, TAPANINEN H, HAPPONEN P. Effects of a chlorhexidine-fluoride-strontium rinsing program on caries, gingivitis and some salivary bacteria among Finnish schoolchildren. *Scand J Dent Res* 1991; 99 (2):130-8.

STEPHAN RM. Intra-oral hydrogen-ion concentrations associated with dental caries activity. *J Dent Res* 1944; 23: 257-66.

TEN CATE JM, MARSH PD. Procedures for establishing effectiveness of antimicrobial agents for chemotherapeutic caries prevention. *J Dent Res* 1994; 73(3): 659-703.

THYLSTRUP A, BRUUN C, HOLMEN L: *In vivo* caries models. Mechanisms for caries initiation and arrestment. *Adv Dent Res* 1994; 8 (2): 144-157.

THYLSTRUP A, FEJERSKOV E. Textbook of Cariology. Copenhagen: Munksgaard, 1986.



TWETMAN S, PETERSSON LG. Effect of different chlorhexidine varnish regimens on *mutans streptococci* levels in interdental plaque and saliva. *Caries Res* 1997a; 31(3): 189-93.

TWETMAN S, PETERSSON LG. Efficacy of a chlorhexidine and a chlorhexidine-fluoride varnish mixture to decrease interdental levels of *mutans streptococci*. *Caries Res* 1997b; 31: 361-5.

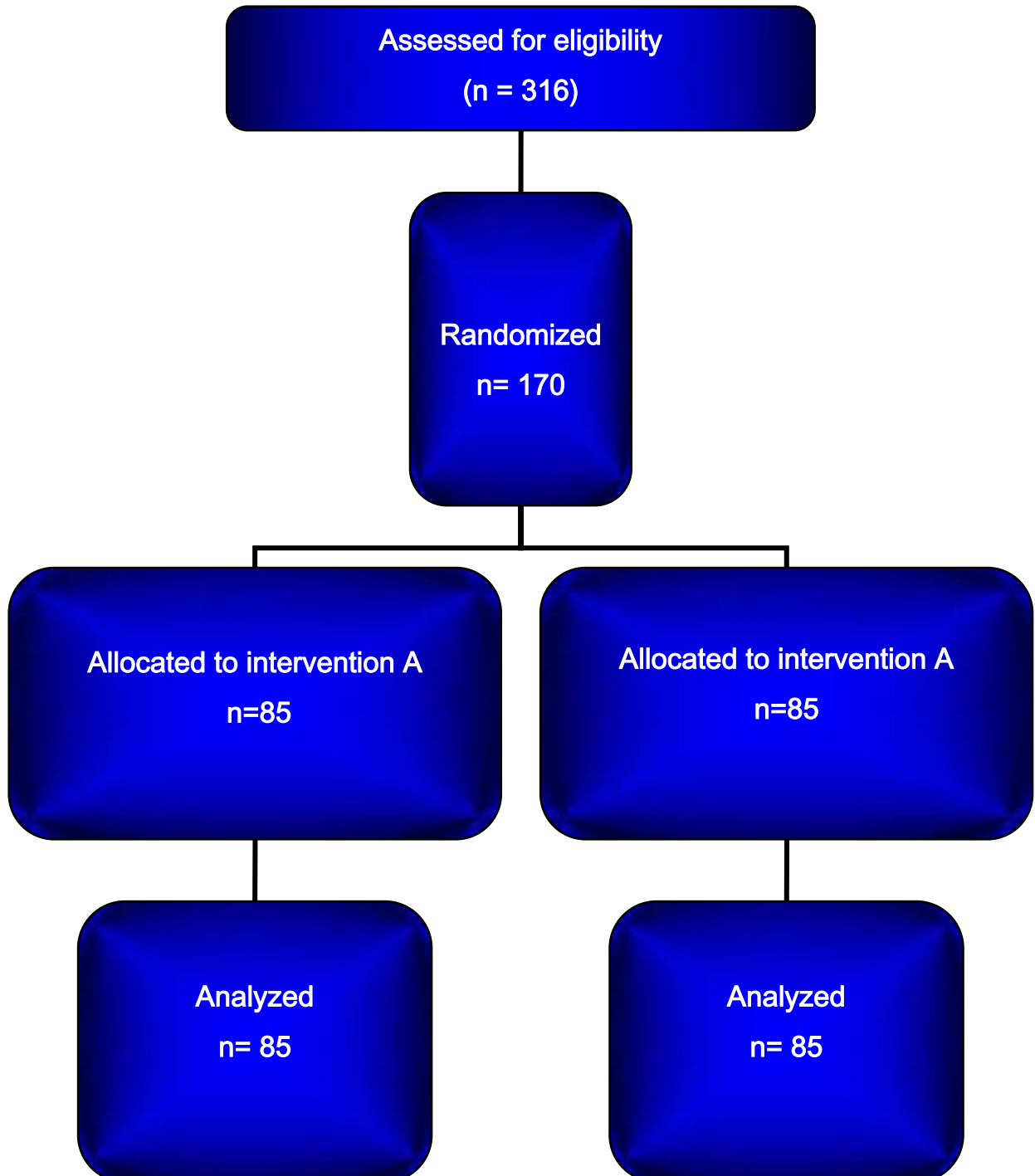
ULLSFOSS BN, OGAARD B, ARENDS J, RUBEN J, ROLLA G, AFSETH J. Effect of a combined chlorhexidine and NaF mouth rinse: an *in vivo* human caries model study. *Scand J Dent Res* 1994; 102(2): 109-12.

VAN'T RIJKOM HM, TRUIN GJ, VAN 'T Hof MA. A meta-analysis of clinical studies on the caries-inhibiting effect of chlorhexidine treatment. *J Dent Res* 1996; 75(2): 790-5.

World Health Organization (WHO). Oral health surveys: basic methods. Geneva: World Health Organization 1997.

ZICKERT I, EMILSON CG, KRASSE B. Correlation of level and duration of *Streptococcus mutans* infection with incidence of dental caries. *Infect. Immun.* 1983; 39: 982-985.

**Flow chart 1 Progress through the different stages of the RCT**



\* A similar number of absentees were found in each group and were not considered dropouts.

· Based on Consort statement flow diagram [Moher et al., 2001].

## Tables

**Table 1:** Demographic and clinical characteristics of subjects in G1 (0.05% sodium fluoride mouth rinse) and G2 (0.05% sodium fluoride combined with 0.12% chlorhexidine mouth rinse) at baseline.

<b>Variables</b>	<b>G1 (n=85)</b>	<b>G 2 (n=85)</b>	<b>p</b>
% Female participants	58.8%	55.3%	0.64*
Age in years – mean (SD)	12.96 (1.38)	13.01 (1.34)	0.88**
Number of active lesions – mean (SD)	6.49 (4.45)	6.55 (4.23)	0.89**

SD: Standard deviation;

\* Chi-square test;

\*\* Mann Whitney U test

**Table 2:** Effectiveness of 0.05% sodium fluoride mouth rinse (G1) in arresting active caries lesions in enamel at the end of the study.

	mean	SD	Minimum	25th	median	75th	maximum
Active lesions at baseline	6.49*	4.45	1	3	5	9	21
Active lesions after the end of the study	0.95*	1.79	1	0	0	1	10

\*  $p < 0.001$  (Wilcoxon matched paired test)

**Table 3:** Effectiveness of 0.05% sodium fluoride combined with 0.12% chlorhexidine (G2) in arresting active caries lesions enamel at the end of the study.

	mean	SD	minimum	25th	median	75th	maximum
Active lesions at baseline	6.55	4.23	1	3	4	9	21
Active lesions at the end of the study	1.02	1.60	0	0	0	1	8

\*  $p < 0.001$  (Wilcoxon matched pairs test)

**Table 4:** Effectiveness of G1 treatment (0.05% sodium fluoride mouth rinse) and G2 treatment (0.05% sodium fluoride combined with 0.12% chlorhexidine) in arresting caries lesions in active enamel subsurface after at the end of the study.

Variables	G1 (n=85)	G2 (n=85)	p
Number of active lesions – mean (SD)	0.95 (1.79)	1.02 (1.61)	
25 <sup>th</sup>	0.00	0.00	0.34**
Median	0.00	0.00	
75 <sup>th</sup>	1.00	1.00	
Arrested lesions/individual – mean (SD)	5.51(3.86)	5.68 (4.07)	
25 <sup>th</sup>	3.00	3.00	0.94**
Median	5.00	5.00	
75 <sup>th</sup>	8.00	8.00	
Arrested lesions - mean (SD)	85.4 (24.2)	85.6 (20.5)	
25 <sup>th</sup>	73.03	75.00	0.66**
Median	100.00	100.00	
75 <sup>th</sup>	100.00	100.00	
Subject absenteeism – mean (DP)	2.76 (2.34)	2.63 (2.76)	
25 <sup>th</sup>	1.00	1.00	0.37**
Median	2.00	2.00	
75 <sup>th</sup>	4.00	4.00	

SD: Standard deviation;

\* Chi-square test;

\*\* Mann Whitney U test

## **2.2 ARTIGO 2**

### **2.2.1 Versão em português**

#### **Efeito de Solução contendo Fluoreto e Clorexidina na Desmineralização e na Remineralização: um estudo *in situ*.**

A. R. D. Guimarães<sup>a, b \*</sup>, R. S.Vieira<sup>b</sup>, A. Modesto<sup>c</sup>, J. A. Cury<sup>d</sup>, C. P. M. Tabchoury<sup>d</sup>

\*<sup>a, b</sup>ardg1999@hotmail.com; <sup>a</sup>Departamento de Saúde, UEFS, Bahia, Brasil; <sup>b</sup>Programa de Pós-Graduação em Odontologia (Odontopediatria), UFSC, Brasil; <sup>c</sup>Departamento de Odontopediatria e Ortodontia, UFRJ, Br; <sup>d</sup>Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, Brasil.

#### **Correspondência:**

**Prof. Dr. Ricardo de Sousa Vieira**

**Departamento de Estomatologia – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário – Trindade 88010-970 Florianópolis, SC, Brasil.**

## RESUMO

O efeito adicional da clorexidina (CHX) na ação preventiva e terapêutica dos enxaguatórios bucais fluoretados (F) ainda não é bem estabelecido. Objetivos: avaliar *in situ* o efeito de CHX-F na composição do biofilme dental e na des/remineralização em esmalte bovino. Métodos: quinze voluntários participaram do estudo cruzado e duplo-cego, que utilizaram dispositivos palatais intrabucais com 4 blocos de esmalte bovinos: 2 hígidos (para avaliar desmineralização) e 2 com lesões de cáries artificiais (para avaliar remineralização), por 4 fases de 14 dias cada. Os grupos de tratamentos eram: 1 - CHXF (solução de clorexidina 0,12% + NaF 0,05%), 2 - F (NaF 0,05%), 3 - CHX (clorexidina 0,12%) e 4 - CO (controle negativo), bochechadas 1 min/dia. Apenas sobre os blocos hígidos foi colocada uma proteção plástica e gotejada solução de sacarose 20% (8 x dia). Após cada fase, em todos os blocos foi determinada a porcentagem de mudança de microdureza de superfície (% SMC); foi também analisada, nos blocos hígidos, a composição do biofilme formado quanto a F, Pi, Ca, polissacarídeo insolúvel (IP). Resultados: Com relação a todas as análises realizadas, os grupos tratados com a associação de clorexidina-fluoreto não diferiram do fluoreto usado isoladamente, entretanto, quanto à capacidade de redução de desmineralização, esta combinação não diferiu do controle negativo, porém se mostrou diferente do controle negativo quando se avaliou a composição de Ca, IP no biofilme e da capacidade de aumentar a remineralização. Portanto, os resultados sugerem que a clorexidina combinada ao fluoreto não aumenta a capacidade do halógeno em controlar a desmineralização ou de potencializar seu efeito remineralizador.

**Palavras chave:** clorexidina, fluoreto, remineralização, desmineralização.



## INTRODUÇÃO

Os dois principais papéis do fluoreto na prevenção ou reversão da doença cárie são: a inibição da desmineralização e o favorecimento da remineralização [ten Cate, Featherstone, 1991]. Qualquer modelo que pretenda investigar a utilidade do fluoreto deve considerar os mecanismos supracitados, incluindo o papel da saliva.

Reconhecidamente, a cárie dental é uma infecção transmissível, tendo sido proposta a utilização de soluções antimicrobianas para prevenir e controlar a doença [Marsh, 1994; Caufield et al., 2001]. A clorexidina (CHX) é o padrão ouro dos agentes antimicrobianos para tratamentos antiplaca e antigengivite, contudo seus efeitos anticariogênicos ainda estão inconclusivos. A CHX é um agente promissor em virtude da sua capacidade de supressão da bactéria cariogênica, diminuindo a formação ácida e, assim, possibilitando e acentuando a ação “remineralizadora” do flúor [Tvetman, 2004].

O controle químico da placa pode constituir-se em um importante recurso auxiliar em subgrupos de pacientes cujo controle mecânico esteja comprometido ou ineficaz [Persson et al., 2001; Wyatt, 2002b]. Um maior efeito cariostático do fluoreto pela sua combinação com agentes antimicrobianos tem sido sugerido [Ullsfoss et al., 1994] e foi demonstrada a paralisação de lesões de cárie em pacientes irradiados com capacidade tampão salivar mínima decorrente de baixo fluxo salivar com a sua utilização [Katz, 1982]. Na prática clínica, em algumas situações, o uso de antimicrobianos associado com fluoreto pode ser necessário, particularmente em tratamentos de pacientes com elevados fatores de risco à doença, tais como: extrema disfunção salivar [Katz, 1982]; pacientes portadores de deficiência com limitações em sua capacidade de realizar eficazmente procedimentos de higiene bucal, requerendo, dessa forma, atenção especial [Erikson, 1997; Nielssen, Giebson, 1997]. Geralmente, a população acima de 65 anos de idade, que vive sob cuidados especiais, apresenta condição bucal muito desfavorável, sendo 30% deles, xerostômicos [Ship, 2004] e, entre aqueles que têm dentição natural, presença de cárie rampante [Wyatt, 2002a]. A doença cárie nestes indivíduos ocorre por diversas razões, principalmente pelo excessivo consumo de açúcar, pobre higiene bucal, uso de medicações que interferem no fluxo salivar e difícil acesso ao atendimento odontológico. O impacto da doença compromete sua nutrição e conforto geral, prejudicando particularmente a frágil saúde sistêmica dos idosos [Taylor et al., 2000].

A redução de placa dental por enxagüatórios bucais contendo NaF (F) + clorexidina (CHX) foi mostrada *in vivo* [Del bel Cury et al., 1994; Jenkins et al., 1993]. Similarmente, van Rijkom et al. [1996] relatam um efeito inibidor da clorexidina (CHX) na incidência de cárie de 46%. Em uma revisão da literatura, é apontada evidência pequena da contribuição do verniz fluoretado para a prevenção da cárie, em situações de alto risco à doença, mas incompleta evidência para outros métodos preventivos [Bader et al., 2000]. Um bochecho diário com solução de clorexidina a 0,12% reduziu número de *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus* na saliva de idosos com risco evidente de cárie [Macentee et al., 1990], mas a significância desta redução para o controle da doença não foi bem estabelecida. Bader et al. [2000] também consideram que a evidência da indicação da CHX para prevenção de cárie seria sugestiva, mas não conclusiva. Aparentemente, a maioria dos estudos não possuía poder estatístico suficiente para demonstrar a efetividade anticárie das soluções antimicrobianas em populações de alto risco para a doença. [Wyatt, Macentee, 2004].

O reconhecido efeito antiplaca da CHX deve-se à substantividade, capacidade de se reter na cavidade bucal, prolongando seu efeito antibacteriano, mesmo ante o contínuo fluxo de saliva do paciente. Deste modo, se o F diminuísse a adsorção da CHX aos receptores da cavidade bucal ou facilitasse sua saída (liberação), a CHX perderia seu principal atributo.

Para avaliar a efetividade da CHX, considerar a sua ação na proteção do esmalte contra a “desmineralização” parece ser mais adequado [ten Cate, Marsh, 1994] que averiguar seu efeito terapêutico no controle das lesões ativas de cárie, em razão do seu mecanismo de ação, que primariamente interfere no metabolismo bacteriano e, subseqüentemente, produz efeito na desmineralização do esmalte. Pesquisas precisam considerar os dois aspectos num mesmo momento, desde quando desmineralização e remineralização fazem parte da doença se ocorrem concomitantemente [Baelum et al., 2003].

O modelo usado neste estudo mensurou simultaneamente o resultante líquido da inibição da “desmineralização” e o acréscimo da “remineralização”. Conseqüentemente, o efeito dos tratamentos na desmineralização do esmalte foi avaliado nos blocos de esmalte hígidos (H), e o efeito sobre a remineralização foi verificado nos blocos com lesões artificiais de cárie (C).

A colocação de uma tela plástica sobre os blocos hígidos serviu de modelo de desmineralização, e os blocos artificialmente desmineralizados, livres dessa proteção

plástica, serviram de modelo de remineralização. A tela simula um ambiente local adjacente à superfície dental representativa de sítio de alto desafio cariogênico, encorajando a formação de placa bacteriana de uma definida espessura [Zero, 1992].

O objetivo deste estudo *in situ* foi avaliar o efeito da associação de CHX-F aplicada em esmalte bovino hígido na paralisação e na progressão de lesões não-cavidades de cárie, e analisar a composição bioquímica do biofilme dental formado na desmineralização do esmalte hígido em situação de alto desafio cariogênico.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### **Delineamento Experimental**

#### **a) Desenho do estudo**

Trata-se de um estudo *in situ* cruzado, duplo-cego, realizado em quatro fases de 14 dias cada. Quinze voluntários adultos participaram deste estudo, após terem assinado um termo de consentimento livre e esclarecido (Resolução N<sup>o</sup>. 196 do Ministério da Saúde, Brasília, DF, 10/038, 1996). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Vivos da Universidade Federal de Santa Catarina (Protocolo n<sup>o</sup>. 35/2003). Participaram do estudo, maiores de 18 anos, com boa saúde geral e bucal, e foram excluídos os que estivessem fazendo uso de antibióticos, de medicamentos que pudessem afetar fluxo salivar, ou de suplementos fluoretados prescritos por razões médicas, ou que apresentassem atividade das doenças cárie ou periodontal.

Os participantes usaram dispositivos acrílicos intrabucais palatais contendo quatro blocos de esmalte e foram randomicamente distribuídos em quatro grupos de tratamento: 1) solução de clorexidina 0,12% + fluoreto de sódio 0,05% (CHXF); 2) solução de fluoreto de sódio 0,05% (F); 3) solução de clorexidina 0,12% (CHX); 4) solução de controle negativo (nenhum princípio ativo) (CO). (Figura 1 - Diagrama).

Duzentos e quarenta blocos de esmalte foram preparados de incisivos bovinos esterilizados em solução de formaldeído a 2%, pH 7,0 [White, 1987] durante pelo menos 1 mês. A superfície dos blocos de esmalte foi polida para remover uma camada de 50 um [Featherstone, Zero, 1992]. O procedimento para obtenção dos blocos de esmalte bovinos (4X4X2 mm) foi previamente descrito por Cury et al. [1997]. Cada bloco de esmalte foi aplainado, polido, e calculou-se a média inicial de microdureza de superfície (SMH).

Todos os blocos foram avaliados quanto à sua microdureza superficial (SMH) e foram selecionados, para o experimento, apenas aqueles que apresentaram microdureza

superficial entre 275 a 440 ( $\pm 10\%$ ) KNH, através do microdurômetro (Shimadzu<sup>®</sup> HVM2) acoplado ao software CAMS\_WIN (Newage Testing Instruments, Inc.) e penetrador tipo Knoop, com carga estática de 50g/5s. Os blocos foram considerados íntegros se obtivessem SMH entre 272 – 440 ( $\pm 10\%$ ) KNH [Meredith et al., 1996], e desmineralizados, se a SMH estivesse abaixo desta faixa.

Espaços de 4,0 mm foram criados no dispositivo acrílico, permitindo que, no mínimo, 1,0 mm de profundidade permanecessem, após a inserção dos blocos de esmalte, para acúmulo de placa [Benelli et al., 1993; Cury et al., 1997; Cury et al., 2000]. Sobre os blocos hígidos (H), foram colocadas telas plásticas, fixadas com resina acrílica vermelha, que os protegia do distúrbio mecânico, facilitando o acúmulo da placa dental. Nestes blocos, os voluntários gotejavam solução de sacarose a 20%, 8 vezes ao dia, simulando, assim, situações de alto desafio cariogênico. Ao fim das fases clínicas, avaliou-se a perda mineral destes blocos e, nos blocos desmineralizados artificialmente (D), a recuperação da dureza. O estudo foi cruzado para controlar as variáveis inter-individuais com as 4 fases intercaladas por 10 dias de *wash out*, para eliminar possíveis efeitos residuais dos tratamentos anteriores.

Os blocos H e D foram distribuídos aleatoriamente nos quatro grupos de tratamento. Este modelo mede, simultaneamente, o resultado líquido da inibição da desmineralização e o aumento da remineralização. Os desfechos investigados foram: análise do esmalte, observando-se a perda e o ganho mineral, ou seja, percentagem de perda e recuperação de dureza de superfície, através de ensaio de microdureza, em 124 blocos hígidos e 124 desmineralizados, respectivamente; e nos esmaltes hígidos, também foi realizada análise bioquímica da composição da placa dental. A colocação de blocos dentais em posição cruzada, em um mesmo dispositivo intrabucal sujeitos a dois tratamentos diferentes, no caso, gotejamento e não gotejamento com sacarose, foi previamente testado, mostrando-se seguro em termos da não interferência do efeito de um tratamento no outro [Cury et al., 2001].

As lesões de cáries artificiais foram preparadas de acordo com Queiroz et al. [2003]. Todas as superfícies de dente dos blocos, excluindo-se a superfície de esmalte polida, foram protegidas com cera dental e os blocos foram submersos em 32 mL de uma solução de 50 mM de tampão acetato; 1,28 mM Ca; 0,74 mM PO<sub>4</sub>; 0,02 ppm F; pH 5, durante 36 horas a 37°C [Queiroz et al., 2003]. Após a desmineralização *in vitro*, foi medida a microdureza de superfície dos blocos de esmalte, colocando-se cinco

indentações diretamente 100 µM abaixo das iniciais. Blocos com SMH entre 5,2 - 115,8 KHN (média = 21,48 KHN) foram alocados randomicamente aos 4 tratamentos.

Os voluntários receberam instruções de forma oral e escrita para usar o dispositivo todo o tempo, inclusive à noite, só removendo-os às refeições, na ingestão de bebidas e durante a higiene bucal. Para simular o efeito farmacocinético do fluoreto na saliva, os dispositivos eram colocados imediatamente na boca após a escovação.

Dez dias antes do início do experimento (*lead in*), os voluntários começaram a usar o dentífrício fornecido pelo pesquisador, a fim de padronizar as concentrações de flúor na saliva [Zero, 1995]. Foram instruídos a só bochechar com as soluções-teste uma hora após a escovação com este dentífrício fluoretado 1100 ppm F (Sorriso Fresh, à base de sílica, contendo 1100 ppm F, NaF), pois antes deste intervalo, o detergente do dentífrício, Lauril Sulfato de Sódio (LSS), poderia inativar a ação da clorexidina [Barkevoll et al., 1989]. Os voluntários receberam também escovas dentais, fio dental, frasco-medida de 1mL, conta-gotas, soluções de sacarose a 20%, fornecidas periodicamente, estojo de aparelho ortodôntico, frascos com as soluções testadas para cada fase e durante todo o período do experimento, bem como uma folha impressa com instruções (Anexo 9).

Também foi solicitada a realização de um diário de dieta de 5 dias em cada fase clínica (Anexo 10) para comparar a variabilidade da dieta de cada voluntário quanto à cariogenicidade, que poderia alterar a resposta do modelo, até mesmo invalidando o desenho cruzado [Zero, 1995].

### ***b) Análise da Des/Remineralização do Esmalte***

Terminada cada fase clínica, a SMH foi novamente medida e obtida uma média por voluntário. Os blocos de esmalte foram retirados para análises da microdureza de superfície (SMH), o que permitiu avaliação da percentagem da perda e da recuperação de dureza de superfície (%PDS e %RDS, respectivamente). Foi usado um microdurômetro, descrito acima, para estas análises, com indentador Knoop, com carga estática de 50g/5s para SMH. Foi verificada microdureza superficial final dos blocos de esmalte (H), da forma anteriormente descrita, por médias de novas impressões a 100µm das indentações iniciais. A extensão de desmineralização foi calculada baseada na percentagem de perda de dureza superficial do esmalte (%PDS):

$$\%PDS = \frac{[(\text{dureza inicial} - \text{dureza após tratamento}) \times 100]}{\text{dureza inicial}}$$

Também, os blocos D tiveram sua média de microdureza superficial final determinada, sendo calculada a porcentagem de recuperação da dureza superficial do esmalte (%RDS):

$$\%RDS = \frac{[(\text{dureza após tratamento} - \text{dureza de desmineralização}) \times 100]}{(\text{dureza inicial} - \text{dureza de desmineralização})}$$

### ***c) Análise bioquímica de Biofilme Dental - Composição de Biofilme dental***

Dez horas após a última exposição ao tratamento, as telas plásticas dos blocos H foram removidas e foi coletado o biofilme dental, separadamente, com curetas plásticas, e pesado em tubos plásticos de microcentrífuga pré-pesados. Todo o biofilme formado sobre estes blocos foi coletado, homogeneizado com uma espátula e desidratado sob P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> para análise bioquímica (Figura 2 - Diagrama). Foram realizados os procedimentos já descritos por Cury et al. (1997), com modificação na proporção das soluções (100 µL de HCl, e 200 µL de NaOH/mg de peso seco da placa dental) para a extração dos componentes inorgânicos, fluoreto (F), cálcio (Ca), fósforo inorgânico (Pi) e de polissacarídeo insolúvel (PI), respectivamente. As análises foram realizadas da forma já descrita por Cury et al. [1997, 2000].

### ***d) Análise estatística***

Os dados foram estaticamente analisados de acordo com o desenho experimental casualizado aleatoriamente em blocos [Jones, Kenward, 1989] e a diferença entre os valores médios para cada teste considerado foi avaliado pelo teste de Friedman (5%).

Primeiramente, avaliou-se se foram garantidas as pressuposições de igualdade de variâncias e distribuição normal de erros para todas as variáveis de resposta testadas. Como as violações às pressuposições exigidas pelo teste de variância estavam comprometidas, optou-se pelo uso do teste não paramétrico de Friedman, com nível de significância de 5%. O software SAS foi usado (versão 8.02, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, 1999).

## **RESULTADOS**

Com respeito à biomassa da placa (Tabela 1), a quantidade formada nos blocos pelo tratamento de controle negativo (CO) foi significativamente maior que esses achados para os outros tratamentos ( $p < 0,05$ ). As concentrações de F no biofilme exposto aos tratamentos F, CHX e CO (Tabela 1) foram significativamente menores que os encontrados na associação de fluoreto e clorexidina CHXF ( $p < 0,05$ ), mas a diferença entre eles não foi significativa ( $p > 0,05$ ); com relação à concentração de Pi, verificaram-se maiores valores absolutos nos grupos que continham clorexidina, CHXF e CHX.

As concentrações de polissacarídeo insolúvel (PI) no biofilme formado por F e CHX (Tabela 1) foram significativamente maiores que em CHXF ( $p < 0,05$ ).

A mudança de microdureza superficial em relação ao ganho mineral (%RDS) foi percebida em todos os grupos, e em maiores valores absolutos em CHXF e F. Entretanto, a diferença estatisticamente significativa só apareceu em C, quando em comparação aos grupos CHXF, F e CHX.

## DISCUSSÃO

Um modelo *in situ* modificado de Koulourides et al. [1974] foi ampliado para incluir modelos de desmineralização e de remineralização, possibilitando a análise simultânea dos principais mecanismos de ação de fluoreto, isto é, a habilidade para inibir desmineralização e de aumentar remineralização do esmalte.

Esse modelo foi anteriormente validado por trabalhos que avaliaram a capacidade de dentifrícios de diferentes concentrações de fluoreto (0, 250; 500 e 1100 ppm F) para aumentar a remineralização do esmalte e inibir sua desmineralização [Zero et al., 1994; Zero, 1995; Cury et al. 2001; Zero et al., 2004]. A observação simultânea dos dois fenômenos aumenta a possibilidade de avaliação da eficácia clínica de tratamentos anticariogênicos e também contribui para melhor compreensão de como se manifesta este processo.

Se Ca e P salivares são derivados da placa e a sua presença está relacionada a fatores ambientais orais, então parece provável que haja um pouco de semelhança entre os dois tipos de placa. A distribuição de íons minerais na placa não é homogênea, variando em concentração do exterior às superfícies internas. Baixa concentração de Ca na placa deveria ter poder preditivo de cárie, concordando com pensamento atual no mecanismo de cáries. Quando a placa é exposta à sacarose, cai o pH, a concentração de

Ca no fluido da placa normalmente aumenta e tende a contrariar a depressão ácido-induzida e supersaturação em relação ao esmalte mineral. Este aumento do Ca é dependente em reservatórios adequados do íon em placa e é muito provável que menor concentração de Ca na placa resultará em uma deficiência neste mecanismo. Baixa concentração de Ca na placa pode ser considerada, assim, como um fator de risco para cáries, desde que participa da ativação dessa cadeia de eventos. Parece menos provável que a relação de Ca na placa e cárie seja indireta, ou seja, que a sacarose alimentar remova da mesma maneira o Ca da placa como remove o do esmalte [Pearce et al., 2002]. Entretanto, inesperadamente, o mesmo não foi verificado com as concentrações de P e F na placa que não mostraram nenhum poder preditivo no presente estudo.

#### ***a) Achados importantes***

Os achados desta pesquisa mostraram que a composição inorgânica de placa dental aumentou quando na presença de sacarose e principalmente no grupo tratado com a associação de clorexidina e flúor (CHXF). Este fato tem sido explicado por dois mecanismos: inicialmente, pela permanência de baixo pH que liberaria altos picos de íons minerais que poderiam difundir-se na saliva, bem como ao maior período de coleta da placa após a última exposição à sacarose, viabilizando a substituição dos íons que houvessem sido perdidos na saliva.

O aumento significativo de polissacarídeos insolúveis foi verificado quando a placa foi formada no grupo tratado com fluoreto (F) e as menores concentrações de cálcio, fluoreto e íons de fósforo foram achadas no grupo tratado sem princípio ativo (CO).

Ainda não existe uma relação direta entre a presença de placa e o desenvolvimento da doença. Poucos são os agentes antiplaca com comprovado efeito cariostático. Esta falta de eficácia está relacionada, primeiramente, ao fato de que os microrganismos da placa são organizados em um biofilme dental.

A redução da placa esteve sempre associada à prevenção de carie dental, entretanto microrganismos organizados em um biofilme são muito menos suscetíveis aos agentes antimicrobianos, sendo necessária uma concentração 10 a 500 vezes maior para que um agente tenha ação bactericida em relação aos microrganismos em fase planctônica. Provavelmente, isto decorre da dificuldade de penetração de agentes antimicrobianos em um biofilme e da alteração fenotípica dos microrganismos, quando nesta condição [Donlan, Costerton, 2002]. Portanto, pode-se inferir que a eficácia do



agente em estudo possa ser aumentada se usado em um veículo que permita maior penetração, como o verniz, bem como se aumentando a concentração da clorexidina e o seu tempo de uso.

### **b) Limitações do estudo**

Após duas semanas de exposição *in situ* aos produtos fluoretados, não foi verificada diferença entre a percentagem de remineralização do esmalte desmineralizado. Isto poderia decorrer da curta duração deste estudo para que qualquer remineralização pudesse acontecer especialmente em virtude de as amostras estarem sob placa constantemente, bem como devido a severidade e a natureza das lesões usadas neste estudo, que foram realizadas *in vitro*.

## CONCLUSÃO

Em conclusão, este estudo sugere que, entre os blocos hígidos, não houve diferença entre os tratamentos, em relação à %PDS; entretanto, comparando-se os tratamentos fluoretados (CHXF e F), a associação de clorexidina com flúor (CHXF) apresentou maior teor de Ca e de F.

Entre os blocos desmineralizados, a porcentagem de recuperação de dureza não apresentou diferença significativa entre os tratamentos com presença de princípio ativo (CHXF, F e CHX). Também não se pôde atribuir poder preventivo à desmineralização em situações de desafio cariogênico.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Dr. Celso Queiroz e à equipe do Laboratório de Bioquímica da FOP/UNICAMP, Mariza J.C. Soares, José Alfredo da Silva, pelo suporte técnico. Agradecemos aos voluntários por sua valiosa participação. Este artigo faz parte da Tese submetida pelo primeiro autor a Faculdade de odontologia, UFSC, SC, Brasil, como um dos requisitos do Programa de Pós-graduação em Odontologia, Área de Concentração em Odontopediatria, ao nível de Doutorado.

## REFERÊNCIAS

- Bader JD, Shugars D.A, Bonito AJ. Systematic reviews of selected dental caries diagnostic and management methods. *J Dent Educ* 2000;65;960-968.
- Baelum, V.; Machiulskiene, V.; Nyvad, B.; Richards, A.; Vaeth, M. Application of survival analysis to carious lesion transitions in intervention trials. *Community Dent Oral Epidemiol* 2003;31(4);252-260.
- Barkvoll P, Rolla G, Svendsen K. Interaction between chlorhexidine digluconate and sodium lauryl sulfate *in vivo*. *J Clin Periodontol* 1989;16(9); 593-595.
- Benelli, E.M.; Serra, M.C.; Rodriguez, Cury, J.A. *In situ* anticariogenic protection of glass ionomer cement. *Caries Res* 1993; 27; 280-284.
- Caufield, P.W.; Dasanayake AP, Li Y. The antimicrobial approach to caries management. *J Dent Educ* 2001; 65;1091–1095.
- Cury J.A., Hashizume L.N., del Bel Cury AA, Tabchoury CP. Effect of dentifrice containing fluoride and/or baking soda on enamel demineralization/remineralization: an *in situ* study. *Caries Res* 2001; 35(2); 106-110.
- Cury, J.A.; Del Bel Cury, A.A.; Derbyshire, M.T.; Tabchoury, C.P. Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in the presence of sucrose or glucose and fructose. *Caries Res* 2000; 34(6); 491-497.
- Cury, J.A.; Rocha, E.P.; Koo, H.; Francisco, S.B.; Del Bel Cury, A.A. Effect of saccharin on antibacterial activity of chlorhexidine gel. *Braz Dent J* 2000; 11(1); 29-34.
- Del Bel Cury A.A.; Cury, J.A.; Rebelo, M.A.B. Efeito do bochecho com clorexidina e flúor na redução e formação de placa dental e incorporação de flúor no esmalte dental. *Revista Brasileira de Odontologia* 1994;51(3); 26-29.
- Donlan, R.M.; Costerton, J.W. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 2002; 15(2); 167-193.
- Erikson L. Oral health promotion and prevention for older adults. *Dental Clin N Am* 1997; 41; 727-750.
- Featherstone JDB, Zero DT. An *in situ* model for simultaneous assessment of inhibition of demineralization and enhancement of remineralization. *J Dent Res* 1992; 71(special issue):804-810.
- Jenkins, S.; Addy, M.; Newcombe, R. Evaluation of a mouthrinse containing chlorhexidine and fluoride as an adjunct to bucal hygiene. *J Clin Periodontol* 1993; 20; 20-25.
- Jones B; Kenward, M. Design and analysis of cross-over trials. London: Chapman & Hall, 1989.
- Katz, S. The use of fluoride and chlorhexidine for the prevention of radiation caries. *J Am Dent Assoc* 1982; 104: 164-170
- Koulourides T, Phantumvanit P, Munskgaard EC, Housch T. An intra-oral model used for studies of fluoride incorporation in enamel. *J Oral Pathol* 1974; 3; 185-196.
- Macentee MI, Wyatt CCL, McBride B. A longitudinal study of caries and cariogenic bacteria in an elderly population. *Community Dent and Oral Epidemiol* n. 18, p.

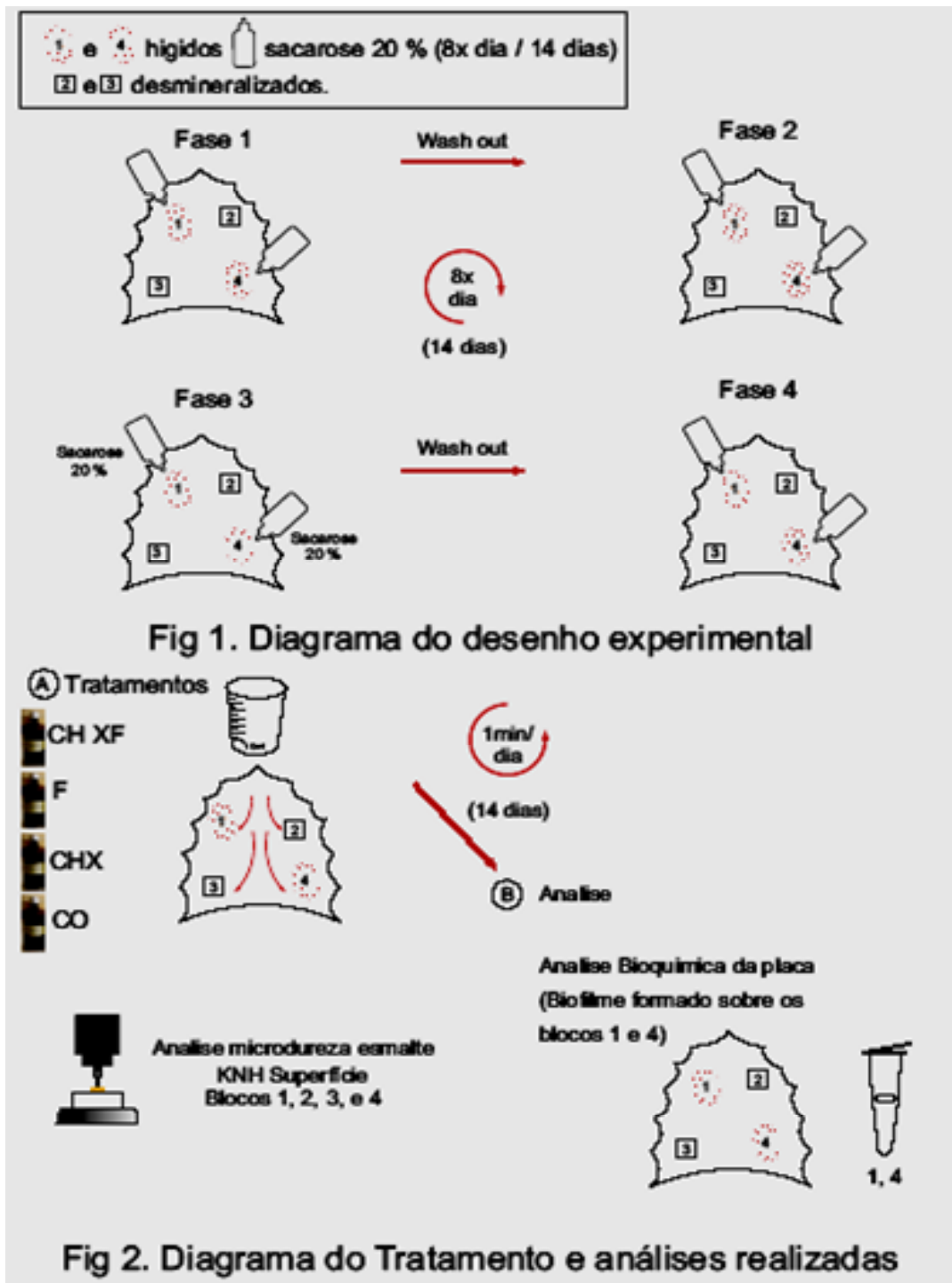
- 149-152, 1990.
- Marsh PD. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res.* 1994; 8(2); 263-271.
- Meredith N, Sherriff M, Stechell DJ, Swanson SA. Measurement of the microhardness and Young's modulus of human enamel and dentine using an indentation technique *Arc Oral Biol* 1996; 41; 539-545.
- Niessen LC, Gibson G. Oral health for a lifetime: Preventive strategies for the older adult. *Quintessence International* 1997; 28:626-630.
- Pearce EIF et al. Plaque minerals in the prediction of caries activity. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2002; 30; 61-69.
- Persson RE, Truelove EL, LeResche L, Robinovitch MR. Therapeutic effects of daily or weekly chlorhexidine rinsing on oral health of a geriatric population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1991;72(2):184-191.
- Queiroz CS, Hara AT, Paes Leme AF, Cury, JA. A pH-Cycling model to evaluate bovine enamel demineralization and dose-response effect of fluoride. *Caries Res* 2003; 37; 311.
- Ship JA. Oral health in the elderly-what's missing? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004;98(6):625-626.
- Taylor GW, Loerche WJ, Terpenning MS. Impact of oral diseases on systemic health in the elderly: diabetes mellitus and aspiration pneumonia. *J Public Health Dent* 2000; 60; 313-320.
- Ten Cate JM, Featherstone JD. Mechanistic aspects of the interactions between fluoride and dental enamel. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1991; 2(3):283-296.
- ten Cate JM, Marsh PD. Procedures for establishing efficacy of antimicrobial agents for chemotherapeutic caries prevention. *J Dent Res.* 1994;73(3):695-703
- Twetman S. Antimicrobials in future caries control? A review with special reference to chlorhexidine treatment. *Caries Res* 2004; 38(3); 223-229.
- Ullsfoss, B.N.; Ogaard, B.; Arends, J.; Ruben, J.; Rolla, G.; Afseth, J. Effect of a combined chlorhexidine and NaF mouthrinse: an *in vivo* human caries model study. *Scand J Dent Res* 1994; 102(2); 109-112.
- Van Rijkom, H.M.; Truim, G.J.; van 't Hof MA. A meta-analysis of clinical studies on the caries-inhibiting effect of chlorhexidine treatment. *J Dent Res* 1996; 75 (2);790-795.
- White, DJ. Reactive of fluoride dentifrices with artificial caries. I. Effects on early caries: F uptake, surface hardening and remineralization. *Caries Res* 1987; 21; 126-140.
- Wyatt CCL, Macentee MI. Caries management for institutionalized elders using fluoride and chlorhexidine mouthrinses. *Community Dent Oral Epidemiol* 2004; 32; 322-328.
- Wyatt CCL. Elderly Canadians residing in Long Term Care Hospitals: Part I – medical & dental status. *J Can Dent Assoc* 2002a; 68; 353-358.
- Wyatt CCL. Elderly Canadians residing in Long Term Care Hospitals: Part I –dental caries status. *J Can Dent Assoc* 2002b; 68; 353-358.

Zero DT, Fu J, Anne KM, Cassata S, SM, Gwinner LM. An improved intra-oral enamel demineralization test model for the study of dental caries. *Caries Res* 1992; 71(Special Issue); 871-878.

Zero, D.T. *In situ* Caries Models. *Adv. Dent Res* 1995; 9(3); 214-230.

Zero DT, Zhang JZ, Harper DS, Wu M, Kelly S, Waskow J, Hoffman M. The remineralizing effect of an essential oil fluoride mouthrinse in an intraoral caries test. *J Am Dent Assoc.* 2004; 135(2):231-237.

## Diagrama 1: Delineamento do estudo e análises realizadas



## Delineamento Experimental

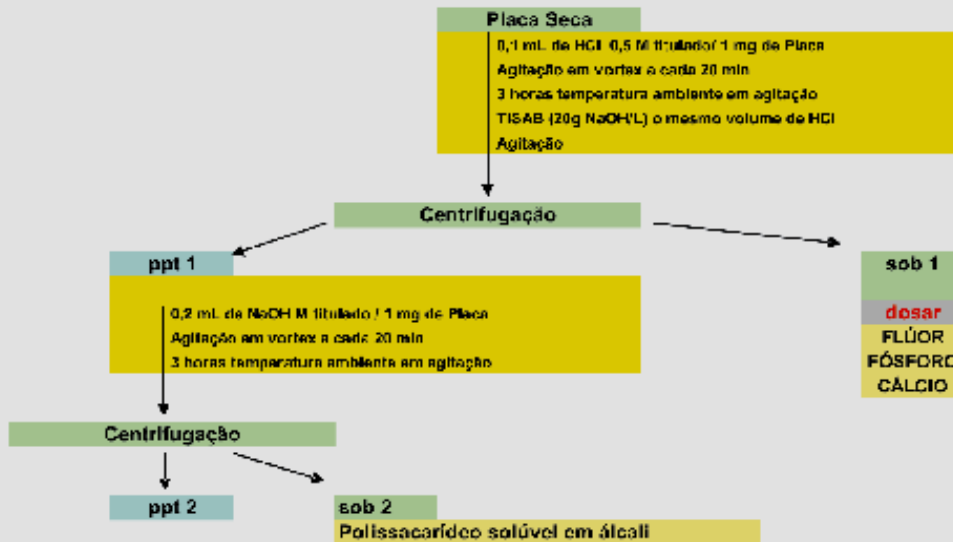
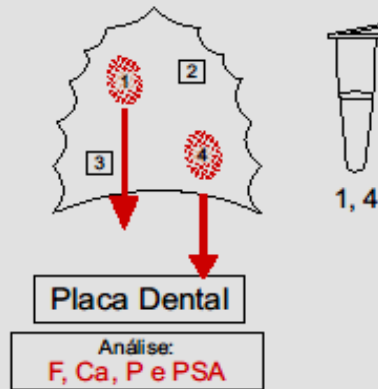


# Tratamentos

## Cruzamentos



Análise Bioquímica da placa  
(Biofilme formado sobre os  
blocos 1 e 4)



## Tabelas

**Tabela 1A:** Bioquímica (Média  $\pm$  DP) do biofilme dental (blocos H) em cada tratamento ( $\beta=0,95$ ), letras iguais sobrescritas representam médias que não diferem entre si pelo teste de Friedman, com nível de significância de 5%.

ANÁLISES	*TRATAMENTOS			
	CHXF	F	CHX	C
Biomassa, mg peso seco	2,25 $\pm$ 3,74 <sup>a,b</sup> (n=13)	1,91 $\pm$ 2,31 <sup>a,b</sup> (n=14)	0,63 $\pm$ 0,47 <sup>b</sup> (n=13)	2,28 $\pm$ 2,05 <sup>a</sup> (n=12)
F, $\mu\text{g/g}$	782,75 $\pm$ 560,64 <sup>a</sup> (n=10)	403,47 $\pm$ 284,21 <sup>a,b</sup> (n=13)	366,56 $\pm$ 273,99 <sup>b,c</sup> (n=10)	262,88 $\pm$ 310,29 <sup>c</sup> (n=12)
Ca, $\mu\text{g/mg}$ .	19,54 $\pm$ 20,36 <sup>a</sup> (n=12)	8,75 $\pm$ 6,81 <sup>a,b</sup> (n=13)	18,70 $\pm$ 18,94 <sup>a</sup> (n=12)	6,70 $\pm$ 9,23 <sup>b</sup> (n=12)
P <sub>i</sub> , $\mu\text{g/mg}$ .	135.7 $\pm$ 197.1 <sup>a,b</sup> (n=10)	38.0 $\pm$ 77.7 <sup>b</sup> (n=13)	152.6 $\pm$ 158.1 <sup>a</sup> (n=10)	61.6 $\pm$ 119.7 <sup>a,b</sup> (n=10)
Polissacarídeo insolúvel, $\mu\text{g/mg}$ .	30,86 $\pm$ 17,86 <sup>a,b</sup> (n=13)	90,22 $\pm$ 68,35 <sup>a</sup> (n=14)	41,13 $\pm$ 17,15 <sup>a,b</sup> (n=13)	32,13 $\pm$ 18,05 <sup>b</sup> (n=12)

**Tabela 1B:** Bioquímica (Média  $\pm$  DP e mediana com espaços quartílicos) do biofilme dental (blocos H) em cada tratamento ( $\beta=0,95$ ), pelo teste de Friedman, com nível de significância de 5%.

<b>Análises</b>	<b>CHXF</b>	<b>F</b>	<b>CHX</b>	<b>CO</b>
<b>Biomassa, mg/peso seco</b>				
Media (DP)	<b>2,26 (3,75)</b>	<b>1,91 (2,32)</b>	<b>0,63 (0,48)</b>	<b>2,29 (2,06)</b>
25 <sup>th</sup>	<b>0,23</b>	<b>0,48</b>	<b>0,23</b>	<b>0,56</b>
Mediana	<b>0,62</b>	<b>0,62</b>	<b>0,62</b>	<b>0,62</b>
75 <sup>th</sup>	<b>1,81</b>	<b>1,81</b>	<b>1,81</b>	<b>1,81</b>
Min	0,07	0,07	0,10	0,41
Máx	12,56	9,23	1,73	6,85
<b>F, <math>\mu\text{g/g}</math></b>				
Media (DP)	<b>782,75 (560,65)</b>	<b>403,48 (284,22)</b>	<b>366,57 (274,00)</b>	<b>262,88 (310,30)</b>
25 <sup>th</sup>	<b>392,24</b>	<b>151,42</b>	<b>160,21</b>	<b>33,27</b>
Mediana	<b>0,62</b>	<b>0,62</b>	<b>0,62</b>	<b>0,62</b>
75 <sup>th</sup>	<b>1,81</b>	<b>1,81</b>	<b>1,81</b>	<b>1,81</b>
Min	81,42	49,60	4,33	10,83
Máx	1812,89	1043,33	890,5	1135,57
<b>Ca, <math>\mu\text{g/mg}</math></b>				
Media (DP)	<b>19,55 (20,36)</b>	<b>8,75 (6,82)</b>	<b>18,70 (18,95)</b>	<b>6,70 (9,24)</b>
25 <sup>th</sup>	<b>6,47</b>	<b>2,64</b>	<b>3,61</b>	<b>1,10</b>
Mediana	<b>0,62</b>	<b>0,62</b>	<b>0,62</b>	<b>0,62</b>
75 <sup>th</sup>	<b>1,81</b>	<b>1,81</b>	<b>1,81</b>	<b>1,81</b>
Min	0,18	4,48	0,44	0,38
Máx	71,01	265,59	63,03	33,94
<b>Pi, <math>\mu\text{g/mg}</math></b>				
Media (DP)	<b>135,67 (197,12)</b>	<b>38,04 (77,68)</b>	<b>152,62 (158,10)</b>	<b>61,62 (119,70)</b>
25 <sup>th</sup>	<b>6,89</b>	<b>6,48</b>	<b>22,96</b>	<b>7,99</b>
Mediana	<b>0,62</b>	<b>0,62</b>	<b>0,62</b>	<b>0,62</b>
75 <sup>th</sup>	<b>1,81</b>	<b>1,81</b>	<b>1,81</b>	<b>1,81</b>
Min	0,47	-0,63	3,98	4,63
Máx	644,71	21,24	391,36	373,94
<b>Polissacarídeo insolúvel, <math>\mu\text{g/mg}</math></b>				
Media (DP)	<b>30,87 (17,86)</b>	<b>90,23 (68,36)</b>	<b>41,13 (17,15)</b>	<b>32,83 (18,06)</b>
25 <sup>th</sup>	<b>18,56</b>	<b>32,19</b>	<b>28,99</b>	<b>23,99</b>
Mediana	<b>0,62</b>	<b>0,62</b>	<b>0,62</b>	<b>0,62</b>
75 <sup>th</sup>	<b>1,81</b>	<b>1,81</b>	<b>1,81</b>	<b>1,81</b>
Min	13,07	11,27	25,62	10,67
Máx	81,25	251,62	79,09	69,94



**Tabela 2:** Análise de esmalte dental hígido (H) (Média  $\pm$  DP; mediana e intervalos interquartílicos) em cada tratamento ( $\beta=0,95$ ). Letras iguais sobrescritas representam médias que não diferem entre si pelo teste de Friedman, com nível de significância de 5%.

%PDS	CHXF	F	CHX	C
	(n=14)	(n=14)	(n=14)	(n=14)
Media (DP)	-28,53 (18,79) <sup>a</sup>	-29,54 (13,57) <sup>a</sup>	-17,62 (15,93) <sup>a,b</sup>	-14,02 (12,09) <sup>b</sup>
25 <sup>th</sup>	-28,66	-39,23	-24,76	-16,45
Mediana	0,62	0,62	0,62	0,62
75 <sup>th</sup>	1,81	1,81	1,81	1,81
Min	-74,87	-51,87	-51,23	-6,31
Máx	-11,47	-11,66	8,71	-1,53

**Tabela 2A:**

Limites IC (95%)

Tratamento	N	Media	DP	Superior	Inferior
C	15	-14,02	12,09	-7,03	-21,00
CHX	15	-17,61	15,92	-8,42	-26,81
CHXF	15	-28,53	18,79	-17,67	-39,38
F	15	-29,53	13,56	-21,70	-37,37

P = 0,0042

**Tabela 2B:** Variável dependente - %PDS - Valores de %PDS colocadas por ranks

Grupo	N	Media	Tratamento
A	14	3,14	C
BA	14	2,57	CHX
B	14	2,29	CHXF
B	14	2,0	F

**Tabela 3:** Análise de esmalte dental desmineralizado (D) (Média  $\pm$  DP; mediana e quartis) em cada tratamento ( $\beta=0,95$ ). Letras iguais sobrescritas representam médias que não diferem entre si pelo teste de Friedman, com nível de significância de 5%.

%RDS	CHXF (n=15)	F (n=15)	CHX (n=15)	C (n=14)
Media (DP)	50,05 (25,01) <sup>a</sup>	52,61 (11,24) <sup>a</sup>	40,82 (16,92) <sup>a</sup>	26,13 (12,65) <sup>b</sup>
25 <sup>th</sup>	26,00	43,00	47,60	18,62
Mediana	50,70	49,00	31,70	23,43
75 <sup>th</sup>	59,20	60,00	47,60	35,28
Min	15,10	38,50	52,00	6,01
Máx	95,80	77,50	58,00	47,69

**Tabela 3A**

Tratamento	N	Mediana	Media	DP	IC 95%	
					LI	LS
C	15	23,43	26,13	12,65	33,44	18,82
CHX	15	31,70	40,82	16,92	50,19	31,44
CHXF	15	50,70	50,05	25,01	63,90	36,20
F	15	49,00	52,60	11,23	58,82	46,38

P = 0,0018

**Tabela 3B:** Variável dependente - %RDS - Valores de %RDS colocadas por ranks

Grupo	N	Media	Tratamento
A	15	3,07	F
A	15	2,66	CHXF
A	15	2,53	CHX
B	14	1,57	CO

**Tabela 4:** Percentagem (media /desvio padrão) de perda de dureza superficial %PDS dos blocos hígidos e de recuperação (% RDS) dos com lesões artificiais de carie em função dos tratamentos.

*TRATAMENTOS	% PDS	%RDS
CHXF	-28,53 ± 18,79 <sup>a</sup> (n=14)	50,05 ± 25,01 <sup>a</sup> (n=15)
F	-29,53 ± 13,56 <sup>a</sup> (n=14)	52,6 ± 11,23 <sup>a</sup> (n=15)
CHX	-17,61 ± 15,92 <sup>a,b</sup> (n=14)	40,82 ± 16,92 <sup>a</sup> (n=15)
C	-14,029 ± 12,09 <sup>b</sup> (n=14)	26,13 ± 2,65 <sup>b</sup> (n=14)

## 2.2 ARTIGO 2

### 2.2.2 Versão em inglês

#### **Effect of Mouthrinse Containing Fluoride and Chlorhexidine on Enamel Demineralization/Remineralization: an *in situ* Study.**

A. R. D. Guimarães<sup>a, b \*</sup>, R. S. Vieira<sup>b</sup>, A. Modesto<sup>c</sup>, J. A. Cury<sup>d</sup>, C. P. M. Tabchoury<sup>d</sup>

<sup>a</sup>State University of Feira de Santana- UEFS, Brazil; <sup>b</sup>Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil; <sup>c</sup>Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil; <sup>d</sup>Faculty of Dentistry of Piracicaba, State University of Campinas, Piracicaba, SP, Brazil

**Correspondence:**

**Prof. Dr. Ricardo de Sousa Vieira**

**Department of Stomatology – Centro de Ciências da Saúde, Federal University of Santa Catarina - Trindade, Florianópolis, SC. 88010-970, Brazil.**

## ABSTRACT

The additive effect of chlorhexidine (CHX) on the preventive and therapeutical effect of fluoride (F) mouthrinses is not well established. Objectives: to evaluate *in situ* the effect of CHX – F on bovine dental biofilm composition and enamel de/remineralization. Methods: Volunteers (15), wearing palatal appliances containing 4 bovine enamel slabs: 2 sound and 2 with artificial caries lesions, took part in this blinded, crossover study conducted in 4 phases of 14 days. The treatments groups were: 1- CHXF (0.12% chlorhexidine + 0.05% NaF mouthrinse), 2- F (0.05% NaF), 3- CHX (0.12% chlorhexidine and 4- CO (negative control). The solutions were rinsed 1 min/day. The sound slabs (S), covered by a plastic mesh, were used to evaluate demineralization and two with artificial caries lesions (D) to evaluate remineralization. During each phase, one drop of a 20% sucrose solution was applied extra-orally on each sound slab, 8 times a day. After each phase, were determined the percentage of surface microhardness change (% SMH change) on all blocks; and the mineral content (F, Pi, Ca, insoluble polysaccharide) were analyzed in the biofilm formed on sound enamel. Results: Regarding all variables analyzed, the association of chlorhexidine-fluoride did not present differences of the fluoride used isolated. Even though, it was not verified differences in the capacity of control enamel demineralization at negative control group and chlorhexidine- fluoride group, the opposite was shown, concerning the composition of Ca an IP at the biofilm and the ability of increase enamel remineralization. Despite the treatment with CHXF showed *in situ* remineralization, the results suggest that the association of chlorhexidine to fluoride did not interfere to the halogen capacity of remineralization.

**Keywords:** chlorhexidine, fluoride, remineralization, demineralization.

## INTRODUCTION

The two principal roles of fluoride in the prevention or reversal of dental caries are the inhibition of demineralization and the enhancement of remineralization [ten Cate, Featherstone, 1991]. Any model designed to investigate the usefulness of fluoride should take the above-mentioned mechanisms into consideration, including the role of saliva.

Dental caries is a multi-factorial disease in which the fermentation of dietary carbohydrate by oral bacteria results in acid dissolution of tooth structure. Thus, the use of antimicrobial solutions has been proposed for the prevention and control of this disease [Marsh, 1994; Caufield et al, 2001]. Chlorhexidine (CHX) is the gold-standard among antimicrobial agents for the treatment of plaque and gingivitis; however, its effectiveness as an anticariogenic agent remains to be confirmed. CHX is a promising agent because of its ability to suppress cariogenic bacteria, reducing acid formation and, therefore, permitting and enhancing the remineralizing action of fluoride [Tvetman, 2004].

Chemical plaque control may be an important additional resource in sub-groups of patients whose motor control is compromised or ineffective [Persson et al, 2001; Wyatt, 2002b]. It has also been suggested that a greater cariostatic effect may be achieved if fluoride is combined with antimicrobial agents [Ullsfooss et al, 1994], and arrestment of caries has been shown following its use in irradiated patients with minimal buffering capability of saliva as a result of low salivary flow [Katz, 1982]. In clinical practice, the use of antimicrobial agents associated with fluoride may be necessary in some situations, particularly in the treatment of patients with high risk factors for dental caries, such as pronounced salivary dysfunction [Katz, 1982], and in the case of disabled patients who cannot efficiently care for their own oral hygiene requirements, therefore needing special attention [Erikson, 1997; Nielssen, Giebson, 1997]. In general, the population of more than 65 years of age with special care needs has extremely poor oral health. Thirty percent of them are xerostomic [Ship, 2004] and among those who retain their original teeth, caries is rampant [Wyatt, 2002a]. Dental caries in these individuals occurs for various reasons, principally excessive sugar consumption, poor oral hygiene, the use of medication that interferes with salivary flow and difficult access to dental treatment. The disease affects their nutrition and general comfort, and is particularly harmful to the fragile health of the elderly [Taylor et al, 2000].

The ability of oral mouthrinses containing NaF (F) + chlorhexidine (CHX) to reduce dental plaque has been demonstrated *in vivo* [Del Bel Cury et al, 1994; Jenkins et al, 1993]. Van Rijkom et al [1996] also reported an inhibitory effect of 46% in the incidence of caries with the use of chlorhexidine (CHX). In a literature review, there was slight evidence that fluoridated varnish contributed to the prevention of caries in situations of high risk for the disease, and inconclusive evidence for other preventive methods [Bader et al, 2000]. The daily use of a mouthrinse solution of 0.12% chlorhexidine reduced the number of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* in the saliva of elderly patients with an evident risk of caries [Macentee et al, 1990], but the clinical significance of this reduction in the control of the disease has not yet been established. Bader et al [2000] also considered that the evidence in favor of the use of CHX for the prevention of caries was suggestive but not conclusive. It would appear that the majority of studies had insufficient statistical power to demonstrate the efficacy of an antimicrobial solution in combating dental caries in populations at high risk of the disease [Wyatt, Macentee, 2004].

The recognized anti-plaque effect of CHX is attributed to the high oral substantivity (retarded oral clearance) of its antibacterial effect, despite the patient's continuous salivary flow. Therefore, if F reduced the adsorption of CHX by receptors in the oral cavity or promoted its liberation, CHX would lose its principal quality.

The most appropriate method for evaluating the efficacy of CHX would seem to be by assessing its action on the protection of enamel against demineralization [ten Cate, Marsh, 1994] rather than by verifying its therapeutic effect on the control of active carious lesions, since its mechanism of action functions primarily by affecting bacterial metabolism, subsequently interfering with demineralization of the enamel. Research efforts need to consider these two aspects together, since demineralization and remineralization occur simultaneously [Baelum et al, 2003].

The model used in this study simultaneously measured the net result of demineralization inhibition and the increase of remineralization. Therefore, the effect of the treatments on the demineralization of the enamel was evaluated in slabs of sound enamel (S) and the effect on remineralization was evaluated in slabs with artificial carious lesions (D).

The objective of this *in situ* study was to evaluate the effect of the association of CHX-F applied to sound bovine enamel in the arrest and progression of non-cavitated carious lesions, and to analyze the biochemical composition of the dental biofilm formed during demineralization of the sound enamel in situations of high cariogenic challenge.

## MATERIAL AND METHODS

### **a) Study design:**

This double-blind, cross-over study was carried out *in situ* in four phases of 14 days each. Fifteen adult volunteers participated in the study after giving their signed, informed consent (Resolution 196 of the Ministry of Health, Brasilia, DF, 10/038, 1996). This study was approved by the Ethical and Research Committee of Federal University of Santa Catarina (Protocol 35/2003). Patients over 18 years of age in good general and oral health were enrolled to the study. Subjects using antibiotics, any medication that could potentially affect salivary flow, or fluoridated supplements prescribed for medical reasons, and subjects with dental caries or periodontal disease were excluded from the study.

All participants used intraoral acrylic palate devices containing four enamel blocks and were randomly distributed into four treatment groups: 1) 0.12% chlorhexidine solution + 0.05% sodium fluoride (CHXF); 2) 0.05% solution of sodium fluoride (F); 3) solution of 0.12% chlorhexidine (CHX); and 4) negative control (solution containing no active ingredient) (CO), (Figure 1).

Two hundred and forty enamel samples were prepared from bovine incisors sterilized in a 2% formaldehyde solution, pH 7.0 [White, 1987] for at least one month. The surface of the enamel slabs was polished to remove a 50  $\mu\text{m}$  layer [Featherstone, Zero, 1982]. The procedure for obtaining slabs of bovine enamel (4 x 4 x 2 mm) has been previously described by Cury et al [1997]. Each enamel slab was smoothed and polished, and the initial mean surface microhardness (SMH) was calculated.

Surface microhardness (SMH) of all the samples was evaluated and only those with SMH of 275 - 440 ( $\pm 10\%$ ) KNH were selected for the experiment. Microhardness was measured using a Shimadzu<sup>®</sup> HMV2 microhardness tester linked to the CAMS\_WIN software program (Newage Testing Instruments<sup>®</sup>, Inc.) and a Knoop indenter with static load of 50g/5s. The slabs were considered sound when they had a SMH of 272 - 440 KNH ( $\pm 10\%$ ) [Meredith et al, 1996] and demineralized if the SMH was below this range. Four spaces of 4.0 mm were created in the acrylic device, allowing at least 1.0 mm of depth to remain following insertion of the enamel slabs so that plaque would be allowed to form [Benelli et al, 1993; Cury et al, 1997; Cury et al, 2000].



The artificially demineralized model was made by placing a plastic mesh over the sound slabs, while the demineralized slabs without this plastic protection served as the remineralization models. Plastic mesh was firmly fixed over the sound slabs (S) with red acrylic resin, protecting them from mechanical disturbance and encouraging the formation of dental plaque, with the formation of bacterial plaque of defined thickness [Zero, 1992].

Participants placed drops of a 20% sucrose solution 8 times a day onto the slabs, simulating situations of high cariogenic challenge. At the end of the clinical phases, mineral loss from the sound slabs and recovery of hardness in the artificially demineralized slabs (D) was evaluated. This was a cross-over study to control inter-individual variables, and the four phases were interspersed by 10 days of wash-out to eliminate possible residual effects of previous treatments.

S and D slabs were randomly distributed into four treatment groups. This model simultaneously measures the net result of inhibition of demineralization and increase in remineralization. The study end-points were: analysis of the enamel, particularly mineral loss and gain, i.e. percentage of loss and recovery of surface hardness, as evaluated by the microhardness test in 124 sound and 124 demineralized slabs, respectively. In the sound enamel, a biochemical analysis of the composition of dental plaque was also carried out. A previous cross-over test was carried out by placing the dental slabs in the opposite position of the same intraoral device and subjecting them to two different treatments, i.e. exposure to drops of sucrose or not, to demonstrate the non-interference of one treatment with the other [Cury et al, 2001].

The artificial carious lesions were prepared according to procedures established by Queiroz et al [2003]. All the surfaces of the slabs, except for the polished enamel surface, were protected with dental wax and the slabs were submersed in 32 mL of a solution containing 50 mM of buffered acetate, 1.28 mM Ca, 0.74 mM PO<sub>4</sub>, 0.02 ppm F, pH 5, for 36 hours at 37°C [Queiroz et al, 2003]. Following *in vitro* demineralization, the surface microhardness of the enamel slabs was measured by placing five indentations directly 100 µm below the initial ones. Slabs with SMH between 5.2 and 115.8 KHN (mean 21.48 KHN) were randomly allocated to one of the four treatment groups.

The volunteers received oral and written instructions to use the device at all times, even at night, and only to remove it for meals, while ingesting liquids or when brushing their teeth. To simulate the pharmacokinetic effect of fluoride in saliva, the devices were placed in the mouth immediately following brushing.

Ten days prior to initiation of the experiment (lead-in period), the volunteers began using the toothpaste supplied by the investigator in order to standardize the concentration of fluoride in the saliva [Zero, 1995]. They were instructed to rinse their mouth with the test solution only one hour after brushing with this fluoridated toothpaste 1100 ppm F (Sorriso Fresh, silica-based, containing 1100 ppm F, NaF). Mouthrinsing prior to one hour after brushing may cause the detergent in the toothpaste, Lauryl Sodium Sulphate (LSS), to inactivate the effect of chlorhexidine [Barkevoll et al, 1989]. Participants also received toothbrushes, dental floss, a bottle marked with 1 mL measurements, dropper, samples of 20% sucrose solution, which were supplied at regular intervals, a case for the orthodontic device, bottles with test solutions for each phase and for the entire study, as well as printed instructions (Attachment 9).

Participants were also asked to keep a record of their diet for five days during each clinical phase (Attachment 10) to compare any variability in the participant's diet with respect to cariogenicity that could alter the response of the model or even invalidate the cross-over design [Zero, 1995].

#### ***b) Analysis of demineralization / remineralization of enamel***

At the end of each clinical phase, SMH was measured again and a mean was established for each participant. The enamel slabs were removed for analysis of surface microhardness, which permitted evaluation of the percentage of loss and recovery of surface hardness (%SMH change: %LSMH and %RSMH, respectively). A microhardness tester, described above, was used to carry out these analyses using a Knoop indenter with a static load of 50g/5s for SMH.

Final surface microhardness was measured in the enamel slabs (S), as described above, by making new 100 µm impressions of the initial indentations. The extent of demineralization was calculated based on the percentage of loss of enamel surface hardness (%LSMH):

$$\%LSMH = \frac{[(\text{initial hardness} - \text{post-treatment hardness}) \times 100]}{\text{initial hardness}}$$

In addition, the mean microhardness of the D slabs was determined, as well as the percentage of recuperation of the surface hardness of the enamel (%RSMH).

$$\%RSMH = \frac{[(\text{post-treatment hardness} - \text{demineralization hardness}) \times 100]}{(\text{initial hardness} - \text{demineralization hardness})}$$

### ***c) Biochemical analysis of dental biofilm – Composition of dental biofilm***

Ten hours after the last exposure to treatment, the plastic mesh was removed from the S slabs and the dental biofilm was collected separately, using plastic cures, and weighed in pre-weighed plastic microcentrifuge tubes. The entire biofilm formed on these blocks was collected, homogenized with a spatula and dehydrated under  $P_2O_5$  for biochemical analysis (Figure 2). Procedures previously described by Cury et al [1997] were carried out, with a modification in the proportion of the solutions (100  $\mu$ L of HCl and 200  $\mu$ L of NaOH/mg of dry weight of the dental plaque) for the extraction of the inorganic components, fluoride (F), calcium (Ca), inorganic phosphorus (Pi) and insoluble polysaccharide (IP), respectively. The analyses were carried out as previously described by Cury et al [1997, 2000].

### ***d) Statistical Analyses***

Data were statistically analyzed using a randomized complete block experimental design [Jones, Kenward, 1989] and the difference between mean values for each test was evaluated using Friedman's test (5%).

First, the hypothesis of equality of variances were verified, as well as the normal distribution of errors for all the variables of response tested. Since the hypotheses required by the test of variance were compromised by violations, it was decided to use Friedman's test, with significance level established at 5%. The SAS software program, version 8.02 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, 1999) was used.

## **RESULTS**

Regarding the plaque biomass (Table 1), the quantity formed by the negative control treatment (CO) in the slabs was significantly greater than that formed following other treatments ( $p < 0.05$ ). The concentrations of F in the biofilm exposed to the F, CHX and CO treatments (Table 1) were significantly less than those of the group treated with CHXF ( $p < 0.05$ ), but the difference among them was not significant ( $p > 0.05$ ). The concentration of Pi absolute values were verified in the groups that contained chlorhexidine, CHXF and CHX. The concentrations of insoluble polysaccharides (IP) in the biofilm formed during F and CHX (Table 1) were significantly larger greater than in CHXF ( $p < 0, 05$ ).

Considering the change in enamel surface microhardness, the mineral recovery (%RSMH) was noticed in all the groups, and in greater absolute values in CHXF and F. However, the difference statistically significant among them was significant ( $p>0.05$ ) only in CO, in comparison to the others groups (CHXF, F and CHX).

## DISCUSSION

A modified *in situ* model designed by Koulouridies et al. [1974] was expanded to include models of demineralization and remineralization, allowing simultaneous analysis of the principal mechanisms of action of fluoride, i.e. the ability to inhibit demineralization and to increase remineralization of the enamel.

This model had been previously validated in studies that assessed the capacity of toothpastes containing different concentrations of fluoride (0, 250, 500 and 1100 ppm F) to increase enamel remineralization and inhibit its demineralization [Zero et al, 1994; Zero, 1995; Cury et al, 2001; Zero et al., 2004]. The simultaneous observation of the two phenomena increases the possibility of evaluating the clinical efficacy of the anticaries treatments and also contributes towards a better understanding of the mechanism of this process.

If salivary Ca and P are a result of plaque and its presence is related to environmental factors in the mouth, then there is probably some similarity between the two types of plaque. This distribution of mineral ions in plaque is not homogeneous, and varies in concentration from the external to the internal surfaces. In accordance with current thinking on the mechanism of dental caries, low concentrations of Ca in plaque should be predictive of dental caries. When plaque is exposed to sucrose, pH falls, and the concentration of Ca in plaque fluid normally increases and tends to counteract the acid-induced depression and supersaturation compared to mineral enamel. This increase in Ca is dependent on adequate reserves of this ion in plaque and it is very probable that the lower concentration of Ca in plaque will result in a deficiency in this mechanism. A low concentration of Ca in plaque may, therefore, be considered a risk factor for caries since it participates in the activation of this chain of events. It would seem less probable that the relation of Ca in plaque and dental caries would be indirect, i.e. that alimentary sucrose removes Ca from plaque in the same way that it removes it from enamel [Pearce et al,

2002]. However, similar results were not found for P and F concentrations in plaque, which, in the current study, showed no predictive power.

**a) Important findings:**

The findings of this study showed that the inorganic composition of dental plaque increased when exposed to sucrose, and mainly in the treated group treated with association of chlorhexidine and fluoride (CHXF). The change in the inorganic composition of dental plaque may be explained by the persistently low pH that would release high peaks of mineral ions that may be diffused in saliva; or the longer period of plaque accumulation following the last exposure to sucrose, making the substitution of ions that had become lost in saliva possible.

A significant increase in insoluble polysaccharides was found when plaque was formed in the group treated with fluoride (F). The smallest concentrations of calcium, fluoride and phosphorus ions were detected in the negative control group (CO).

A reduction in plaque was always associated with the prevention of dental caries; however, there is no direct relationship between the presence of plaque and development of the disease. Few anti-plaque agents have proven to have cariostatic effect. This lack of efficacy is related, primarily, to the fact that the microorganisms in plaque are organized in dental biofilm. Microorganisms organized in biofilm are much less susceptible to antimicrobial agents, requiring concentrations 10-500 times higher for an agent to have bactericidal action compared to the microorganisms in planktonic phase. Probably, this occurs as a result of the difficulty of penetration of antimicrobial agents in biofilm and of the phenotypical alteration of the microorganisms in this condition [Donlan, Costerton, 2002].

Thus, it can be assumed that the effectiveness of antimicrobial agents could be improved using other vehicle that could allow superior penetration, i.e., varnish. Other possibility could be, increasing the concentration of the chlorhexidine or the duration of study.

**b) Limitations of the study:**

After two weeks of *in situ* exposure to the fluoridated products, neither was verified remineralization of the demineralized enamel, nor correlation between absorption of fluoride and changes in microhardness in these slabs was observed. It could be explained

because of regimen adopted in the current study, particularly considering the severity and nature of carious lesions used.

## CONCLUSIONS

This study indicates that in the sound slabs, there was no difference among the treatments in relation to the %LSMH; however, treatment with CHXF resulted in higher Ca and F levels than treatment with fluoride alone.

In the demineralized slabs, there was no difference among groups treated with principles actives (CHXF, F, CHX) regarding the gain of mineral contend (%RSMH). These results confirm those found in the clinical trial (Study 1) that remineralization following treatment with CHXF was no greater than that found after use of F. Moreover, there was no preventive demineralization effect in situations of high cariogenic challenge.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful for the technical assistance of Dr. Celso Queiroz and staff at the Biochemistry Laboratory FOP/UNICAMP. We thank the volunteers for their valuable participation, the technicians of the Laboratory of Oral Biochemistry of the Faculty of Dentistry of Piracicaba, UNICAMP, Mariza J.C. Soares and José Alfredo da Silva, for technical assistance, and to. The manuscript was based on a thesis submitted by the first author to Faculty of Dentistry, UFSC, SC, Brazil, as a partial fulfillment of the requirements of the PHD Program in Dentistry, concentration in Pediatric Dentistry.

## REFERENCES

- Bader JD, Shugars D.A, Bonito AJ. Systematic reviews of selected dental caries diagnostic and management methods. *J Dent Educ* 2000;65;960-968.
- Baelum, V.; Machiulskiene, V.; Nyvad, B.; Richards, A.; Vaeth, M. Application of survival analysis to carious lesion transitions in intervention trials. *Community Dent Oral Epidemiol* 2003;31(4);252-260.
- Barkvoll P, Rolla G, Svendsen K. Interaction between chlorhexidine digluconate and sodium lauryl sulfate *in vivo*. *J Clin Periodontol* 1989;16(9); 593-595.
- Benelli, E.M.; Serra, M.C.; Rodriguez, Cury, J.A. *In situ* anticariogenic protection of glass ionomer cement. *Caries Res* 1993; 27; 280-284.
- Caufield, P.W.; Dasanayake AP, Li Y. The antimicrobial approach to caries management. *J Dent Educ* 2001; 65;1091–1095.
- Cury J.A., Hashizume L.N., del Bel Cury AA, Tabchoury CP. Effect of dentifrice containing fluoride and/or baking soda on enamel demineralization/remineralization: an *in situ* study. *Caries Res* 2001; 35(2); 106-110.
- Cury, J.A.; Del Bel Cury, A.A.; Derbyshire, M.T.; Tabchoury, C.P. Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in the presence of sucrose or glucose and fructose. *Caries Res* 2000; 34(6); 491-497.
- Cury, J.A.; Rocha, E.P.; Koo, H.; Francisco, S.B.; Del Bel Cury, A.A. Effect of saccharin on antibacterial activity of chlorhexidine gel. *Braz Dent J* 2000; 11(1); 29-34.
- Del Bel Cury A.A.; Cury, J.A.; Rebelo, M.A.B. Efeito do bochecho com clorexidina e flúor na redução e formação de placa dental e incorporação de flúor no esmalte dental. *Revista Brasileira de Odontologia* 1994;51(3); 26-29.
- Donlan, R.M.; Costerton, J.W. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 2002; 15(2); 167-193.
- Erikson L. Oral health promotion and prevention for older adults. *Dental Clin N Am* 1997; 41; 727-750.
- Featherstone JDB, Zero DT. An *in situ* model for simultaneous assessment of inhibition of demineralization and enhancement of remineralization. *J Dent Res* 1992; 71(special issue):804-810.
- Jenkins, S.; Addy, M.; Newcombe, R. Evaluation of a mouthrinse containing chlorhexidine and fluoride as an adjunct to bucal hygiene. *J Clin Periodontol* 1993; 20; 20-25.
- Jones B; Kenward, M. Design and analysis of cross-over trials. London: Chapman & Hall, 1989.
- Katz, S. The use of fluoride and chlorhexidine for the prevention of radiation caries. *J Am Dent Assoc* 1982; 104: 164-170
- Koulourides T, Phantumvanit P, Munskgaard EC, Housch T. An intra-oral model used for studies of fluoride incorporation in enamel. *J Oral Pathol* 1974; 3; 185-196.
- Macentee MI, Wyatt CCL, McBride B. A longitudinal study of caries and cariogenic bacteria in an elderly population. *Community Dent and Oral Epidemiol* n. 18, p. 149-152, 1990.

- Marsh PD. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res.* 1994; 8(2); 263-271.
- Meredith N, Sherriff M, Stechell DJ, Swanson SA. Measurement of the microhardness and Young's modulus of human enamel and dentine using an indentation technique *Arc Oral Biol* 1996; 41; 539-545.
- Niessen LC, Gibson G. Oral health for a lifetime: Preventive strategies for the older adult. *Quintessence International* 1997; 28:626-630.
- Pearce EIF et al. Plaque minerals in the prediction of caries activity. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2002; 30; 61-69.
- Persson RE, Truelove EL, LeResche L, Robinovitch MR. Therapeutic effects of daily or weekly chlorhexidine rinsing on oral health of a geriatric population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1991;72(2):184-191.
- Queiroz CS, Hara AT, Paes Leme AF, Cury, JA. A pH-Cycling model to evaluate bovine enamel demineralization and dose-response effect of fluoride. *Caries Res* 2003; 37; 311.
- Ship JA. Oral health in the elderly-what's missing? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004;98(6):625-626.
- Taylor GW, Loerche WJ, Terpenning MS. Impact of oral diseases on systemic health in the elderly: diabetes mellitus and aspiration pneumonia. *J Public Health Dent* 2000; 60; 313-320.
- Ten Cate JM, Featherstone JD. Mechanistic aspects of the interactions between fluoride and dental enamel. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1991; 2(3):283-296.
- ten Cate JM, Marsh PD. Procedures for establishing efficacy of antimicrobial agents for chemotherapeutic caries prevention. *J Dent Res.* 1994;73(3):695-703
- Twetman S. Antimicrobials in future caries control? A review with special reference to chlorhexidine treatment. *Caries Res* 2004; 38(3); 223-229.
- Ullsfoss, B.N.; Ogaard, B.; Arends, J.; Ruben, J.; Rolla, G.; Afseth, J. Effect of a combined chlorhexidine and NaF mouthrinse: an *in vivo* human caries model study. *Scand J Dent Res* 1994; 102(2); 109-112.
- Van Rijkom, H.M.; Truim, G.J.; van 't Hof MA. A meta-analysis of clinical studies on the caries-inhibiting effect of chlorhexidine treatment. *J Dent Res* 1996; 75 (2);790-795.
- White, DJ. Reactive of fluoride dentifrices with artificial caries. I. Effects on early caries: F uptake, surface hardening and remineralization. *Caries Res* 1987; 21; 126-140.
- Wyatt CCL, Macentee MI. Caries management for institutionalized elders using fluoride and chlorhexidine mouthrinses. *Community Dent Oral Epidemiol* 2004; 32; 322-328.
- Wyatt CCL. Elderly Canadians residing in Long Term Care Hospitals: Part I – medical & dental status. *J Can Dent Assoc* 2002a; 68; 353-358.
- Wyatt CCL. Elderly Canadians residing in Long Term Care Hospitals: Part I –dental caries status. *J Can Dent Assoc* 2002b; 68; 353-358.
- Zero DT, Fu J, Anne KM, Cassata S, SM. Gwinner LM. An improved intra-oral enamel demineralization test model for the study of dental caries. *Caries Res* 1992; 71(*Special Issue*); 871-878.



Zero, D. T. *In situ* Caries Models. *Adv. Dent Res* 1995; 9(3); 214-230.

Zero DT, Zhang JZ, Harper DS, Wu M, Kelly S, Waskow J, Hoffman M. The remineralizing effect of an essential oil fluoride mouthrinse in an intraoral caries test. *J Am Dent Assoc.* 2004; 135(2):231-237.

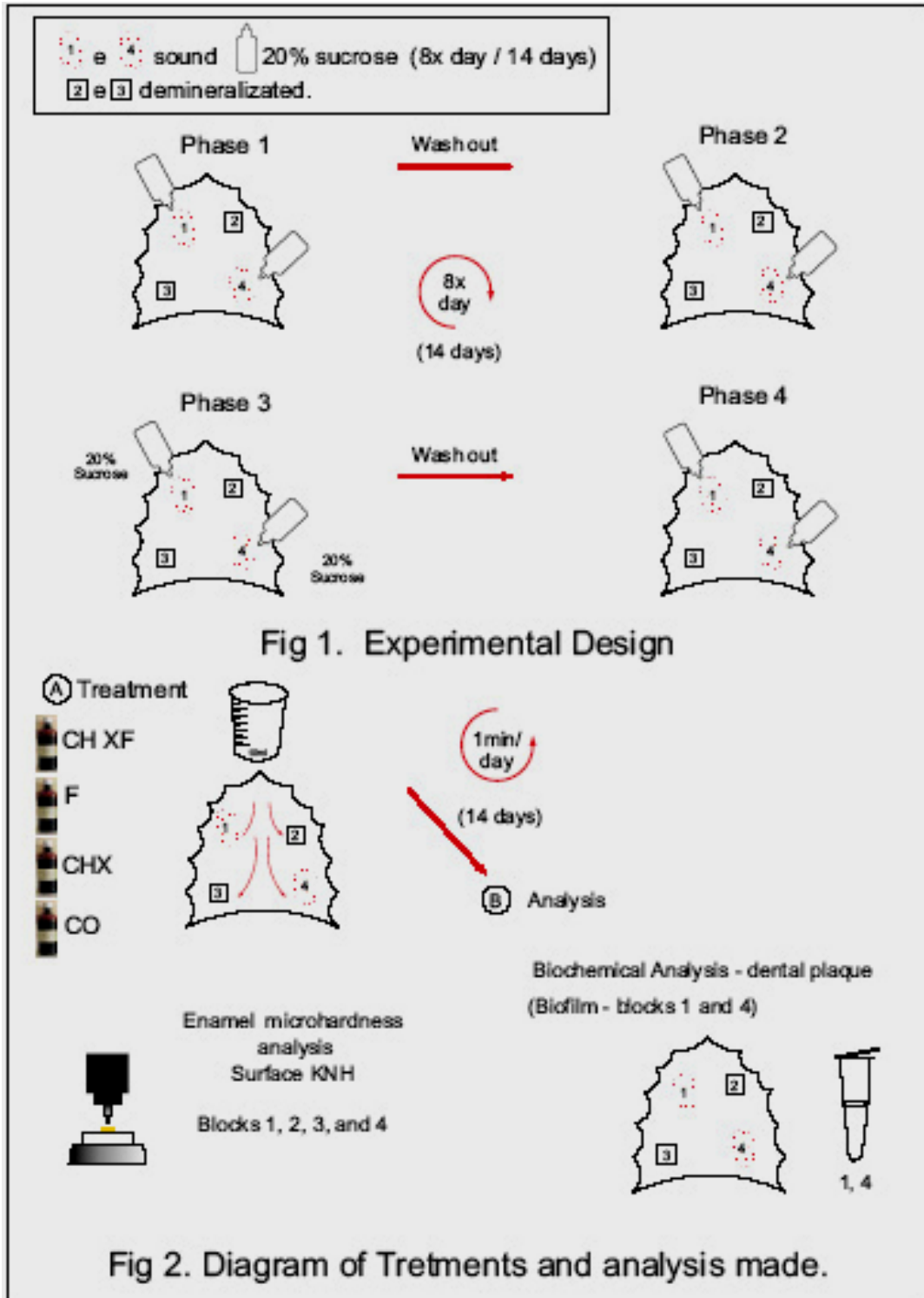


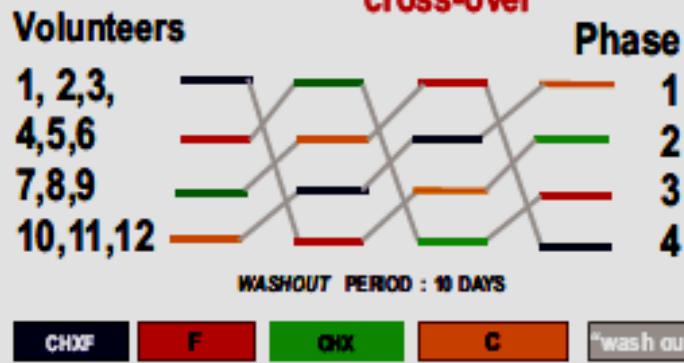
Figure 2. Diagram of the treatments and the analyses made.

## Experimental Design

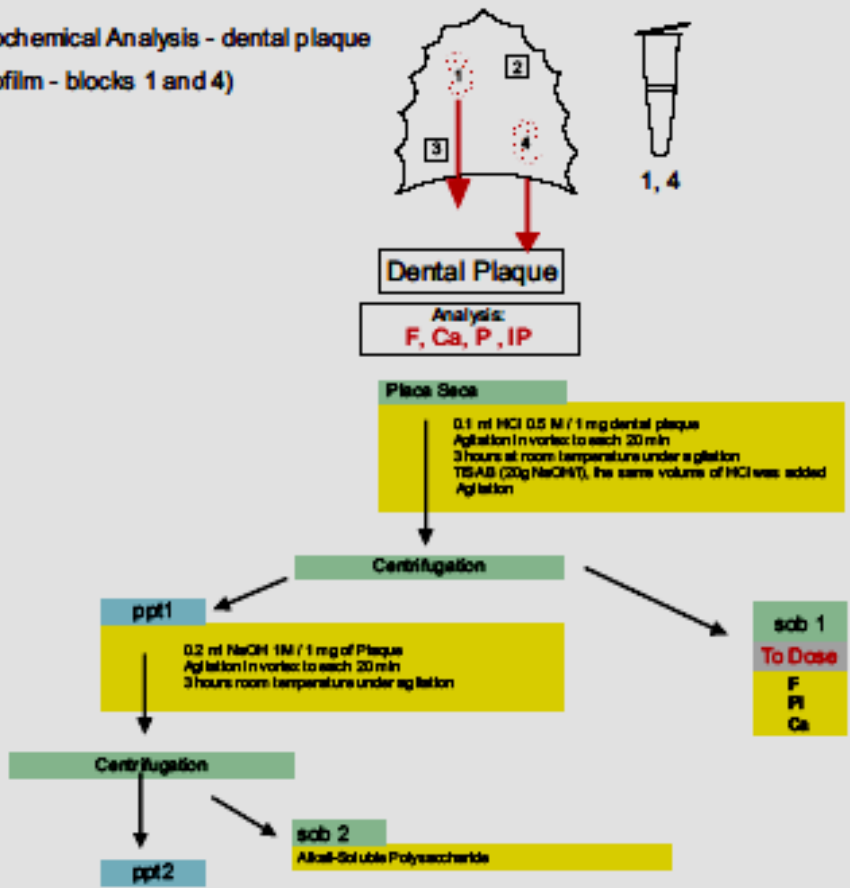


## Treatments

- CHL XF
- F
- CHX
- CO



Biochemical Analysis - dental plaque  
(Biofilm - blocks 1 and 4)



## Tables

**Table 1A:** Biochemical (Mean  $\pm$  SD) of dental biofilm (Sound blocks) according to the treatments, which not differ statistically ( $p < 0.05$ ), when followed by distinct lower case superscript letters, Friedman Test, ( $\beta = 0,95$ ).

ANALYSES	*TREATMENTS			
	T1	T2	T3	T4
Biomass, mg dry weight	2,25 $\pm$ 3,74 <sup>a,b</sup> (n=13)	1,91 $\pm$ 2,31 <sup>a,b</sup> (n=14)	0,63 $\pm$ 0,47 <sup>b</sup> (n=13)	2,28 $\pm$ 2,05 <sup>a</sup> (n=12)
F, $\mu$ g/g	782,75 $\pm$ 560,64 <sup>a</sup> (n=10)	403,47 $\pm$ 284,21 <sup>a,b</sup> (n=13)	366,56 $\pm$ 273,99 <sup>b,c</sup> (n=10)	262,88 $\pm$ 310,29 <sup>c</sup> (n=12)
Ca, $\mu$ g/mg	19,54 $\pm$ 20,36 <sup>a</sup> (n=12)	8,75 $\pm$ 6,81 <sup>a,b</sup> (n=13)	18,70 $\pm$ 18,94 <sup>a</sup> (n=12)	6,70 $\pm$ 9,23 <sup>b</sup> (n=12)
P <sub>i</sub> , $\mu$ g/mg	135.7 $\pm$ 197.1 <sup>a,b</sup> (n=10)	38.0 $\pm$ 77.7 <sup>b</sup> (n=13)	152.6 $\pm$ 158.1 <sup>a</sup> (n=10)	61.6 $\pm$ 119.7 <sup>a,b</sup> (n=10)
Insoluble polysaccharide, $\mu$ g/mg	30,86 $\pm$ 17,86 <sup>a,b</sup> (n=13)	90,22 $\pm$ 68,35 <sup>a</sup> (n=14)	41,13 $\pm$ 17,15 <sup>a,b</sup> (n=13)	32,13 $\pm$ 18,05 <sup>b</sup> (n=12)

**Table 1B:** Biochemical (Mean  $\pm$  SD; Median and qualtiles) of dental biofilm (Sound blocks) according to the treatments, ( $p < 0.05$ ), Friedman Test, ( $\beta = 0, 95$ ).

<b>Analysis</b>				
<b>Biomass, mg dry weight</b>	<b>CHXF</b>	<b>F</b>	<b>CHX</b>	<b>CO</b>
Mean (SD)	<b>2,26 (3,75)</b>	<b>1,91 (2,32)</b>	<b>0,63 (0,48)</b>	<b>2,29 (2,06)</b>
25 <sup>th</sup>	<b>0,23</b>	<b>0,48</b>	<b>0,23</b>	<b>0,56</b>
Median	<b>0,62</b>	<b>0,62</b>	<b>0,62</b>	<b>0,62</b>
75 <sup>th</sup>	<b>1,81</b>	<b>1,81</b>	<b>1,81</b>	<b>1,81</b>
Min	0,07	0,07	0,10	0,41
Máx	12,56	9,23	1,73	6,85
<b>F, <math>\mu\text{g/g}</math></b>				
Mean (SD)	<b>782,75 (560,65)</b>	<b>403,48 (284,22)</b>	<b>366,57 (274,00)</b>	<b>262,88 (310,30)</b>
25 <sup>th</sup>	<b>392,24</b>	<b>151,42</b>	<b>160,21</b>	<b>33,27</b>
Median	<b>0,62</b>	<b>0,62</b>	<b>0,62</b>	<b>0,62</b>
75 <sup>th</sup>	<b>1,81</b>	<b>1,81</b>	<b>1,81</b>	<b>1,81</b>
Min	81,42	49,60	4,33	10,83
Máx	1812,89	1043,33	890,5	1135,57
<b>Ca, <math>\mu\text{g/mg}</math>.</b>				
Mean (SD)	<b>19,55 (20,36)</b>	<b>8,75 (6,82)</b>	<b>18,70 (18,95)</b>	<b>6,70 (9,24)</b>
25 <sup>th</sup>	<b>6,47</b>	<b>2,64</b>	<b>3,61</b>	<b>1,10</b>
Median	<b>0,62</b>	<b>0,62</b>	<b>0,62</b>	<b>0,62</b>
75 <sup>th</sup>	<b>1,81</b>	<b>1,81</b>	<b>1,81</b>	<b>1,81</b>
Min	0,18	4,48	0,44	0,38
Máx	71,01	265,59	63,03	33,94
<b>Pi, <math>\mu\text{g/mg}</math>.</b>				
Mean (SD)	<b>135,67 (197,12)</b>	<b>38,04 (77,68)</b>	<b>152,62 (158,10)</b>	<b>61,62 (119,70)</b>
25 <sup>th</sup>	<b>6,89</b>	<b>6,48</b>	<b>22,96</b>	<b>7,99</b>
Median	<b>0,62</b>	<b>0,62</b>	<b>0,62</b>	<b>0,62</b>
75 <sup>th</sup>	<b>1,81</b>	<b>1,81</b>	<b>1,81</b>	<b>1,81</b>
Min	0,47	-0,63	3,98	4,63
Máx	644,71	21,24	391,36	373,94
<b>IP, <math>\mu\text{g/mg}</math>.</b>				
Mean (SD)	<b>30,87 (17,86)</b>	<b>90,23 (68,36)</b>	<b>41,13 (17,15)</b>	<b>32,83 (18,06)</b>
25 <sup>th</sup>	<b>18,56</b>	<b>32,19</b>	<b>28,99</b>	<b>23,99</b>
Median	<b>0,62</b>	<b>0,62</b>	<b>0,62</b>	<b>0,62</b>
75 <sup>th</sup>	<b>1,81</b>	<b>1,81</b>	<b>1,81</b>	<b>1,81</b>
Min	13,07	11,27	25,62	10,67
Máx	81,25	251,62	79,09	69,94

**Table 2A:** Analysis of sound dental enamel blocks (Mean  $\pm$  SD) according to the treatments, which not differ statistically ( $p < 0.05$ ) when followed by distinct lower case superscript letters, Friedman Test.

%PDS	CHXF	F	CHX	C
	(n=14)	(n=14)	(n=14)	(n=14)
Mean (SD)	-28.53 (18.79) <sup>a</sup>	-29.54 (13.57) <sup>a</sup>	-17.62 (15.93) <sup>a,b</sup>	-14.02 (12.09) <sup>b</sup>
25 <sup>th</sup>	-28.66	-39.23	-24.76	-16.45
Median	0.62	0.62	0.62	0.62
75 <sup>th</sup>	1.81	1.81	1.81	1.81
Min	-74.87	-51.87	-51.23	-6.31
Max	-11.47	-11.66	8.71	-1.53

**Table 2A:** Analysis of sound dental enamel blocks (Mean  $\pm$  SD; median and quartiles) according to the treatments, ( $p < 0.05$ ), Friedman Test.

Treatment	N	Median	Mean	SD	CI 95%	
					LI	LS
C	15	0.62	-14.02	12.09	-21.00	-7.04
CHX	15	0.62	-17.62	15.93	-26.81	-8.42
CHXF	15	0.62	-28.53	18.79	-39.38	-17.68
F	15	0.62	-29.54	13.57	-37.37	-21.70

P = 0.0042

**Table 2B:** Dependent Variable - %RDS - replaced by ranks values.

Group	N	Mean	Treatment
A	14	3.14	C
BA	14	2.57	CHX
B	14	2.29	CHXF
B	14	2.0	F

**Table 3A:** Analysis of demineralized enamel dental (D) (Mean  $\pm$  SD; Median and quartiles) according to the treatments, which not differ statistically ( $p < 0.05$ ) when followed by distinct lower case superscript letters, Friedman Test.

Surface MH change, %	CHXF	F	CHX	C
	(n=15)	(n=15)	(n=15)	(n=14)
Mean (SD)	50.05 (25.01) <sup>a</sup>	52.61 (11.24) <sup>a</sup>	40.82 (16.92) <sup>a</sup>	26.13 (12.65) <sup>b</sup>
25 <sup>th</sup>	26.00	43.00	47.60	18.62
Median	50.70	49.00	31.70	23.43
75 <sup>th</sup>	59.20	60.00	47.60	35.28
Min	15.10	38.50	52.00	6.01
Máx	95.80	77.50	58.00	47.69

**Table 3B:** Analysis of sound demineralized enamel (D) (Mean  $\pm$  SD; median and quartiles) according to the treatments, ( $p < 0.05$ ), Friedman Test.

Treatment	N	Median	Mean	SD	CI 95%	
					LI	LS
C	15	23.43	26.13	12.65	18.82	33.44
CHX	15	31.70	40.82	16.92	31.44	50.19
CHXF	15	50.07	50.05	25.01	36.20	63.90
F	15	49.00	52.60	11.23	46.38	58.82

P = 0.0018

**Table 3B:** Dependent Variable - %RDS - replaced by ranks values

Group	N	Mean	Treatment
A	15	3.06	F
A	15	2.66	CHXF
A	15	2.53	CHX
B	14	1.57	CO

**Table 4:** Analysis of surface microhardness test change (%) in demineralized enamel dental (D) and sound enamel (S) (Mean  $\pm$  SD), according to the treatments.

TREATMENTS	Surface MH change, %	
	(S) blocks	(D) blocks
CLXF	-28.53 $\pm$ 18.79 <sup>a</sup> (n=14)	50.05 $\pm$ 25.01 <sup>a</sup> (n=15)
F	-29.53 $\pm$ 13.56 <sup>a</sup> (n=14)	52.6 $\pm$ 11.23 <sup>a</sup> (n=15)
CLX	-17.61 $\pm$ 15.92 <sup>a,b</sup> (n=14)	40.82 $\pm$ 16.92 <sup>a</sup> (n=15)
CO	-14.029 $\pm$ 12.09 <sup>b</sup> (n=14)	26.13 $\pm$ 2.65 <sup>b</sup> (n=14)



### 3 CONCLUSÃO

Embora a associação de clorexidina a 0,12% ao fluoreto de sódio a 0,05% tenha paralisado lesões ativas de cárie de esmalte nos dois estudos apresentados neste trabalho, esta não foi superior quando o fluoreto foi usado isoladamente. Os estudos apresentados neste trabalho sugerem que a associação de clorexidina a 0,12% ao fluoreto de sódio a 0,05% não demonstrou ser vantajosa no controle e na prevenção da doença cárie.

## REFERÊNCIAS \*

ANUSAVICE, K. Clinical decision-making for coronal caries management in the permanent dentition *J Dent Educ*, v. 65, n.10, p. 1143-1146. 2001

BARROS, V.M.R.; ITO, I.Y.; AZEVEDO, R.V.P.; MORELLO, D.; ROSATELI, P.A. Estudo comparativo da eficiência de três métodos de anti-sepsia intrabucal na redução do número de estreptococos do sulco gengival. *Rev. Odont Univ São Paulo*, v.12, n.3, p.201-206, 1998.

BAELUM, V.; MACHIULSKIENE, V.; NYVAD, B.; RICHARDS, A.; VAETH, M. Application of survival analysis to carious lesion transitions in intervention trials. *Community Dent Oral Epidemiol.*, v.31, n.4, p. 252-60, 2003.

BOTELHO, M.G. Fractional inhibitory concentration index of combinations of antibacterial agents against cariogenic organisms. *J. Dent*, v.28, n.8, p. 565-570, 2000.

BUYUKYILMAZ, T.; OGAARD, B.; DAHM, S. The effect on the tensile bond strength of orthodontic brackets of titanium tetrafluoride (TiF<sub>4</sub>) application after acid etching. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, v.108, n.3, p.256-261, 1995.

CARVALHO, J.; MALTZ, M. Tratamento da Doença Cárie. In: KRIGER, L. (org) ABOPREV *Promoção de Saúde Bucal*. São Paulo: Artes Médicas/ ABOPREV, 1997, p. 92-112.

CAUFIELD, P.W.; DASANAYAKE, A.P.; LI, Y. The antimicrobial approach to caries management. *J Dent Educ.*, v.65, n.10, p.1091-5, 2001.

CHIKTE, U.M.; POCHEE, M.J.; RUDOLPH, M.J.; REINACH, S.G. Evaluation of stannous fluoride and chlorhexidine sprays on plaque and gingivitis in handicapped children. *J Clin Periodontol*, v.18, p.281-286, 1991.

CURY, J.A. Uso do flúor e controle da cárie como doença. In: BARATIERI, L.N. *Odontologia Restauradora – Fundamentos e Possibilidades*. São Paulo: Santos; p. 33-68, 2001.

GUIMARÃES, A.R.D.; MODESTO, A.; VIEIRA, A.R. Formation of alkali-soluble fluoride on the surface of human dental enamel after treatment with fluoridated gels: influence of the pH variation and of the treatment time. *J Clin Ped Dent*, v.24, n.4, p. 303-308, 2000.

HEIMAR, M.V.; CRUZ, R.A. A deposição de fluoreto de cálcio no esmalte dentário humano *in vitro* após tratamento com soluções fluoretadas para

---

\* Referências Bibliográficas da Introdução Geral, baseado na Norma ABNT NBR-6023, 2002.

bochechos. *Rev Bras Odontol*, v.52, n. 1, p. 9-14, 1995.

KATZ S. The use of fluoride and chlorhexidine for the prevention of radiation caries. *J Am Dent Assoc*, v. 104, n. 2, p. 164-70, 1982.

KELTJENS, H.A.; SCHAEKEN, M.J.; VAN DER HOEVEN J.S. Caries control in *overdenture* patients: 18-month evaluation on fluoride and chlorhexidine therapies. *Caries Res*, v. 24, p. 371-375, 1990.

KELTJENS, H.A.; SCHAEKEN, M.J.; VAN DER HOEVEN, J.S. Microbial aspects of preventive regimes in patients with *overdentures*. *J Dent Res*, v. 66, n.10, p. 1579-1582, 1987.

KLOCK, B.; KRASSE, B. Effect of caries-preventive measures in children with high numbers of *S. mutans* and *lactobacilli*. *Scand J Dent Res.*, v.86, n.4, p. 221-30, 1978.

KOCH, G.; MODEER, T.; RASMUSSEN, S.P. Cárie dentária: etiologia, características e epidemiologia In: KOCH, G.; MODEER, T.; RASMUSSEN, S.P. *Odontopediatria: Uma abordagem Clínica* São Paulo: Santos 2ª ed., p. 155-184, 1995.

KOHLER, B.; ANDREEN, I, JONSSON. Influence of caries-preventive measures in mothers on cariogenic bacteria and caries experience in their children. *Arch Oral Biol.*, v.39, n.10, p. 907-11, 1994.

MARSH, PD. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res.*, v. 8, p. 263-71, 1994.

OGAARD, B.; LARSSON, E.; GLANS, R.; HENRKSSON, T.; BIRKHEAD, D. Antimicrobial effect of a chlorhexidine-thymol varnish (Cervitec) in orthodontic patients. A prospective, randomised clinical trial. *J Orofac Orthop*, v. 58, n.4, p. 206-213, 1997.

PETERSSON, L.G.; MAGNUSSON, K.; ANDERSSON, H.; DEIERBORG, G.; TWETMAN, S. Effect of semi-annual applications of a chlorhexidine/fluoride varnish mixture on approximal caries incidence in schoolchildren. A three-year radiographic study. *Eur J Bucal Sci*, v.106, p. 623-627, 1998.

ROLLA, G.; MELSSEN, B. On the mechanism of the plaque inhibition by chlorhexidine *J Dent Res.*, v. 54 (Spec N° B), p. 57-62, 1975.

SANDHAM, H.J.; BROWN, J.; PHILLIPS, H.I.; CHAN, K.H. A preliminary report of long-term elimination of detectable *mutans streptococci* in man. *J Dent Res*. Jan; v. 67, n. 1, p.9-14, 1988.

SCHIE, A.A. Papel dos antimicrobianos. In: FEJERSKOV, O.; KIDD, E. *Cárie dentária: a doença e seu tratamento clínico*. São Paulo: Ed. Santos, p.179-189, 2005.

SCHIOTT, C.R. Effect of chlorhexidine on the microflora of the oral cavity. *J Periodontal Res. Suppl.*, v.12, p.7-10, 1973.

SPETS-HAPPONEN, S.; LUOMA, H.; FORSS, H.; KENTALA, J.; ALALUUSUA, S.; LUOMA, A.R.; GRONROSS, L.; SYVAOJA, S.; TAPANINEN, H.;

HAPPONEN, P. Effects of a chlorhexidine-fluoride-strontium rinsing program on caries, gingivitis and some salivary bacteria among Finnish schoolchildren. *Scand J Dent Res*, v. 99, n.2, p.130-138, 1991.

SPLIETH, C.; STEFFEN, H.; ROSIN, M.; WELK, A. Caries prevention with chlorhexidine-thymol varnish in high risk schoolchildren. *Community Dent Bucal Epidemiol*, v. 28, n.6, p. 419-423, 2000.

TENOVUO, J; HAKKINEN, P.; PAUNIO, P.; EMILSON, C.G. Effects of chlorhexidine-fluoride gel treatments in mothers on the establishment of *mutans streptococci* in primary teeth and the development of dental caries in children. *Caries Res.*, v.26, n. 4, p. 275-80, 1992.

TWETMAN, S. Antimicrobials in future caries control? A review with special reference to chlorhexidine treatment. *Caries Res.* v.38, n. 3, p. 223-9, 2004.

TWETMAN, S.; PETERSSON, L.G. Effect of different chlorhexidine varnish regimens on *mutans streptococci* levels in interdental plaque and saliva. *Caries Res.*, v. 31, n.3, p.189-193, 1997a.

TWETMAN, S.; PETERSSON, L.G. Efficacy of a chlorhexidine and a chlorhexidine-fluoride varnish mixture to decrease interdental levels of *mutans streptococci*. *Caries Res.*, v. 31, p. 361-365, 1997b.

ULLSFOSS BN, OGAARD B, ARENDS J, RUBEN J, ROLLA G, AFSETH J. Effect of a combined chlorhexidine and NaF mouth rinse: an *in vivo* human caries model study. *Scand J Dent Res* 1994; 102(2): 109-12.

VAN LOVEREN C.; BUIJS J. F.; BUIJS M. J.; TEN CATE, J.M. Protection of bovine enamel and dentine by chlorhexidine and fluoride varnishes in a bacterial demineralization model. *Caries Res* 1996; 30(1): 45-51.

VAN'T RIJKOM HM, TRUIN GJ, VAN 'T Hof MA. A meta-analysis of clinical studies on the caries-inhibiting effect of chlorhexidine treatment. *J Dent Res* 1996; 75(2): 790-5.

ZICKERT I, EMILSON CG, KRASSE B. Correlation of level and duration of *Streptococcus mutans* infection with incidence of dental caries. *Infect. Immun.* 1983; 39: 982-985.

## ANEXOS

### Anexo 1

#### Informação e consentimento pós-informação para pesquisa

Somos Ana Rita Duarte Guimarães e Marco Aurélio Peres e estamos desenvolvendo a pesquisa **“Avaliação da remineralização de lesões de cárie em esmalte através do uso de soluções de clorexidina a 0,12% e de flúor a 0,05%”**, com o objetivo de verificar se o uso dessa substância poderá paralisar manchas brancas de cárie, que são o primeiro sinal visível das cáries dentárias. Este estudo é necessário porque a partir dos seus resultados, pessoas com muitas cáries poderão se beneficiar com um novo método auxiliar para controlar essa doença. Seu (sua) filho(a) fará bochechos diariamente com soluções que agem contra os microorganismos da boca que produzem cárie e assim, contribuirá para tratar a doença cárie. Os riscos são mínimos, alteração temporária do paladar e em algumas pessoas podem ocorrer manchamento superficial e temporário dos dentes, que podem ser removidos com profilaxia. Seu (sua) filho(a) foi sorteado para participar desta pesquisa e esperamos que o sr(a) permita que ele(a) participe. Se o sr(a) tiver alguma dúvida em relação ao estudo ou não queira mais que seu filho faça parte do mesmo, pode entrar em contato pelos telefones 3220940/91111768. Se sr(a) estiver de acordo em permitir a participação de seu(sua) filho(a), podemos garantir que as informações ou material coletado fornecidas/o serão confidenciais e utilizados somente neste trabalho.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Pesquisador Responsável  
(Orientador)

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Pesquisador Principal  
(Orientado)

#### Consentimento Pós-Informação

Eu, \_\_\_\_\_, fui esclarecido/a sobre a pesquisa **“Avaliação da remineralização de lesões de cárie em esmalte através do uso de soluções de clorexidina a 0,12% e de flúor a 0,05%”** e concordo que os dados do meu filho sejam utilizados na realização da mesma.

Florianópolis, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2002.

Assinatura: \_\_\_\_\_ RG: \_\_\_\_\_

## Anexo 2

### Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa – Estudo 1

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISAS COM SERES HUMANOS

PARECER CONSUBSTANCIADO

Projeto 154/2002: “Avaliação da eficácia da remineralização de lesões incipientes de cárie de esmalte através do uso conjunto de soluções de clorexidina a 0,12 % e de fluor a 0,05 %: ensaio clínico randomizado”

Pesquisador responsável: Marco Aurélio Peres  
Co-orientador: Ricardo Sousa Vieira  
Pesquisadora principal: Ana Rita Duarte Guimarães

Objetivo geral: avaliar clinicamente a capacidade de substâncias químicas (solução de fluoreto de sódio a 0,05 % e a combinação de solução de clorexidina a 0,12 % e solução de fluoreto de sódio a 0,05 %) de paralisar ou remineralizar lesões cáries em superfície de esmalte após quatorze e vinte e um dias.

Objetivos específicos: comparar a facilidade destas soluções em facilitar a remineralização após quatorze e após 21 dias; verificar se uma solução de clorexidina, isoladamente ou combinada com o fluoreto, seria capaz de remineralizar lesões cáries, através da eliminação do biofilme bacteriano da superfície do esmalte.

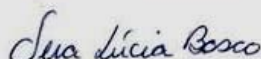
Metodologia: o estudo envolverá estudantes da Escola Estadual de Ensino Básico Padre Anchieta, com idade entre 11 e 15 anos. Crianças que apresentarem lesões de manchas brancas ativas em superfície lisa do esmalte serão incluídas. Serão excluídas: crianças com aparelhos ortodônticos, placas oclusais ou próteses dentais; indivíduos portadores de restaurações estéticas em dentes anteriores; indivíduos que não apresentem lesões de manchas brancas ativas em superfícies lisas do esmalte. O tamanho da amostra foi calculado através do programa Epiinfo (Dean *et al.*, 1994), determinando 159 indivíduos em cada grupo, com a adição de 10 % para compensação de perdas, totalizando 170 indivíduos em cada grupo. Após a formação e alocação dos grupos, ocorrerá o ensaio clínico dos dois grupos, um com fluoreto e outro com fluoreto e clorexidina. Serão observados os pacientes no tempo zero, início do tratamento, após 14 e 21 dias. A área do exame e a rotina serão padronizadas para todas as crianças.

Parecer: o projeto está bem elaborado e é relevante. Tendo sido atendidas todas as pendências, consideramos o projeto aprovado.

Parecer do CEPESH:

- aprovado ad referendum
- reprovado
- com pendência (detalhes pendência)\*
- retirado
- aprovado e encaminhado ao CONEP.

Florianópolis, 24 de setembro de 2002

  
Profa<sup>a</sup> Vera Lúcia Bosco  
Coordenadora

## Anexo 3



## FICHA CLÍNICA ESTUDO 1

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA – UFSC

FICHA CLÍNICA nº .

Nome da criança: Idade: anos e meses completados. Sala:

Solução teste nº .

Data do primeiro exame: / / .

Data do segundo exame: / / .

Data do terceiro exame: / / .

<b>Categoria</b>	<b>Critério clínico</b>
Lesão ativa	O esmalte apresenta uma lesão de mancha branca, branca ou amarelada, opaca, com perda de brilho e rugosa; geralmente coberta por placa dental contornada na margem gengival, que está inflamada.
Lesão inativa	A superfície do esmalte apresenta uma lesão de mancha branca esbranquiçada, brilhante e lisa. Não há placa dental e a lesão parece uma cicatriz, localizada mais distante da margem gengival.

Exame inicial: data do primeiro exame: / / .

<b>SUPERFÍCIES DENTÁRIAS</b>	<b>EXAME VISUAL</b>	<b>SUPERFÍCIES DENTÁRIAS</b>	<b>EXAME VISUAL</b>
17VI		36VI	
17PI		36LI	
16VI		35VI	
16PI		35LI	
15VI		34VI	
15PI		34LI	
14VI		33VI	
14PI		33LI	
13VI		32VI	
13PI		32LI	
12VI		31VI	
12PI		31LI	
11VI		41VI	
11PI		41LI	
21VI		42VI	
21PI		42LI	
22VI		43VI	
22PI		43LI	
23VI		44VI	
23PI		44LI	

24VI		45VI	
24PI		45LI	
25VI		46VI	
25PI		46LI	
26VI		47VI	
26PI		47LI	
27VI			
27PI			
37VI			
37LI			

Exame ao décimo quarto dia - data do segundo exame: / / .

SUPERFÍCIES DENTÁRIAS	EXAME VISUAL	SUPERFÍCIES DENTÁRIAS	EXAME VISUAL
17VI		36VI	
17PI		36LI	
16VI		35VI	
16PI		35LI	
15VI		34VI	
15PI		34LI	
14VI		33VI	
14PI		33LI	
13VI		32VI	
13PI		32LI	
12VI		31VI	
12PI		31LI	
11VI		41VI	
11PI		41LI	
21VI		42VI	
21PI		42LI	
22VI		43VI	
22PI		43LI	
23VI		44VI	
23PI		44LI	
24VI		45VI	
24PI		45LI	
25VI		46VI	
25PI		46LI	
26VI		47VI	
26PI		47LI	
27VI			
27PI			
37VI			
37LI			



## Anexo 4

### INSTRUÇÕES AOS RESPONSÁVEIS - ESTUDO 1

#### Instruções gerais:

1. Seu filho foi selecionado para participar de um programa de prevenção e tratamento das manchas brancas de cárie que são as primeiras situações que aparecem nos dentes, quando a doença cárie está avançando nos dentes. Se for feito esse tipo de tratamento nessa fase da doença, ainda é possível controlá-la e seu filho poderá não ter cavidades nesses locais.

2. Esse tratamento consiste de bochechos diários (de 1 minuto por dia) com soluções a base de flúor e flúor com clorexidina realizados por 14 dias consecutivos realizados por alunos de Odontologia no pátio da escola Pe. Anchieta.

3. Porém, para que esse tratamento tenha sucesso, é necessário que seu filho compareça todos os dias em que ele estiver marcado, ou seja, não falte a escola nesses 14 dias em que ele estará marcado para comparecer e fazer os bochechos. Se assim não o fizer, ele será automaticamente excluído do programa.

4. Se ao final do programa, seu filho estiver com manchas, faremos profilaxia profissional em consultório odontológico e ele receberá aplicação tópica de flúor. Também ao final do estudo, ele receberá uma escova dental.

Em caso de dúvidas, não hesite em nos procurar na escola ou telefones 3220940/91111768.

Dra. Ana Rita Duarte Guimarães – Res: 3220940 e celular: 9111-1768

Prof. Ricardo Vieira de Sousa – Disciplina Odontopediatria UFSC

O ideal é que ele demore uns 30 minutos pelo menos antes e depois dos bochechos para se alimentar. Se precisar faltar por motivo de doença, por favor, entre em contato conosco.

**POR FAVOR, SIGA ESTAS INSTRUÇÕES EXATAMENTE, O SUCESSO DESTE ESTUDO DEPENDE DE VOCÊ!**

**AGRADECEMOS A SUA VALIOSA CONTRIBUIÇÃO**

## Anexo 5

### FICHA PARA CALIBRAÇÃO – ESTUDO 1

Examinador:

#### FICHA PARA CALIBRAÇÃO

##### Ficha clínica

##### Identificação:

Nome: \_\_\_\_\_

Data de Nascimento: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_

Gênero: \_\_\_\_\_ (M=1, F=2)

Endereço: \_\_\_\_\_

Telefone: \_\_\_\_\_

Nome do pai: \_\_\_\_\_

Nome da mãe: \_\_\_\_\_

Telefone de trabalho do pai/mãe: \_\_\_\_\_

Condição Dental: Arcada Superior

MBA  
MBI

superfície	18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28
vestibular																
palatal																

##### Arcada Inferior

superfície	48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37	38
vestibular																
lingual																

Data do primeiro exame odontológico: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_



## Anexo 7

### ESCLARECIMENTOS PARA OS ACADÊMICOS – ESTUDO 1

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

ESCLARECIMENTOS PARA OS ACADÊMICOS



“Avaliação da remineralização de lesões de cárie em esmalte através do uso de soluções de clorexidina a 0,12% e de flúor a 0,05%”

Será muito importante ter uma agenda para controle dos pacientes atendidos (assinalar cada dia que vieram ao estudo na ficha de controle e marcar o seu retorno) no ensaio clínico e no seu estudo, conhecer a rotina de atividades da escola (horários de chegada, do lanche e da saída, número de crianças por sala, calendário escolar, período de provas e férias).

Lembrar sempre de pedir a assinatura do responsável. Codificar os frascos das soluções (uniformemente) de forma que vocês conheçam as soluções que estão sendo testadas em cada criança e isso seja anotado na ficha de controle, e não permita aos estudantes conhecerem quais soluções irão usar.

É muito importante que todos conheçam a escala de atividades de todos os envolvidos e suas funções no ensaio clínico para que na impossibilidade do comparecimento de qualquer acadêmico, outro possa prontamente assumir suas funções. As funções relativas ao estudo são: agendamento dos estudantes, controle de frequência, anotar os dados coletados, preenchimento correto das fichas individuais, administração dos bochechos, escovação supervisionada, apoio ao estudo (troca do instrumental para os exames, acondicionar o material não estéril e expurgo), organização do estudo (chamada dos alunos nas salas e posicionamento dos alunos nas cadeiras para a coleta de dados). É importante não faltar à escala de atividades propostas para cada um dos envolvidos e o correto preenchimento das fichas.

É louvável o envolvimento em atividades de pesquisa de vocês, certamente isso, posteriormente, os distinguirá dentro da atividade profissional.

Bom trabalho para nós todos

Obrigada Ana Rita 3220940/91111768.

## Anexo 8

### Ficha Clínica – Estudo 2

#### FICHA CLÍNICA DOS VOLUNTÁRIOS PARA CONTROLE DO EXPERIMENTO

2. UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANATA CATARINA  
PRONTUÁRIO CLÍNICO -Nº \_\_\_\_\_

**1.** Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

#### 1. DADOS DO VOLUNTÁRIO

Nome: \_\_\_\_\_

Data de Nascimento \_\_\_\_\_ Sexo \_\_\_\_\_

Endereço \_\_\_\_\_

Bairro \_\_\_\_\_ Cidade \_\_\_\_\_ Fone \_\_\_\_\_

#### 2. HISTÓRIA MÉDICO-ODONTOLÓGICA

O voluntário apresenta alguma história de: Febre Reumática, Hemorragia, Convulsão, Diabete, Injúria Cerebral, Infecção Respiratória, Desmaios, Doenças do Coração, Doença dos Rins, Anemia, Neuropatias, Asma, Alergia a Medicamentos, Doenças da infância?

Está em tratamento médico? ( ) Sim ( ) Não

Em caso afirmativo, qual? \_\_\_\_\_

Medicamentos atuais: \_\_\_\_\_

Nome do médico e telefone: \_\_\_\_\_

Já teve hospitalizado? \_\_\_\_\_ Data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Motivo: \_\_\_\_\_

Ronca quando dorme? N/ S Respira pela boca? N/ S Resfriado freqüente? \_\_\_

Têm freqüentemente: nariz entupido? N ( ) S ( )

**Antecedentes familiares (doenças):** \_\_\_\_\_

#### 3. AVALIAÇÃO DOS INDICADORES DE RISCO À CÁRIE

DATA	___/___/___
Escovação (nº vezes/dia)	
Escova antes de dormir?	
Fluxo salivar estimulado	
Uso de outros recursos, quais?	
Usa pasta de dente com flúor?	
Uso sistêmico após o nascimento/ até que idade	
Uso atual - sistêmico, tópico, profissional	

<b>CLASSIFICAÇÃO DE RISCO</b> – Alto risco, Baixo risco	
--	--

**4. EXAME LOCO-REGIONAL** (pescoço e cadeias ganglionares, lábios e freios labiais, mucosa labial e bucal, gengivas, língua e freio lingual, assoalho bucal, palato duro e mole, amígdalas e faringe)

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

#### 5. EXAME DA FACE

- lábios : *Com vedamento / Sem vedamento*

Padrão respiratório: *Nasal / Buco-nasal*

**Exame intra-oral:**

Adenóides: *Normais / Operadas / Hipertrofiadas*

Amígdalas: *Normais / Operadas / Hipertrofiadas*

Hábitos bucais deletérios: *Inexistente / dedo / objetos /onicofagia*

*outros:* \_\_\_\_\_

#### Análise Funcional

*Bruxismo:* ( ) Não ( ) Sim *Período:* \_\_\_\_\_

*- Interferências oclusais:* \_\_\_\_\_

*Fala:* *Normal / Defeituosa*

*Outras considerações:* \_\_\_\_\_

#### 6. CONDIÇÃO PERIODONTAL

Gengivite / Periodontite *Localizada / Generalizada*

Dentes: \_\_\_\_\_

#### ÍNDICE GENGIVAL – IG (LÓE, SILNESS)

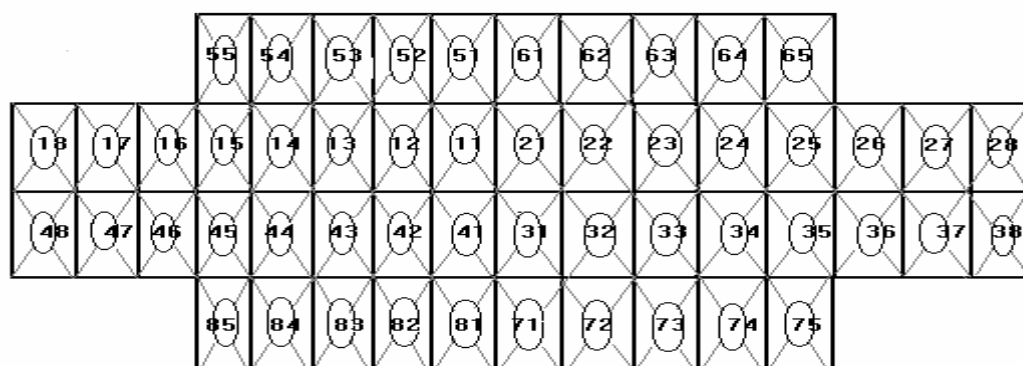
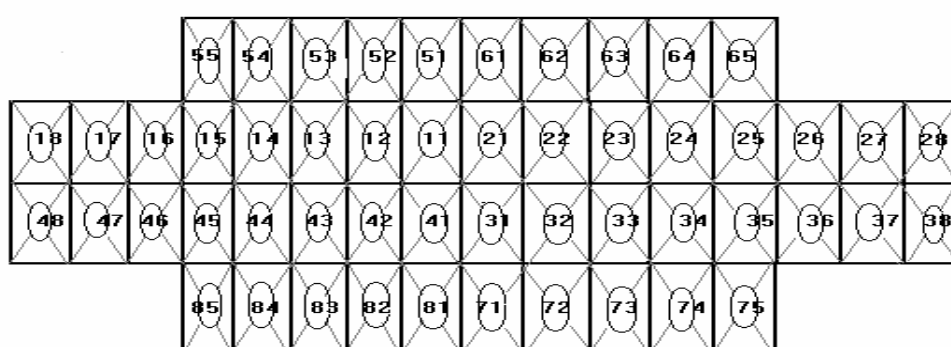
Contagem em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ IG = \_\_\_\_\_

Índice gengival =  $\frac{\text{soma dos valores}}{\text{No. De dentes}}$

#### **Critérios – índice gengival**

(0) – Ausência de inflamação = gengiva uniformemente rosada; (1) Inflamação leve = modificação pequena na cor e textura gengivais; (2) Inflamação moderada = gengiva moderadamente avermelhada, vítrea, edemaciada e hipertrófica, com sangramento sob estímulo; (3) inflamação severa = gengiva nitidamente avermelhada, hipertrófica, com tendência ao sangramento espontânea e presença de ulceração.

#### 7. PRESENÇA DE PLACA VISÍVEL



### Índice de Placa Visível

0- ausência de placa; 1- placa no terço cervical; 2- placa acima do terço cervical

## ANEXO 9

### INSTRUÇÕES AOS VOLUNTÁRIOS - ESTUDO 2

#### Instruções gerais:

1. Use seu dispositivo intrabucal (DIB) durante todo o tempo (24 horas ao dia, exceto para higiene bucal e procedimentos do experimento), até para dormir. Você também deve removê-lo por um breve período durante as refeições ou lanches, inclusive sucos, chás, balas, até as sem açúcar. Nesses momentos, seu dispositivo intrabucal deve permanecer envolto em papel absorvente fino embebido em água destilada e deionizada dentro do seu porta-aparelho.
2. Não use quaisquer outros produtos (agentes clareadores, soluções de bochecho, dentífrício, escovas dentais) que não os que foram fornecidos para você pelo pesquisador, durante todo o período experimental, até nos intervalos entre as fases e também mesmo 10 dias antes de ter começado a primeira fase do experimento.
3. De forma alguma escove ou toque nos blocos de esmalte do seu DIB em qualquer momento.
4. Retorne de 2 em 2 dias nos horários combinados para pegar suas soluções e avise caso estejam em vias de terminar.

#### Rotina diária:

1. Você deverá pingar uma gota com o conta-gotas fornecido da solução de sacarose a 20% somente nos blocos de esmalte que estiverem circundados com a resina acrílica vermelha por 8 vezes ao dia, durante os 14 dias de cada fase do experimento, de acordo com a figura.



2. Os horários em que devem ser realizados os gotejamentos com a sacarose são: 08h00min, 09h30min, 11h00min, 12h30min, 14h00min, 15h30min, 17h00min, 18h30min. Eles estão afixados no seu porta dispositivos.
3. Despejar 10ml da solução testada codificada usando o copinho graduado (frasco-medida) no porta-dispositivo e imergir o DIB por 1 minuto, enquanto você bochecha com a mesma solução, também por 1 minuto. Esse



procedimento deverá ser realizado todos os dias das fases do experimento, uma vez ao dia, antes de dormir, 1 hora após ter escovado os dentes com o dentifrício fornecido na pesquisa.

4. Durante todo o período do experimento e uma semana antes de cada etapa, **não utilizar nenhum produto que contenha flúor**, como por exemplo, bochechos fluoretados ou anti-sépticos bucais (Anapyon, Cepacol), exceto os que estiverem sendo testados no experimento e tiverem sido fornecidos pelo pesquisador. Assim como não usar pastilhas para garganta a base de antibióticos e medicamentos que possam conter antibióticos e/ou substâncias que reduzem o fluxo salivar. Caso haja necessidade, por motivo de doença ou indicação médica, entrar em contato **IMEDIATAMENTE** com os pesquisadores.
5. Qualquer anormalidade, dúvida ou problema, favor entrar em contato com os pesquisadores;

**Dra. Ana Rita Duarte Guimarães – Res: 3220940 e celular: 9111-1768**  
**Prof. Ricardo Vieira de Sousa – Disciplina Odontopediatria UFSC**

**POR FAVOR, SIGA ESTAS INSTRUÇÕES EXATAMENTE, O SUCESSO DESTES  
ESTUDO DEPENDE DE VOCÊ!**

**AGRADECEMOS A SUA VALIOSA CONTRIBUIÇÃO**

## Anexo 10

### DIÁRIO DE DIETA DE CINCO DIAS – ESTUDO 2

Por favor, registre tudo o que você comeu e bebeu durante todo o dia. Registre a hora do dia e a quantidade do item em particular. Por favor, agende seu diário para que inclua um final de semana.

Todos os itens alimentares a serem registrados devem incluir lanches, doces, drinks, chicletes e balas, bem como suas refeições principais. Tenha certeza que registrou o que ingeriu enquanto assistiu televisão, passeando, ao cinema etc. Isto inclui pastilhas de hortelãs, pastilhas de garganta etc.

Exemplo: 08h00min 1 pedaço de pão com geléia e 1 copo de leite com açúcar  
09h30min café com uma colher de açúcar

DIA	DATA	ITENS INGERIDOS
1		
2		
3		
4		
5		

Muito obrigado pela sua preciosa contribuição  
Ana Rita – 3220940/91111768

**Anexo 11****FREQÜÊNCIA DE EXPOSIÇÃO AO AÇÚCAR RELADA PELOS VOLUNTÁRIOS NO  
DIÁRIO DE DIETA DE 5 DIAS – ESTUDO 2**

<b>VOLUNTÁRIO</b>	<b>DIA 1</b>	<b>DIA 2</b>	<b>DIA 3</b>	<b>DIA 4</b>	<b>DIA 5</b>
1.					
2.					
3.					
4.					
5.					
6.					
7.					
8.					
9.					
10.					
11.					
12.					
13.					
14.					
15.					
16.					
17.					
18.					
19.					
20.					

Escore: 1-2 exposições/dia= baixa (B)

3-4 exposições/dia = média (M)

> 4 exposições/dia = alta (A)

## Anexo 12

### ESCLARECIMENTO AOS VOLUNTÁRIOS SOBRE O EXPERIMENTO 2 A QUE SERÃO SUBMETIDOS

#### 1. RESUMO

O objetivo deste trabalho será avaliar *in situ* a capacidade de diferentes substâncias químicas em inibir a desmineralização de esmalte bovino, submetidos a uma situação de alto desafio cariogênico e simultaneamente potencializar a remineralização. Dispositivos intra-orais contendo 2 blocos dentais bovinos, previamente, desmineralizados *in vitro* pelo método de FEATHERSTONE et al. (1983), modificado por SERRA & CURY (1992) e 2 blocos hígidos. Serão utilizados por 12 voluntários durante 4 períodos de 14 dias. Para simular uma situação de alto desafio cariogênico, será colocada uma gota de sacarose a 20%, oito vezes ao dia, sobre cada bloco dental hígido fixado ao aparelho removível, sem, entretanto, interromper os procedimentos de higiene oral dos participantes. A perda (desmineralização) ou ganho (remineralização) de mineral dos blocos dentais imersos nas diferentes soluções será quantificada através da análise de microdureza do esmalte dental.

#### 2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Os experimentos *in vivo* que se propõem a avaliar a ação remineralizadora de substâncias químicas apresentam controle científico limitado, com grande quantidade de variáveis, ao passo que, os estudos *in vitro* não são capazes de reproduzir as condições da cavidade oral. Os estudos *in situ* além de simularem uma situação clínica e possibilitarem, posteriormente, a verificação do grau de remineralização ou não do esmalte inicialmente desmineralizado oferecem riscos mínimos aos participantes do experimento, o que demonstra um importante fator ético a ser considerado. Por esses motivos, as pesquisas *in situ* vêm sendo cada vez mais utilizadas na Cariologia (BENELLI et al., 1993; ZERO, 1995; MORAIS et al., 2000).

#### 3. DESCONFORTOS, RISCOS POSSÍVEIS E BENEFÍCIOS ESPERADOS

Os voluntários selecionados utilizarão os dispositivos palatinos intra-orais por duas semanas. Os dispositivos intra-orais serão polidos, a fim de evitar o acúmulo de placa bacteriana e inflamação gengival. Possíveis interferências oclusais serão corrigidas. Os voluntários receberão um kit contendo um tubo de dentifrício com 1100ppmF e uma escova dental e serão instruídos a utilizá-los por uma semana antes da instalação dos dispositivos intra-orais. Para realização da fase *in situ* do experimento, cada voluntário receberá dentifrício, escova e fio dental, aparelho intra-oral palatino e um recipiente plástico, dois vidros de sacarose a 20% com conta-gotas, solução teste, gaze e instruções de procedimentos para a execução da pesquisa. No presente estudo, não haverá suspensão do controle de placa por parte dos voluntários, fator etiológico da cárie dental.

Os blocos dentais serão armazenados em formol a 2% antes de serem fixados nos dispositivos intra-orais, permitindo a esterilização dos mesmos, e, conseqüentemente, evitando a ocorrência de infecção cruzada ou qualquer tipo de contaminação. Os voluntários retornarão semanalmente, em data previamente estabelecida, para procedimentos de acompanhamento e avaliação. Após o experimento, todos os voluntários serão reavaliados quanto ao risco e atividade de cárie, e receberão aplicação(ões) tópica(s) profissional(is) de flúor, de acordo com a necessidade individual de cada participante.

A solução de sacarose a 20%, gotejada pelos voluntários, oito vezes ao dia, sobre os blocos dentais hígidos, simula uma situação de alto desafio cariogênico, e terá seu excesso removido após cinco minutos. Esse procedimento tem como objetivo minimizar o contato dos voluntários com a sacarose, reduzindo significativamente o risco do aparecimento de lesões de cárie, sendo uma preocupação ética dos pesquisadores com os voluntários. Já que outros estudos baseavam-se na ingestão direta ou bochechos de soluções de sacarose<sup>2,3</sup>.

A cárie é uma doença multifatorial e de desenvolvimento localizado<sup>4</sup>, sendo o risco do paciente o fator de maior importância no seu desenvolvimento<sup>5</sup>, por essa razão, os pesquisadores do presente estudo têm como critério de exclusão da amostra, voluntários de alto risco à cárie. Além disso, há uma grande preocupação em manter o controle de placa dos voluntários. Apenas os blocos dentais hígidos serão submetidos ao alto desafio cariogênico, sem comprometer o esmalte dental dos participantes, em acordo com diversos trabalhos *in situ* que também não oferecem risco aos voluntários<sup>6,7</sup>. Os fragmentos dentais serão expostos diariamente, pelo período de um minuto, às soluções teste, e poderão até não sofrer desmineralização. E, de qualquer forma, no presente estudo, todos os participantes serão avaliados semanalmente e, ao final do experimento, receberão aplicações tópicas de flúor, de acordo com a necessidade de cada integrante da pesquisa.

Os dados obtidos a partir dos participantes não serão utilizados para outros fins que não os previstos no protocolo e/ou termo de consentimento previamente assinados. A identidade dos participantes será resguardada, como também será assegurada a privacidade dos mesmos nos procedimentos de documentação fotográfica.

Apesar dos participantes não obterem benefício direto com o experimento, as informações geradas com os resultados da pesquisa, assim como a necessidade de se estabelecer uma metodologia de menor risco aos voluntários, mesmo reproduzindo as condições da cavidade oral com fidedignidade, é de suma importância, não só para o estudo da Cariologia como também de toda a Odontologia.

<sup>2</sup> Von der FEHR, F.H., LÖE, H., THEILADE, E. Experimental caries in man Caries Res., v. 4, p. 131-148, 1970.

<sup>3</sup> GUSTAFSON, B.E. et al. The Vipeholm dental caries study. Acta Odontolol. Scand, v.11, p. 232-64, 1954.

<sup>4</sup> Thylstrup, A.(1993) comunicação pessoal

<sup>5</sup> BRATTHALL, D. Selection for prevention of high caries risk groups. J.Dent. Res., v.59, n.2, p. 2178-82, 1980.

<sup>6</sup> DOMATO, F.A., STEPHEN, K.W. Demonstration of fluoride dose response with an *in situ* single-section dental caries model. Caries Res., v. 28, p. 277-83, 1994.

<sup>7</sup> KOULOURIDES, T. et al. An intra-oral model used for studies of fluoride incorporation in enamel. J.oral Pathol, v.3, p. 185-96, 1974.

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Por este instrumento particular declaro, para fins éticos e legais, que eu (nome)....., (profissão)....., portador(a) do RG....., C.I.C....., residente e domiciliado(a) à Rua....., cidade....., Estado....., concordo, em absoluta consciência, com os procedimentos a que vou me submeter para a realização da fase experimental da Tese de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia – área de concentração em Odontopediatria, intitulada “Avaliação *in situ* da remineralização de lesões de cárie em esmalte bovino através do uso de soluções de clorexidina a 0,12% e de flúor a 0,05%”, tendo como responsáveis a Cirurgiã-Dentista Ana Rita Duarte Guimarães e o Prof. Dr. Ricardo de Sousa Vieira, nos termos abaixo relacionados:

- 1- Esclareço que recebi todas as informações sobre minha participação neste experimento, possuindo plena liberdade de me abster em participar da referida pesquisa a qualquer momento, sem prejuízo financeiro, hierárquico ou de qualquer natureza;
- 2- Esclareço também que fui amplamente informado, sobre os possíveis benefícios e riscos aos quais estou me submetendo durante este experimento, tomando conhecimento de que o meu consentimento não exime responsabilidade do profissional que está executando a pesquisa.
- 3- Todas essas normas estão de acordo com o Código de Ética Profissional Odontológico, segundo a Resolução do Conselho Federal de Odontologia 179/93, com a Declaração de Helsinque II e com a Resolução nº. 196 de 10 de outubro de 1996 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde.

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

..... de ..... de .....


.....  
Assinatura do Voluntário

.....  
Assinatura do Pesquisador

.....  
Assinatura do profissional que realizou o esclarecimento

## Anexo 13

## Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa – Estudo 2



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CAMPUS UNIVERSITÁRIO - TRINDADE CEP: 88040-900 - FLORIANÓPOLIS - SC  
TELEFONE (048) 234-1755 - FAX (048) 234-4069

**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS**

**Parecer Consubstanciado**

**Projeto n:** 035/2003

**Título do Projeto:** Avaliação *in situ* do uso conjunto de soluções de clorexidina a 0,12% e de flúor a 0,05% nas lesões incipientes de cárie em esmalte bovino.

**Pesquisador Responsável:** Prof. Ricardo De Sousa Vieira, Dr, Departamento de Estomatologia, CCS, UFSC.

**Instituição onde será realizado o estudo:** Clínica de Pós-graduação da Odontologia e Laboratório de Materiais Dentários da Odontologia da UFSC.

**Data de Apresentação ao CEPISH:** 19/03/2003

**Objetivos**

**Geral:**


Avaliar *in situ* a capacidade de substâncias químicas – solução de clorexidina a 0,12%, solução de fluoreto de sódio a 0,05% e a combinação da solução de clorexidina a 0,12% e solução de fluoreto de sódio a 0,05% - em relação ao ganho ou perda mineral em esmalte bovino, após quatorze dias, submetido a uma situação de alto desafio cariogênico.

**Específicos:**

- Comparar a capacidade dessas soluções em facilitar a remineralização após quatorze dias;
- Comparar a capacidade dessas soluções em dificultar a desmineralização após quatorze dias.

**Sumário:**

Esta pesquisa, que faz parte da Tese de Doutorado da Odontóloga Ana Rita Duarte Guimarães no Curso de Pós-Graduação em Odontologia da UFSC, se constitui num Estudo *in situ* de longa duração, tipo cruzado, com 4 fases de 14 dias sujeito a estudo piloto. Serão usados incisivos bovinos com ausência de hipoplasias, manchas e trincas. Tais dentes serão fixados com cera pegajosa em placas de acrílico pré-fabricadas de forma a se obter os blocos de esmalte bovino. No total serão 192 blocos de esmalte bovino, distribuídos em 12 aparelhos intra-buciais a serem instalados em 12 voluntários (recrutados entre os alunos de odontologia da UFSC que atendam os critérios de inclusão e aceitem participar voluntariamente da pesquisa) perfazendo um total de 4 blocos de esmalte bovino por indivíduo, por fase de estudo. Dessa forma os 192 blocos serão divididos aleatoriamente nos grupos das soluções



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CAMPUS UNIVERSITÁRIO - TRINDADE CEP: 88040-900 - FLORIANÓPOLIS - SC  
TELEFONE (048) 234-1755 - FAX (048) 234-4069

pesquisadas. Assim, cada um dos 12 voluntários utilizará 4 blocos de esmalte, simultaneamente, sendo submetidos às diferentes soluções químicas. O desfecho a ser investigado será a análise do esmalte, em que será observada a perda e o ganho mineral, percentagem de perda e recuperação da dureza de superfície e perda mineral da lesão de cárie através de ensaio de microdureza. O projeto de pesquisa encontra-se bem instruído, assim como todas as Declarações e o Orçamento são apresentados. O projeto foi submetido ao CNPq para fins de financiamento e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido está apropriadamente redigido.

**Comentários frente à Resolução CNS 196/96 e complementares:**

**Parecer do CEPISH:**

aprovado  
 reprovado  
 com pendência (detalhes pendência)\*  
 retirado  
 aprovado e encaminhado ao CONEP

**JUSTIFICATIVA:**

Apresentadas acima, no Sumário do Projeto.

Informamos que o parecer dos relatores foi aprovado por unanimidade, em reunião deste comitê na data 28 de abril de 03

*Vera Lúcia Bosco*  
Vera Lúcia Bosco  
Coordenadora

Fonte: CONEP/ANVS - Resoluções 196/96 e 251/97 do CNS.

Florianópolis, 28 de abril de 2003

## Anexo 14

### Outros trabalhos publicados ou em publicação durante o período de Doutorado:

**Guimarães, A.RD.**; Ramos-Jorge, M.L.; Bosco, VL.; Vieira, RS. Conhecimento dos docentes do Departamento de Estomatologia da UFSC em relação ao seu estado de imunização. **Arquivos em Odontologia Faculdade de Odontologia da UFMG**; elo Horizonte, v. 38, n. 4, p. 257-267, 2002.

**Guimarães, A.RD.**; Peres, MA; Vieira RS; Ferreira, RM; Ramos-Jorge, ML, Apolinario, S; Debom, A. Self-perception of side effects by adolescents in a chlorhexidine-fluoride-based preventive oral health program. **J Applied Oral Sci** (no prelo)

Ramos-Jorge, ML; **Guimarães, ARD**; Peres MA, Bosco, VL. Incidence of traumatic dental injuries and associated risk factors among adolescents: a longitudinal study nested in a case-control study. **Community Dental Oral Epidemiol.** (no prelo)

**Guimarães ARD**, Viera RS; Minamisako MC; Modesto A; Cury J. Validity of a laser fluorescence system in evaluating remineralization of *in situ* incipient caries lesions. **Caries Res** (Submitted)

**Guimarães ARD**; Ramos-Jorge ML; Cardoso M; Cordeiro MM; Vieira RS; Bosco VL. Relationship between the Need for Dental Treatment due to Caries and Anxiety in Adolescents. In: 52<sup>nd</sup>. Annual ORCA Congress, 2005, Indianapolis. **Caries Research** - Abstracts of the 52<sup>nd</sup>. Annual ORCA Congress. Basel : Karger, 2005, v. 39, p. 297-297.

**Guimarães, ARD**; Vieira, RS; Minamisako MC; Modesto A; Cury J. DIAGNOdent vs. SMH in non-cavitated caries lesions monitoring. In: 83<sup>rd</sup> General Session & Exhibition of the IADR, 2005, Baltimore. **Journal of Dental Research**, Estados Unidos, v. 82, n. Spec. Iss A, p. abst-0142, 2005.

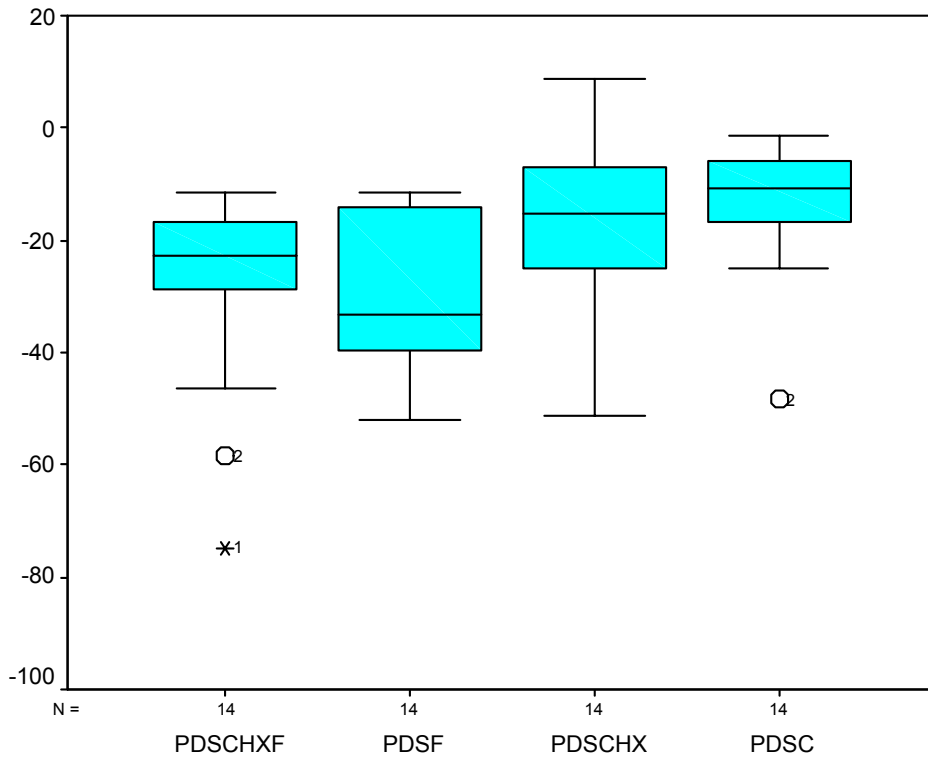
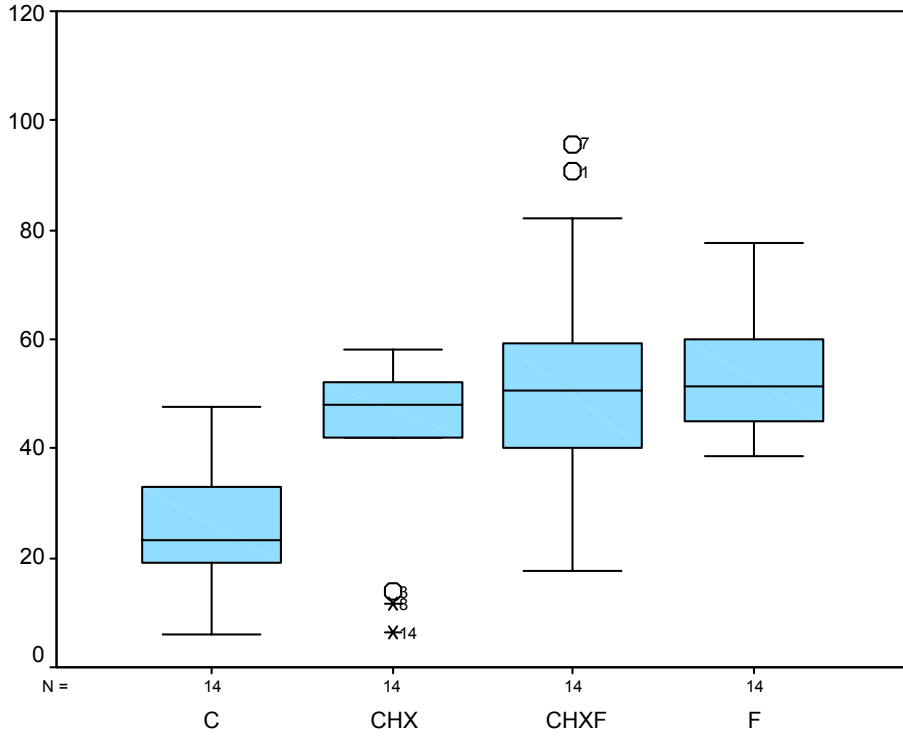
**Guimarães, ARD**; Peres MA; Vieira RS; Ramos-Jorge ML; Modesto A. Efficacy of Two Mouth Rinsing Solutions on Arresting Non-dental Cavitated Decay Lesions: A Randomised Clinical Trial. In: 51<sup>th</sup> Meeting European Organisation for Caries Research, 2004, Marburg. **Caries Research** - Abstracts 51<sup>st</sup> ORCA Congress DOI: 10.1159/000078182. Basel: Karger Publishers, 2004, v. 38, p. 358.

D'agostino E.; Souza Y.; Scavuzzi AIF; **Guimarães ARD**; Costa HS. Contribuição ao estudo da cárie dental e da doença periodontal durante a gestação. In: VI Congresso Brasileiro de Epidemiologia, 2004, Recife. PO 1081 **Livro de Resumo. v.I.. Rio de Janeiro: Abrasco**, 2004.

Prêmios e títulos: 2004 Primeiro Lugar no Fórum Científico de Odontopediatria, apresentado durante XXXV Encontro Científico Anual do Grupo de Professores de Ortodontia e Odontopediatria, Grupo de Professores de Ortodontia e Odontopediatria. Fortaleza: nov. 2004.

# APÊNDICES

APENDICE 1- Gráficos 1 e 2: Box-Plot dos blocos des (%RDS) e hígidos (%PDS)





**APENDICE 2**  
**MAPA DOS VOLUNTÁRIOS**

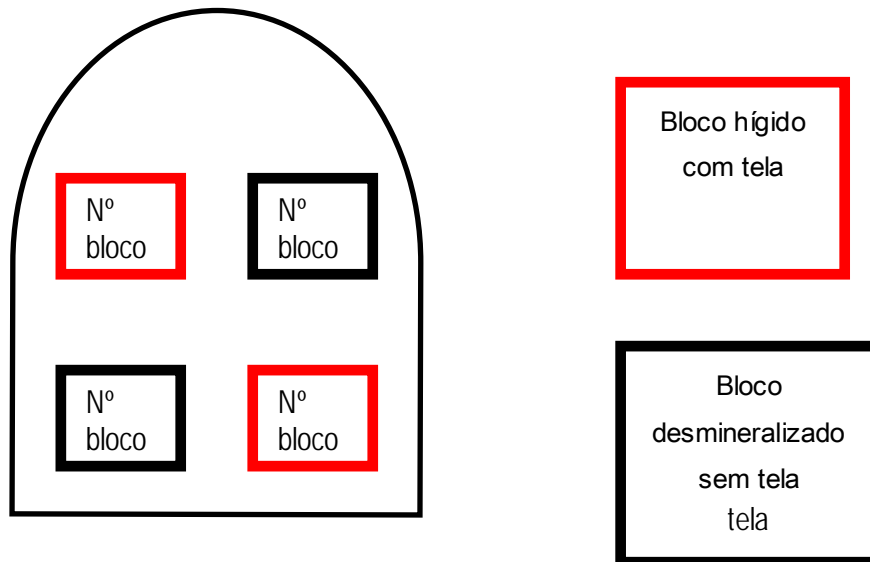
**Nome do voluntário:** \_\_\_\_\_

**Grupo:**     A B C D

**Fase do experimento:**  1<sup>a</sup>.  2<sup>a</sup>.  3<sup>a</sup>.  4<sup>a</sup>.

**Horário da vinda:** \_\_\_\_\_

**Procedimento:** \_\_\_\_\_



### APENDICE 3

#### Freqüência de ingestão sacarose por voluntário/fase

voluntário	volunt	fase1	fase2	fase3	fase4	media	dp
1 Carol B.	1	1,8	5	3	4	3,45	1,37
2 Simone	2	2	5	4	2	3,25	1,50
3 Renan	3	3,4	4	5	4	4,1	0,66
4 Fabi	4	5	2	7	6	5	2,16
5 Ismael	5	2,2	3	3,4	3,2	2,95	0,53
6 Everlin	6	7	3	4	1	3,75	2,50
7 Rodrigo	7	3	3	3	3	3	0,00
8 Roberta	8	2,4	3,8	4,2	2,6	3,25	0,89
9 Carol G.	9	6,2	5,2	5,2	4,4	5,25	0,74
11 Rubi	11	4,8	3,6	4	4	4,1	0,50
12 A. R.	12	1,8	2,4	1,8	2,4	2,1	0,35
13 Mari	13	5	3,6	2,6	2,4	3,4	1,19
14 Ju S.	14	3	4	3	4	3,5	0,58
15 Greice	15	2	3	4	2	2,75	0,96
16 Letícia	16	3	3	3	3	3	0,00
	<b>media</b>	<b>3,51</b>	<b>3,57</b>	<b>3,81</b>	<b>3,20</b>	<b>3,52</b>	<b>0,93</b>
	<b>dp</b>	<b>1,68</b>	<b>0,95</b>	<b>1,26</b>	<b>1,23</b>	<b>0,83</b>	<b>0,72</b>

NAO EXISTE O VOLUNTARIO NUMERO 10 PQ ELE NUNCA PARTICIPOU, FOI EXCLUIDO ANTES EXPERIMENTO.

#### ESCORE

1 a 2=baixa

3 a 4=media

>4= alta

## The MEANS Procedure

Analysis Variable : rds RDS

Tratamento	N Obs	Mean	Std Dev	Upper 95% CL for Mean	Lower 95% CL for Mean
C	15	26.1351928	12.6552528	33.4421183	18.8282674
CHX	15	40.8200000	16.9234073	50.1918706	31.4481294
CHXF	15	50.0533333	25.0127929	63.9049564	36.2017103
F	15	52.6066667	11.2368314	58.8294165	46.3839168

Teste de Friedman

Class Level Information

Class	Levels	Values
trat	4	C CHX CHXF F

Number of observations 60

NOTE: Due to missing values, only 59 observations can be used in this analysis.

Teste de Friedman

Dependent Variable: rds Values of rds Were Replaced by Ranks

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
trat	3	17.28329298	5.76109766	5.72	0.0018
Error	55	55.42857143	1.00779221		
Corrected Total	58	72.71186441			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	rds Mean
0.237696	40.56810	1.003889	2.474576

Teste de Friedman

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	55
Error Mean Square	1.007792
Critical Value of t	2.00404
Least Significant Difference	0.7411
Harmonic Mean of Cell Sizes	14.73684

NOTE: Cell sizes are not equal.

Means with the same letter are not significantly different.

t Grouping	Mean	N	trat
A	3.0667	15	F
A	2.6667	15	CHXF
A	2.5333	15	CHX
B	1.5714	14	C

## Estadísticas Descriptivas

## The MEANS Procedure

Analysis Variable : pds % PDS

Tratamiento	N Obs	Mean	Std Dev	Upper 95% CL for Mean	Lower 95% CL for Mean
C	15	-14.0228571	12.0945687	-7.0396611	-21.0060532
CHX	15	-17.6157143	15.9252710	-8.4207366	-26.8106920
CHXF	15	-28.5307143	18.7952484	-17.6786610	-39.3827676
F	15	-29.5378571	13.5674640	-21.7042366	-37.3714776

## Teste de Friedman

## Class Level Information

Class	Levels	Values
trat	4	C CHX CHXF F

Number of observations 60

NOTE: Due to missing values, only 56 observations can be used in this analysis.

## Teste de Friedman

## The GLM Procedure

Dependent Variable: pds Values of pds Were Replaced by Ranks

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
trat	3	10.00000000	3.33333333	2.89	0.0442
Error	52	60.00000000	1.15384615		
Corrected Total	55	70.00000000			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	pds Mean
0.142857	42.96689	1.074172	2.500000

## Teste de Friedman

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	52
Error Mean Square	1.153846
Critical Value of t	2.00665
Least Significant Difference	0.8147

Means with the same letter are not significantly different.

t Grouping	Mean	N	trat
A	3.1429	14	C
B A	2.5714	14	CHX
B	2.2857	14	CHXF
B	2.0000	14	F